

**ELAINE CRISTINA GAVIOLI**

**AVALIAÇÃO DOS SUBSTRATOS NEURAIS DO EFEITO  
ANSIOGÊNICO DA SUBSTÂNCIA P**

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

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

**Florianópolis – SC**

**2000**

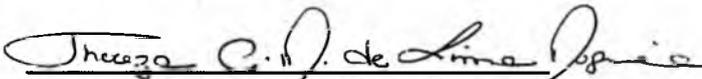
**“AVALIAÇÃO DOS SUBSTRATOS NEURAIS DO EFEITO  
ANSIOGÊNICO DA SUBSTÂNCIA P”.**

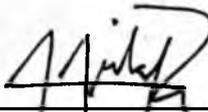
**POR**

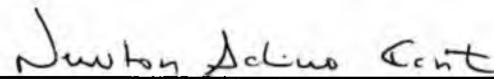
**ELAINE CRISTINA GAVIOLI**

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

**Banca Examinadora:**

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

  
**André Ramos**  
**(BEG/CCB/UFSC - Membro Titular)**

  
**Newton Sabino Canteras**  
**(ICB/USP - Membro Titular)**

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

**Florianópolis, 06 de dezembro de 2000.**

GAVIOLI, Elaine Cristina. **Avaliação dos substratos neurais do efeito ansiogênico da substância P**. Florianópolis, 2000, 100 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Defesa: 06/12/2000

O presente trabalho investigou o substrato neuroanatômico e o envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> na área de maior relevância para o efeito ansiogênico induzido pela SP em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Nossos dados mostram que os ratos tratados com SP 10 pmol no septo lateral (SL) expressaram reações de defesa extremas no teste do LCE e na arena, denominadas como respostas de “freezing” e “darting”, respectivamente, sendo essa ação muito mais evidente nessa área do que quando a SP foi injetada na região amigdalár ou no ventrículo lateral. Por outro lado, a injeção intra-septal de FK 888 (100 pmol), antagonista NK<sub>1</sub>, ou de SR 48968 (100 pmol), antagonista NK<sub>2</sub>, no SL, seguido da injeção de SP (10 pmol) no ventrículo lateral, foi capaz de inibir as respostas aversivas induzidas pela injeção intracerebroventricular de SP. Estes resultados sugerem que o septo lateral parece ser um substrato neuroanatômico muito importante na mediação dos efeitos do tipo ansiogênico da SP e que os receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> possuem um papel importante na mediação deste efeito.

**“A ciência consiste em esquecer  
o que se acredita saber e a sabedoria  
em não se preocupar com isso”**

**Charles Nodier**

**Aos meus pais, pelo imenso  
amor e dedicação.**

## AGRADECIMENTOS

À professora **Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira** pela orientação na realização deste trabalho e, principalmente, por ter me dado a oportunidade e o incentivo para seguir a carreira acadêmica.

Ao professor **Dr. Newton Sabino Canteras** pela dedicação, atenção e participação direta na realização deste trabalho e à **Ana Maria Peraçoli Campos** que colaborou tecnicamente para a conclusão deste estudo.

A todos os outros professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, em especial a **Profa. Dra. Roseli C. Farges** e ao **Prof. Dr. Giles A. Rae** pela orientação e compreensão na realização de outros estudos, que enriqueceram a minha formação científica, e ao **Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez**, pela amizade e atenção em todas as horas.

Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia, particularmente à **Sandra, Vera, Rita, Diana e Maria Goretti**, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À direção e aos funcionários do Biotério Central e aos funcionários do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, **Pedro, Neto e Ione**, que foram de importância fundamental e sem os quais esse trabalho não seria realizado.

Aos colegas do curso, em especial ao **Leandro José**, pela presença companheira nesta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, **Sandro, Néia, Raquel e Ricardo**, por tudo o que me ensinaram e, também, ao **Marco, Fábio, Felipe, Raquelzinha, Viviane, Esteban, Luciana, Marcelo e Gisely**, que fizeram do laboratório um lugar muito agradável.

À minha grande amiga **Thereza Viana**, pela companhia e pelo exemplo maravilhoso de contemplação à vida.

Ao **Junior** e à **Nara** que sempre se fizeram presentes, me incentivando nos momentos mais difíceis.

E à **Deus** que é fonte eterna de força e coragem na minha vida.

# SUMÁRIO

RESUMO	i
<i>ABSTRACT</i>	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b><u>Neurocininas</u></b>	
Histórico	01
Receptores taquicinérgicos	02
Segundos mensageiros	04
Antagonistas não peptídicos dos receptores taquicinérgicos	04
<b><u>Neurocininas e sistema nervoso central</u></b>	
Localização da substância P no sistema nervoso central	06
Distribuição dos receptores taquicinérgicos no sistema nervoso central	07
Neurocininas e psicopatologias	14
<b><u>Bases neuroanatômicas da ansiedade</u></b>	
Comportamento defensivo X Ansiedade	19
Amígdala	21
Substância cinzenta periaquedutal	22
Área septal	23

<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
Considerações éticas	27
Animais	27
Drogas e soluções	27
Cirurgia esterotáxica	29
Cânulas	30
Procedimentos para a administração central das drogas	30
Equipamentos	31
Protocolo experimental	35
Histologia	39
Análise estatística	39
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
1. Caracterização do efeito ansiogênico da substância P administrada intracerebroventricular em ratos.	40
2. Efeito comportamental da substância P após a administração no núcleo basolateral da amígdala e na substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos.	44
3. Efeito comportamental da substância P após a administração na área septal lateral em ratos.	50
4. Influência do tratamento intra-septal com antagonista NK <sub>1</sub> no efeito ansiogênico da substância P.	59
5. Influência do tratamento intra-septal com antagonista NK <sub>2</sub> no efeito ansiogênico da substância P.	63

<b>DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>79</b>

RESUMO

## RESUMO

As neurocininas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC), incluindo regiões relacionadas com o comportamento de medo e ansiedade. Estudos têm demonstrado que o núcleo basolateral da amígdala e a substância cinzenta periaquedutal dorsal parecem estar envolvidos na modulação do efeito ansiogênico da substância P (SP).

O presente trabalho investigou o substrato neuroanatômico responsável pelo efeito ansiogênico da SP em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, este trabalho se propôs a avaliar o envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> na área de maior relevância para o efeito ansiogênico induzido pela SP.

Os procedimentos experimentais deste estudo foram divididos em duas partes. Na primeira parte, ratos Wistar adultos (3 meses) foram anestesiados com tiopental sódico e hidrato de cloral (i.p.) e uma cânula foi implantada em diversas áreas do SNC, como ventrículo lateral (i.c.v.), núcleo basolateral da amígdala (BLA), substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e septo lateral (SL). Cinco dias após as cirurgias, os animais canulados i.c.v. receberam 2 µl de solução de fosfato tamponada (PBS) ou 2 µl de concentrações crescentes de SP (1, 4, 10, 40 e 100 pmol), a fim de determinar a dose i.c.v. capaz de produzir maior efeito ansiogênico em ratos. Após determinarmos que a dose de 10 pmol de SP é a dose i.c.v. capaz de produzir o maior efeito ansiogênico no LCE, esta dose foi injetada nas estruturas do sistema límbico acima citadas. Os animais canulados na SCPd e na BLA foram microinjetados com PBS ou SP 10 pmol e aqueles animais canulados no septo lateral foram tratados com PBS, SP 10 pmol ou SP 40 pmol. Imediatamente após o tratamento, os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena, onde registrou-se diversas medidas do comportamento exploratório durante 5 min. Depois foram transferidos para o LCE e, por 5 min, registrou-se a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos, além de parâmetros etológicos como imersão de cabeça, estiramento corporal e comportamento de levantar. Observamos que a SP na dose de 10 pmol reduziu o tempo de permanência nos braços abertos do LCE nos animais canulados na BLA, mas este resultado não diferiu da resposta observada após a injeção deste peptídeo i.c.v.. Os animais canulados na SCPd tratados com SP 10 pmol não apresentaram modificações nos parâmetros analisados. No entanto, os ratos que receberam SP 10 pmol no septo lateral expressaram reações de defesa extremas no teste do LCE e na arena, denominadas como respostas de “freezing” e “darting”. Os ratos que apresentaram “freezing” após a administração de SP intra-septal mostraram uma redução na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, enquanto que os animais que exibiram o

comportamento de “darting”, apresentaram um aumento no tempo de movimentação na arena. A dose maior de SP (40 pmol) no SL não promoveu alteração comportamental nos testes da arena e do LCE.

Na segunda parte do estudo, avaliou-se o envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> no efeito ansiogênico da SP injetada no septo lateral. Foram implantadas duas cânulas, uma no SL e a outra i.c.v.. Cinco dias após a cirurgia os animais controle receberam 2 µl de PBS no SL e, 5 min depois, injetou-se 2 µl de PBS ou SP (10 pmol) i.c.v., o grupo experimental foi tratado com 2 µl de FK 888 (100 pmol), antagonista NK<sub>1</sub>, ou SR 48968 (100 pmol), antagonista NK<sub>2</sub>, no SL e, passados 5 min, 2 µl de SP (10 pmol) i.c.v.. Os animais foram avaliados no teste do LCE, por 5 min, como descrito anteriormente. Aqueles animais que receberam FK 888 ou SR 48968 no SL e SP i.c.v. mostraram um comportamento similar aos animais controle na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE.

Nossos resultados sugerem que o septo lateral parece ser um substrato neuroanatômico muito importante na mediação dos efeitos do tipo ansiogênico da SP, pois essa ação da SP foi muito mais evidente nessa área que quando injetada na BLA ou mesmo no ventrículo lateral. O trabalho também mostrou a inibição do efeito ansiogênico da SP pelo FK 888 e pelo SR 48968, sugerindo que os receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> possuem um papel importante na mediação do efeito ansiogênico induzido pela SP quando injetada no septo lateral.

*ABSTRACT*

**ABSTRACT****EVALUATION OF THE NEUROANATOMICAL AREAS INVOLVED IN THE ANXIOGENIC-EFFECT INDUCED BY SUBSTANCE P**

Substance P (SP) is widely distributed in the central nervous system (CNS), including brain regions, such as the lateral septal nucleus, amygdala and periaqueductal grey, cerebral areas implicated in the modulation of anxiety states and defensive-rage. Studies have demonstrated the involvement of the amygdala and the periaqueductal gray matter in the modulation of anxiogenic-like effects induced by SP.

The aims of the present study were to investigate the neuroanatomical area involved in the modulation of anxiety states induced by SP in rats evaluated in the elevated plus-maze test (EPM) and to investigate the underlying role of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the behavioral responses.

In the first part of the present study, adult male rats were implanted with cannulas into different CNS areas such as the lateral ventricle (LV), the amygdalar region (BLA), the periaqueductal gray matter (PAG) and the lateral septal nucleus (LS). Five days following the surgery, control animals were injected into the LV with 2 µl of physiological buffer solution (PBS) and the experimental group was treated with increasing concentrations of SP (1, 4, 10, 40 and 100 pmol) to determine the optimal intracerebroventricular dose (10 pmol) to induce aversive responses. Therefore, SP 10 pmol was directly injected into the BLA, PAG and LS, and the anxiogenic responses were evaluated in the EPM. Notably, when placed in the EPM the animals that received SP into the LS, presented clear aversive behaviors expressed either as jumps and bursts of running (darting responses) or freezing. However, we observed an effective increase in the anxiogenic responses evaluated in the EPM test uniquely in the animals that presented freezing. Animals expressing darting responses, in turn, were likely to have a stronger aversive condition, in which anxiogenic-like responses hindered when measured in the EPM test. The injection of SP into the BLA induced the same aversive behavior than the ones observed after injection into the lateral ventricle. On the other hand, the animals implanted into the PAG did not show any effect when injected with SP as evaluated in the EPM.

In the second part of this study, the animals were implanted with a cannula into the LS and another cannula into the LV. Five days later, control animals received 2 µl PBS into LS and PBS or SP 10 pmol into the LV, and the experimental group was treated with 2 µl of

FK 888 (100 pmol), a selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist, or SR 48968 (100 pmol), a selective NK<sub>2</sub> receptor antagonist, into the LS and 2 µl of SP 10 pmol into the LV. Animals were placed in the EPM, and for 5 min the aversive responses were recorded. FK 888 and SR 48968 into the SL inhibited the anxiogenic-like response induced by injection of SP into the LV, showing a similar behavior to control animals.

The present results support the idea that the LS is an important site to mediate the anxiogenic responses of SP, where injection of this peptide induced a much more pronounced anxiogenic-like effects than the ones observed after injection into the amygdalar region or lateral ventricle. The work also showed a blockade of the anxiogenic-like effects of SP by FK 888 and SR 48968 and give support to the idea that NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors at LS play a key role in mediating these effects.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática do receptor NK <sub>1</sub> de humano e de rato	<b>06</b>
<b>Figura 2</b> – Distribuição esquemática dos grupos de células e fibras que possuem substância P no SNC, em um corte sagital do cérebro de rato.	<b>09</b>
<b>Figura 3</b> – Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis de A 12.1 à A 3.8) do SNC de ratos, arranjados no sentido rostrocaudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP.	<b>10</b>
<b>Figura 4</b> – Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis de A 1.3 à P 7.4) do SNC de ratos, arranjados no sentido rostrocaudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP.	<b>11</b>
<b>Figura 5</b> – Arena	<b>32</b>
<b>Figura 6</b> – Labirinto em cruz elevado	<b>33</b>
<b>Figura 7</b> – Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de substância P no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE.	<b>41</b>
<b>Figura 8</b> – Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de substância P no número de entradas nos braços fechados no LCE e na atividade locomotora avaliada na arena.	<b>42</b>
<b>Figura 9</b> – Efeito da injeção de substância P (10 pmol) no núcleo basolateral da amígdala no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE.	<b>45</b>
<b>Figura 10</b> – Efeito da injeção de substância P (10 pmol) no núcleo basolateral da amígdala no número de entradas nos braços fechados no LCE e na atividade locomotora avaliada na arena.	<b>46</b>
<b>Figura 11</b> – Efeito da injeção de substância P (10 pmol) na substância cinzenta periaquedutal dorsal no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE.	<b>47</b>

- Figura 12** – Efeito da injeção de substância P (10 pmol) na substância cinzenta periaquedutal dorsal no número de entradas nos braços fechados no LCE e na atividade locomotora avaliada na arena. 48
- Figura 13** – Efeito da injeção de substância P (10 pmol) na área septal lateral no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE. 52
- Figura 14** – Análise comportamental de animais tratados com SP (10 pmol) na área septal lateral no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE. 53
- Figura 15** – Análise comportamental de animais tratados com SP (10 pmol) na área septal lateral no número de entradas nos braços fechados no LCE e na atividade locomotora avaliada na arena. 54
- Figura 16** – Efeito da injeção de substância P (40 pmol) na área septal lateral no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE. 55
- Figura 17** – Efeito da injeção de substância P (10 pmol) na área septal lateral no tempo de movimentação e na movimentação espontânea na arena. 58
- Figura 18** – Efeito da administração i.c.v. de SP (10 pmol), após o tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista NK<sub>1</sub>, no septo lateral, no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE. 60
- Figura 19** – Efeito da administração i.c.v. de SP (10 pmol), após o tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista NK<sub>1</sub>, no septo lateral, no número de entradas nos braços fechados e no número de imersões de cabeça no LCE. 61
- Figura 20** – Efeito da administração i.c.v. de SP (10 pmol), após o tratamento com SR 48968 (100 pmol), antagonista NK<sub>2</sub>, no septo lateral, no tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE. 64
- Figura 21** – Efeito da administração i.c.v. de SP (10 pmol), após o tratamento com SR 48968 (100 pmol), antagonista NK<sub>2</sub>, no septo lateral, no número de entradas nos braços fechados e no número de imersões de cabeça no LCE. 65

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Efeito do tratamento i.c.v. com SP em doses crescentes nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	<b>43</b>
<b>Tabela 2</b> – Efeito do tratamento i.c.v. com SP em doses crescentes em alguns parâmetros registrados na arena e no teste do rota-rod.	<b>43</b>
<b>Tabela 3</b> – Efeito do tratamento com SP (10 pmol) no núcleo basolateral da amígdala e na substância cinzenta periaquedutal dorsal nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	<b>49</b>
<b>Tabela 4</b> – Efeito do tratamento com SP (10 pmol) no núcleo basolateral da amígdala e na substância cinzenta periaquedutal dorsal nos parâmetros etológicos registrados na arena.	<b>49</b>
<b>Tabela 5</b> – Efeito do tratamento com SP (10 e 40 pmol) na área septal lateral nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	<b>56</b>
<b>Tabela 6</b> – Efeito do tratamento com SP (10 e 40 pmol) na área septal lateral em alguns parâmetros registrados na arena e no teste do rota-rod.	<b>56</b>
<b>Tabela 7</b> – Efeito da administração i.c.v. de SP (10 pmol), após o tratamento com FK 888 (100 pmol) no septo lateral, nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	<b>62</b>
<b>Tabela 8</b> – Efeito da administração i.c.v. de SP (10 pmol), após o tratamento com SR 48968 (100 pmol) no septo lateral, nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	<b>66</b>

**LISTA DE ABREVIACÕES**

**AMPc** – monofosfato de adenosina cíclico

**BLA** – núcleo basolateral da amígdala

**i.c.v.** – intracerebroventricular

**i. p.** – intraperitoneal

**IP<sub>3</sub>** – trifosfato de inositol

**LCE** – labirinto em cruz elevado

**NKA** – neurocinina A

**NKB** – neurocinina B

**PBS** – *phosphate-buffered solution*

**PPT-A** – pré-protaquinina A

**SCP** – substância cinzenta periaquedutal

**SCPd** – substância cinzenta periaquedutal dorsal

**SL** – septo lateral

**SNC** – sistema nervoso central

**SP** – substância P

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### NEUROKININAS

#### **Histórico**

Von Euler e Gaddum (1931), ao procurar por acetilcolina em tecidos de cavalo, encontraram uma substância que estava presente no intestino e no cérebro desse animal. Ignorando sua estrutura e natureza química, Gaddum e Schild (1934) a nomearam de substância P (SP), uma das explicações para a origem deste nome vem da palavra “preparação”, visto que von Euler relatou ter usado uma preparação padrão, convenientemente abreviada por P (Otsuka & Yoshioka, 1993). Somente na década de 60, a SP foi purificada (Stern, 1961) e, em 1971, Chang e colaboradores identificaram a sua estrutura primária, um undecapeptídeo (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>), o que permitiu a sua síntese (Tregear *et al.*, 1971).

A identificação de substâncias presentes na pele de anfíbios e em moluscos, como a fisalaemina, kassinina e a eledoisina, com similaridades farmacológicas à SP (Bertaccini, 1976; Erspamer & Melchiorri, 1980; Erspamer, 1981), levou à descoberta de uma nova família de peptídeos, as taquicininas, que receberam este nome por causarem uma contração imediata na musculatura lisa extra-vascular, o que as diferencia da bradicinina, responsável por uma contração lenta na musculatura lisa extra-vascular (Bertaccini, 1976).

As taquicininas são, portanto, peptídeos que compartilham a mesma seqüência de aminoácidos da extremidade C-terminal (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>), no qual o X é um resíduo aromático (fenilalanina – Phe ou treonina – Try) ou um resíduo alifático hidrofóbico (valina – Val ou isoleucina – Ile; Erspamer, 1981).

Até 1980 a substância P era o único peptídeo da família das taquicininas conhecido em mamíferos e, com o passar dos anos, surgiram evidências de que outros membros desta família poderiam existir nesta classe de animais, principalmente após a descoberta de que taquicininas presentes em moluscos e anfíbios são capazes de produzir atividade farmacológica em preparações com tecidos de mamíferos (Erspamer, 1971; Erspamer & Melchiorri, 1973).

Deste modo, em 1983, quatro grupos de pesquisadores independentes (Kangawa *et al.*; Kimura *et al.*; Maggio *et al.* e Schimada *et al.*) relataram a existência de outros decapeptídeos, contendo a mesma seqüência de aminoácidos C-terminal da família das taquicininas, presentes em mamíferos: a neurocinina A (NKA, substância K, neurocinina  $\alpha$ ) e a neucina B (neuromedina K e neurocinina  $\beta$ ). Tatemoto e colaboradores (1985) isolaram a neurocinina K (NPK, neuropeptídeo K) e, em 1988, Kage e colaboradores identificaram a neurocinina  $\gamma$  (NP- $\gamma$ , neuropeptídeo  $\gamma$ ).

Com a descoberta de três receptores taquicinérgicos e o isolamento de novas taquicininas em mamíferos, a nomenclatura destes peptídeos e de seus receptores tornou-se muito confusa. Assim, em 1986, em um simpósio em Montreal - Canadá -, concordou-se em usar o termo taquicininas para indicar peptídeos que compartilham da mesma seqüência C-terminal (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) em anfíbios e moluscos, enquanto que neurocininas foi a designação genérica usada para peptídeos presentes em mamíferos. Além disso, os receptores dos mamíferos receberam a denominação de receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> (Henry, 1987).

### **Receptores taquicinérgicos**

Em paralelo à identificação das taquicininas endógenas, diversas classes de receptores taquicinérgicos foram descobertas. Iversen e colaboradores, em 1982,

identificaram dois perfis distintos, em relação à potência das taquicininas de ligar ao seu receptor em uma preparação de músculo liso e propuseram a existência dos receptores SP-P e SP-E. Outros indícios da existência de dois locais de ligação distintos para as taquicininas surgiram de experimentos com peptídeos radioligantes (Beaujouan *et al.*, 1986; Danks *et al.*, 1986).

Após o acordo realizado no simpósio de Montreal (1986), os receptores presentes em mamíferos receberam a denominação de receptor taquicinérgico NK<sub>1</sub> (anteriormente chamado de SP-P), receptor taquicinérgico NK<sub>2</sub> (conhecido também como SP-E, SP-K, NK-A) e o primeiro receptor taquicinérgico NK<sub>3</sub> a ser reconhecido (previamente também chamado de SP-E, SP-N, NK-B) foi denominado de NK<sub>3A</sub> (Maggi & Schwartz, 1997) e, no mesmo ano (1997), Krause e colaboradores identificaram um receptor altamente homólogo ao receptor taquicinérgico NK<sub>3A</sub> e o denominaram de receptor NK<sub>3B</sub> (para revisão ver Saria, 1999).

As atividades agonísticas da SP e peptídeos relacionados estão associadas ao domínio carboxi terminal, que é comum entre esses peptídeos (Mussap *et al.*, 1993). O domínio amino terminal, por sua vez, confere seletividade aos diferentes tipos de receptores (para revisão ver Regoli *et al.*, 1994; Otsuka e Yoshioka, 1993). É importante relatar que as neurocininas podem interagir com qualquer um dos receptores taquicinérgicos, isto significa que estes peptídeos possuem seletividade limitada por um receptor taquicinérgico em particular (Regoli *et al.*, 1989), porém sua afinidade por cada um dos tipos difere: a SP é o ligante fisiológico do receptor taquicinérgico do tipo NK<sub>1</sub>, a NKA do receptor NK<sub>2</sub> e a NKB do receptor NK<sub>3</sub> (Culman & Unger, 1995; Maggi *et al.*, 1993; Patacchini & Maggi, 1995; Stables *et al.*, 1994).

## Segundos mensageiros

Os receptores taucinérgicos pertencem a superfamília dos receptores acoplados à proteína G e através da ativação estimulam o trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) como segundo mensageiro, via fosfolipase C. Pode haver também a mobilização de ácido aracdônico via fosfolipase A<sub>2</sub> e o acúmulo de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) via adenilato ciclase (Garcia *et al.*, 1994; Mitsubishi *et al.*, 1992; Mochizuki, *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 1992; Seabrook & Fong, 1993; Takeda *et al.*, 1992).

De acordo com Guard & Watson (1991), as taucininas induzem a formação de fosfato de inositol, em tecidos do sistema nervoso central, efeito este mediado, predominantemente, pelos receptores NK<sub>1</sub>. O fosfato de inositol, por sua vez, possui um papel importante no controle da excitabilidade de células neuronais (ver revisão Kaczmarek, 1987; Nahorski, 1988).

## Antagonistas não peptídicos dos receptores taucinérgicos

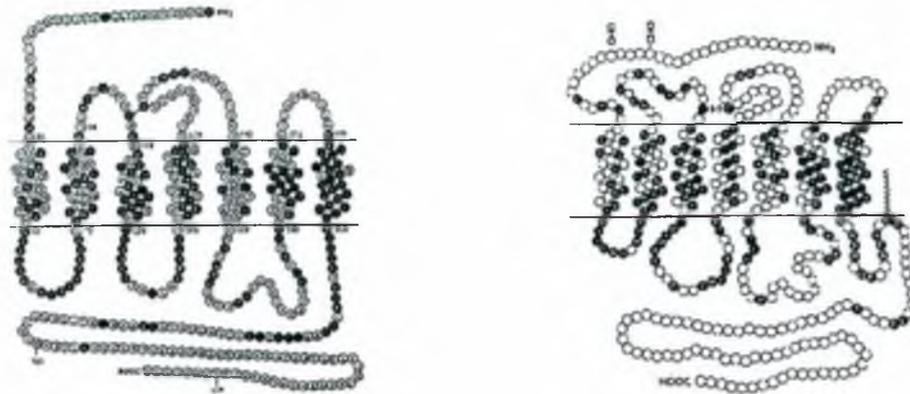
A história dos antagonistas não peptídicos para os receptores taucinérgicos NK<sub>1</sub> começou em 1991, quando o CP 96345 e o RP 67580 foram encontrados por *screening* dos componentes das coleções químicas das companhias farmacêuticas Pfizer e Rhône-Poulenc, respectivamente (Snider *et al.*, 1991; Garret *et al.*, 1991). O primeiro antagonista não peptídico seletivo para o receptor NK<sub>2</sub> foi o SR 48968, que surgiu também de um *screening* de componentes químicos da companhia Sanofi Recherche (Emonds-Alt *et al.*, 1992) e, em 1995, surge o SR 142801, o primeiro antagonista não peptídico para o receptor NK<sub>3</sub> (Emonds-Alt *et al.*, 1995). Em consequência, alguns destes protótipos, com perfil antagonista taucinérgico, foram utilizados como modelo molecular para a otimização química, o que promoveu um rápido desenvolvimento desta área (para revisão ver Regoli *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de moléculas antagonistas dos receptores taquicinérgicos representou uma grande oportunidade para explorar estas moléculas como novos agentes terapêuticos (Rupniak & Kramer, 1999). De uma maneira geral, estudos foram realizados em paralelo com os ensaios de *binding*, para verificar as propriedades farmacológicas destes antagonistas taquicinérgicos (Regoli *et al.*, 1994). Zernig e colaboradores, em 1992, realizaram um dos primeiros estudos farmacológicos *in vivo* com um antagonista não peptídico NK<sub>1</sub>, o CP 96345, que, após a administração sistêmica, demonstrou uma redução da atividade locomotora, causada por sedação, com conseqüente alteração na performance motora de camundongos testados na caixa claro-escuro.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, estudos envolvendo a clonagem do receptor taquicinérgico NK<sub>1</sub> de humanos foram realizados e demonstraram que existem variações na seqüência deste receptor quando comparado à outras espécies (Figura 1). Entre ratos e humanos há cerca de 95 % de homogeneidade dos resíduos de aminoácidos que compõem o receptor NK<sub>1</sub> (Sundelin *et al.*, 1992), porém as cobaias possuem 97 % de homogeneidade comparado ao humano, além disso, as seqüências transmembranais são idênticas às humanas (Gorbulev *et al.*, 1992). Estes dados são interessantes, pois variações na seqüência do receptor taquicinérgico NK<sub>1</sub> com relação à espécie não afetam a potência ou eficácia dos agonistas taquicinérgicos, mas interferem na potência dos antagonistas não peptídicos (para revisão ver Saria, 1999).

Recentemente, a eficácia do MK 869, um antagonista não peptídico do receptor taquicinérgico NK<sub>1</sub>, biodisponível oralmente, foi demonstrada em pacientes com depressão maior (Kramer *et al.*, 1998). Os testes clínicos com o MK 869 foram guiados pelas necessidades médicas de obtenção de uma nova droga para o tratamento da depressão e, também, por evidências de estudos pré-clínicos (para revisão ver Rupniak & Kramer, 1999).

Por outro lado, a identificação de antagonistas não peptídicos dos receptores taquicinérgicos tem colaborado para o estudo do envolvimento destes receptores em processos patofisiológicos e, neste sentido, estes antagonistas ajudam a elucidar o papel do respectivo receptor, além de oferecerem a promessa de serem potentes agentes terapêuticos (Raffa, 1998).



- - Aminoácidos conservados nos receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>
- - Aminoácidos alterados nos receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>

Figura 1 – Representação esquemática do receptor NK<sub>1</sub> de humano (esquerda) e de rato (direita). Adaptado de Regoli *et al.* (1994).

## NEUROKININAS E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

### **Localização da substância P no sistema nervoso central**

A distribuição de neurônios contendo SP no sistema nervoso central é bastante difusa (Cooper *et al.*, 1981; Del Fiacco *et al.*, 1987; Ljungdahl *et al.*, 1978; Marksteiner *et al.*, 1993). No entanto, fibras nervosas e corpos celulares imunorreativos à SP foram encontradas em regiões cerebrais envolvidas nas reações de defesa e ansiedade, como a amígdala, a substância cinzenta periaquedutal, vários núcleos hipotalâmicos, hipocampo e o septo lateral (Cuello &

Kanazawa, 1978; Hökfelt *et al.*, 1977; Ljungdahl *et al.*, 1978; O'Donohue *et al.*, 1987; Sakanaka *et al.*, 1982; Shaik & Siegel, 1994; Shults *et al.*, 1984; Figura 2).

Além disso, usando a técnica de hibridização *in situ*, um estudo revelou que o septo lateral, a região central e medial da amígdala e a substância cinzenta periaquedutal contém neurônios que expressam o gene da PPT-A (pré-protaquinina A), cuja transcrição do gene origina o RNAm responsável pela síntese da SP e da NKA (Harlan *et al.*, 1989).

No mapeamento cerebral de humanos normais, áreas como o hipotálamo, hipocampo e amígdala apresentam intensidades significantes de SP imunorreativa, porém um estudo revelou que altas concentrações de SP estão localizadas no segmento interno do globo pálido e da substância negra, o que pode indicar a participação deste peptídeo em distúrbios do movimento, como o mal de Parkinson e a coreia de Huntington (Den'etsu *et al.*, 1999).

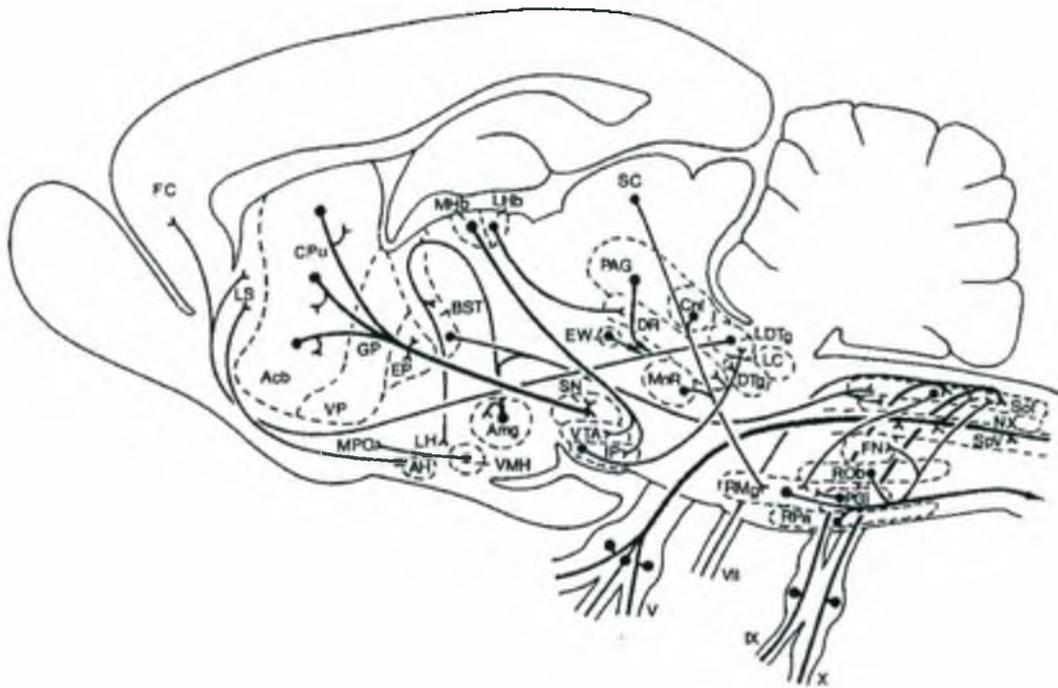
### **Distribuição dos receptores taquicinérgicos no sistema nervoso central**

A distribuição de receptores taquicinérgicos no SNC de mamíferos demonstrou que regiões cerebrais implicadas em reações de defesa e ansiedade, como o hipotálamo, amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal expressam densidades significantes de receptores para SP (Arai & Emson, 1986; Cuello & Kanazawa, 1978; Hökfelt *et al.*, 1987; Mantyh *et al.*, 1984; Shaik & Siegel, 1994), como mostrado nas Figuras 3 e 4.

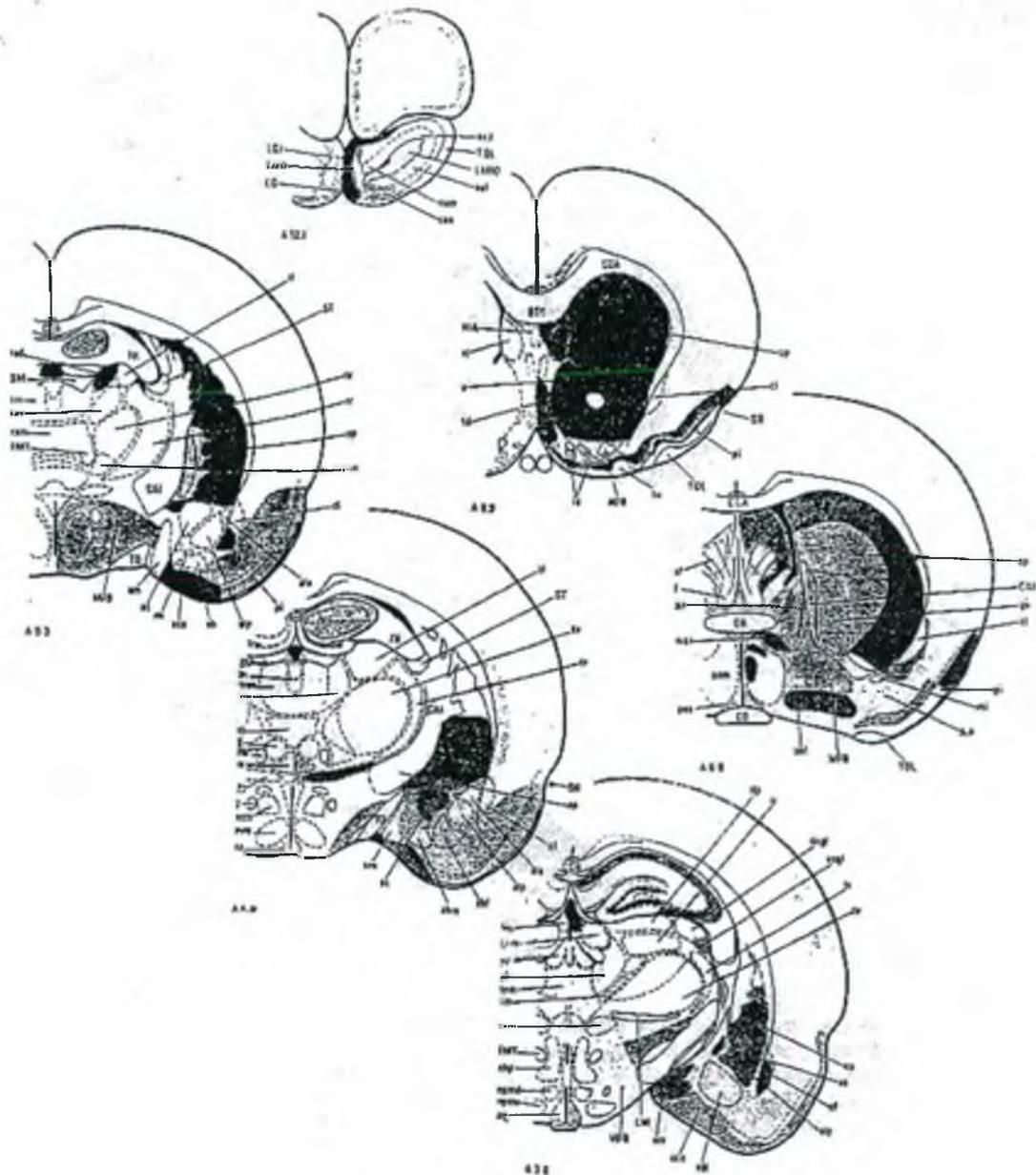
Um estudo demonstrando a ativação de *c-fos*, através da administração de um agonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub> no cérebro de cobaia, revelou que um grande número de células expressam a proteína *fos* em várias regiões do cérebro, tais como: córtex frontal, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, septo lateral, substância cinzenta periaquedutal, área postrema e núcleo do trato solitário, regiões associadas com o controle da emoção, aprendizagem e memória e regulação autonômica (Yip & Chahl, 1999).

Apesar de inúmeras controvérsias sobre a existência dos receptores NK<sub>2</sub> no SNC, vários estudos comportamentais sugerem sua presença em inúmeras regiões do cérebro, incluindo a substância negra, o hipocampo (Hagan *et al.*, 1991), o núcleo mediano da rafe (Mason & Elliot, 1992), além do córtex pré-frontal, área septal e área tegmental ventral (Otsuka & Yoshioka, 1993).

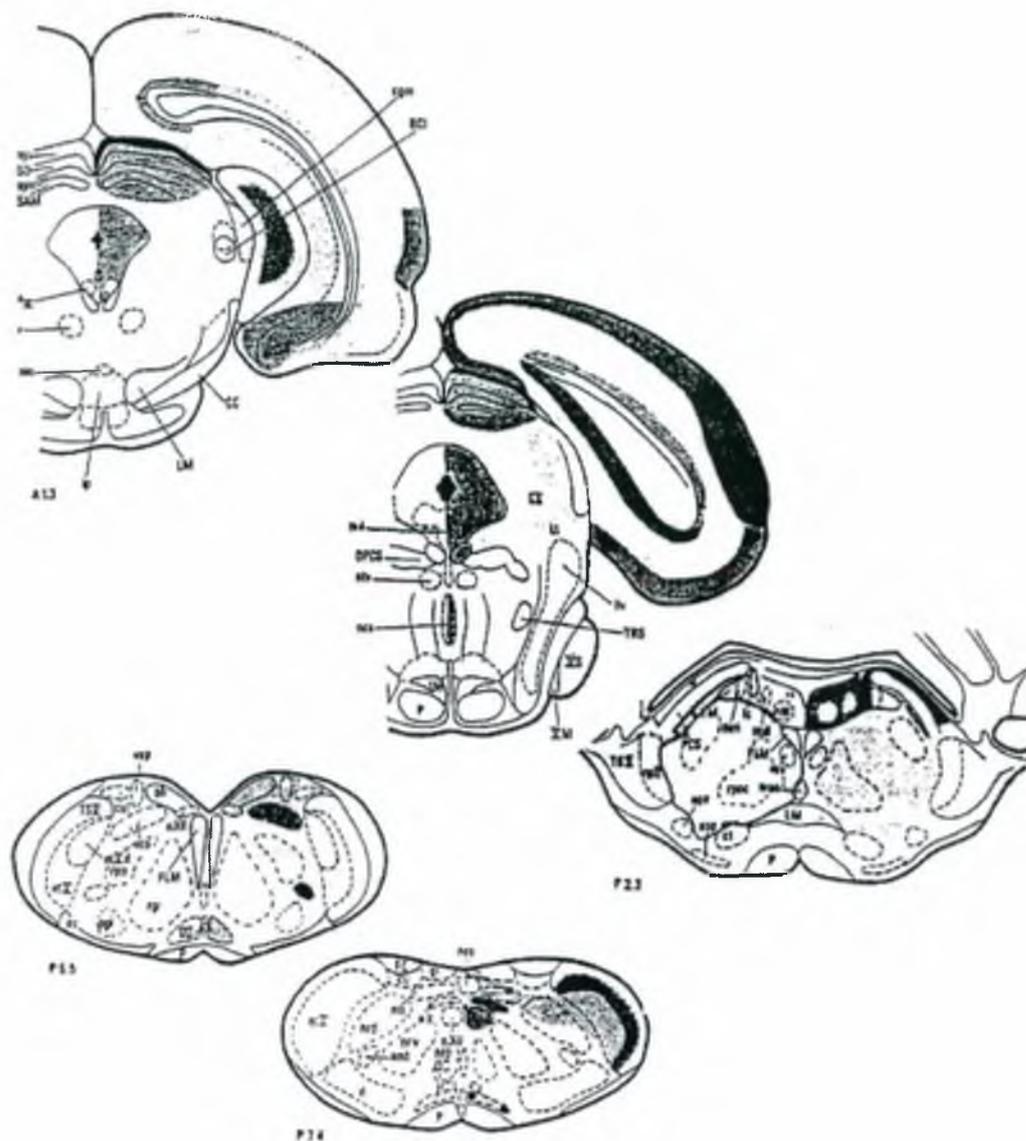
A presença de receptor taquicinérgico NK<sub>3</sub> foi determinada em diversas áreas cerebrais pertencentes ao sistema límbico, tais como: núcleo medial do septo, núcleo do leito da estria terminal, áreas hipotalâmicas dorsal e lateral, amígdala e substância cinzenta periaquedutal, através de técnicas de imunohistoquímica e de hibridização *in situ* (Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996).



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



**Figura 3 – Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis que vão de A 12.1 até A 3.8) do SNC de ratos, arranjadas no sentido rostro-caudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP. A densidade relativa dos sítios de ligação é representada de acordo com uma escala que varia do cinza escuro (++++/+++), cinza (++) e cinza claro (+) correspondendo às áreas de maior até menor concentração de receptores para SP. Retirado de O'Donohue *et al.* (1987) e adaptado por Baretta (1998).**



**Figura 4 – Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis que vão de A 1.3 até P 7.4) do SNC de ratos, arranjadas no sentido rostro-caudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP. A densidade relativa dos sítios de ligação é representada de acordo com uma escala que varia do cinza escuro (++++/+++), cinza (++) e cinza claro (+) correspondendo às áreas de maior até menor concentração de receptores para SP. Retirado de O'Donohue *et al.* (1987) e adaptado por Baretta (1998).**

### Lista de abreviações referentes as Figuras 3 e 4

<b>A</b> - Núcleo accumbens	<b>LMO</b> - Camada molecular do bulbo olfativo
<b>AA</b> - Área anterior da amígdala	<b>MFB</b> - Núcleo medial prosencefálico
<b>AB</b> - Núcleo basolateral da amígdala	<b>N-III</b> - Núcleo do nervo oculomotor
<b>AC</b> - Núcleo central amigdalóide	<b>N-X</b> - Núcleo do nervo vago
<b>ACO</b> - Núcleo cortical amigdalóide	<b>N-XII</b> - Núcleo do nervo hipoglosso
<b>ALA</b> - Porção antero-lateral do núcleo amigdalóide	<b>NCO</b> - Núcleo comissural
<b>ALP</b> - Porção postero-lateral do núcleo amigdalóide	<b>NCS</b> - Núcleo central superior
<b>AM</b> - Núcleo medial amigdalóide	<b>NHP</b> - Núcleo hipotalâmico posterior
<b>BCL</b> - Colículo inferior	<b>NIST</b> - Núcleo intersticial da estria terminal
<b>CA</b> -Comissura anterior	<b>NPMD</b> - Núcleo pré-mamilar dorsal
<b>CAI</b> - Cápsula interna	<b>NPMV</b> - Núcleo pré-mamilar ventral
<b>CCA</b> - Corpo caloso	<b>NPV</b> - Núcleo paraventricular hipotalâmico
<b>CGM</b> - Núcleo geniculado medial	<b>NRD</b> - Núcleo reticular pontino (dorsal)
<b>CI</b> - Córtex cingulado	<b>NRV</b> - Núcleo reticular pontino (ventral)
<b>CM</b> - Núcleo centro medial do tálamo	<b>NT-V</b> - Núcleo espinhal (trigêmio)
<b>CO</b> - Quiasma óptico	<b>NT- Vd</b> - Núcleo espinhal dorsomedial
<b>CP</b> - Caudado-putamen	<b>NTD</b> - Núcleo tegmental dorsal
<b>CP</b> - Comissura posterior	<b>NTDL</b> - Núcleo tegmental lateral dorsal
<b>CT</b> - Núcleo trapezóide	<b>NTM</b> - Núcleo do trato mesencefálico
<b>DCGL</b> - Núcleo geniculado lateral dorsal	<b>NTS</b> - Núcleo do trato solitário
<b>EP</b> - Núcleo endopeduncular	<b>NTV</b> - Núcleo tegmental ventral
<b>F</b> - Fórnix	<b>OA</b> - Núcleo olfativo anterior
<b>FH</b> - Fímbria hipocampal	<b>OAD</b> - Núcleo olfativo anterior (dorsal)
<b>FMT</b> - Núcleo mamilar talâmico	<b>OAE</b> - Camada externa do núcleo olfativo anterior
<b>GP</b> - Globo Pálido	<b>OAL</b> - Núcleo olfativo anterior (lateral)
<b>GR</b> - Núcleo grácil	<b>OAM</b> - Núcleo olfativo anterior (medial)
<b>HIA</b> - Hipocampo (porção anterior)	<b>OC</b> - Trato olivar cerebelar
<b>HL</b> - Núcleo lateral da habênula	<b>OI</b> - Núcleo olivar
<b>HM</b> - Núcleo medial da habênula	<b>OPE</b> - Núcleo pré-olivar superior
<b>IC</b> - Núcleo intersticial de Cajal	<b>OSP</b> - Núcleo olivar superior
<b>IP</b> - Núcleo interpeduncular	<b>P</b> - Tracto corticoespinhal
<b>LC</b> - <i>Locus coeruleus</i>	
<b>LG</b> - Camada glomerular do bulbo olfativo	
<b>LGI</b> - Camada granular do bulbo olfativo	
<b>LL</b> - Lemnisco lateral	
<b>LLV</b> - Núcleo do lemnisco lateral	
<b>LM</b> - Núcleo do lemnisco medial	
<b>LMIO</b> - Camada medular do bulbo olfativo	

**Continuação da lista de abreviações referentes as Figuras 3 e 4**

<b>PCS</b> - Pedúnculo cerebelar superior	<b>TAV</b> - Núcleo antero-ventral do tálamo
<b>PF</b> - Núcleo parafascicular	<b>TD</b> - Núcleo da banda diagonal de Broca
<b>PH</b> - Núcleo do hipoglosso	<b>TL</b> - Núcleo lateral do tálamo
<b>PI</b> - Córtex piriforme	<b>TM</b> - Núcleo medial do tálamo
<b>POL</b> - Núcleo pré-óptico lateral	<b>TLP</b> - Núcleo posterior do tálamo
<b>POM</b> - Núcleo pré-óptico medial	<b>TMV</b> - Núcleo ventro medial do tálamo
<b>POS</b> - Núcleo pré-óptico supraquiasmático	<b>TO</b> - Trato óptico
<b>PV</b> - Núcleo paraventricular do tálamo	<b>TOL</b> - Trato olfativo lateral
<b>RPOC</b> - Núcleo reticular pontino	<b>TPM</b> - Núcleo postero-medial do tálamo
<b>SGS</b> - Colículo superior	<b>TR</b> - Núcleo reticular do tálamo
<b>SL</b> - Núcleo do septo lateral	<b>TS-V</b> - Núcleo espinhal do trigêmio
<b>SM</b> - Estria medular do tálamo	<b>TU</b> - Tubérculo olfativo
<b>SO</b> - Colículo superior (estrato óptico)	<b>TV</b> - Núcleo ventral do tálamo
<b>SR</b> - Sulco etorrinal	<b>VCGL</b> - Núcleo geniculado lateral ventral
<b>ST</b> - Estria terminal	<b>VM</b> - Núcleo motor do trigêmio
<b>TAD</b> - Núcleo anterior do tálamo dorsal	<b>VS</b> - Núcleo sensorial do trigêmio
<b>TAM</b> - Núcleo antero medial do tálamo	<b>VSP</b> - Núcleo vestibular espinhal

## Neurocininas e psicopatologias

Nos dias de hoje, muitos esforços estão sendo feitos para o entendimento de psicopatologias, como a ansiedade e a depressão. No entanto, sabe-se que a regulação destes estados emocionais depende do balanço neuroquímico que envolve neurotransmissores como o GABA, a serotonina, a noradrenalina, além de neuropeptídeos com ação modulatória, entre eles as neurocininas (Raffa, 1998).

Devido a baixa seletividade dos receptores taquicinérgicos, houve dificuldade em se definir a função de cada neurocinina e pareceu mais racional se determinar a distribuição e a farmacologia de cada receptor taquicinérgico em particular (Saria, 1999). Há, porém, uma abundante distribuição de receptores taquicinérgicos no cérebro e isso está refletido pela grande variedade de comportamentos expressos após a administração central de agonistas seletivos, como aumento na atividade locomotora, nos comportamentos de auto-limpeza, “sacudir de cachorro molhado” (*wet-dog shake*), “bater repetido das patas posteriores” (*hind paw tapping*), que de maneira geral, devem provavelmente estar relacionados com a liberação de outros neurotransmissores tais como dopamina, serotonina ou acetilcolina (Bristow & Young, 1994; Elliott & Iversen, 1986; Piot *et al.*, 1995; Stöessl *et al.*, 1995).

A administração central de substância P ou de outros agonistas seletivos do receptor NK<sub>1</sub> promovem uma exacerbação na atividade locomotora, na atenção e nos comportamentos de auto-limpeza (Brent *et al.*, 1994; Sakurada *et al.*, 1989), além de um aumento na pressão arterial, na frequência e débito cardíaco, atividades comportamentais e fisiológicas típicas da reação de defesa, em ratos conscientes (Culman & Unger, 1995; Tschöpe *et al.*, 1992; Unger *et al.*, 1988).

Agonistas seletivos do receptor NK<sub>1</sub>, quando administrados intracerebroventricular (i.c.v.) ou na substância negra, produzem respostas comportamentais nociceptivas, incluindo

comportamentos compulsivos de coçar, morder e lambe os membros posteriores ou o abdômen e o tórax, em ratos e camundongos (Laneuville *et al.*, 1988; Ravard *et al.*, 1994; Stoessl *et al.*, 1995).

A distribuição de neurocininas em áreas específicas do cérebro e da medula espinhal e o papel destes neuropeptídeos como neuromoduladores sugerem seu envolvimento na etiologia de doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson e a esquizofrenia, além de psicopatologias como ansiedade e depressão (para revisão ver Raffa, 1998).

A SP está envolvida no controle de várias respostas comportamentais, neuroquímicas e cardiovasculares do estresse (para revisão ver Rupniak & Kramer, 1999). Estudos neuroquímicos têm mostrado mudanças na quantidade de SP em distintas regiões do cérebro em resposta a estímulos estressantes e tanto o aumento quanto a diminuição da concentração de SP têm sido relatados. Ratos imobilizados e posteriormente colocados em gaiolas isoladas mostraram um aumento nas fibras imunoreativas à SP na substância cinzenta periaquedutal dorsal (Brodin *et al.*, 1994; Rosen *et al.*, 1992). Aumentos na concentração de SP foram encontrados no septo e no hipocampo após o animal ter sido submetido a uma sessão de 60 minutos de choque nas patas (Siegel *et al.*, 1984). Takamaya e colaboradores (1986) demonstraram haver uma diminuição na quantidade de SP no septo, hipocampo e corpo estriado de ratos submetidos ao estresse de imobilização. Estes estudos têm sugerido que a SP presente nas vias cerebrais envolvidas com processos de defesa são ativadas pelo estresse e, deste modo, o bloqueio farmacológico dos receptores NK<sub>1</sub> poderia fornecer uma nova ferramenta para o tratamento de distúrbios da ansiedade e depressão (Rupniak *et al.*, 2000).

Outro estudo demonstrou que um antagonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub>, administrado no ventrículo lateral, é capaz de atenuar a expressão de *c-fos* no locus cerúleo de ratos submetidos ao estresse por imobilização. Este estudo sugere que a substância P está envolvida nas respostas centrais ao estresse e que o receptor NK<sub>1</sub> pode mediar efeitos terapêuticos em casos de distúrbios psiquiátricos relacionados às situações estressantes, como a ansiedade e a depressão (Hahn & Bannon, 1999).

Existem evidências pré-clínicas sugerindo que a SP é liberada no sistema nervoso central após um estímulo aversivo ou traumático, como demonstrado por Kramer e colaboradores (1998), que observaram a liberação de SP no núcleo basolateral da amígdala após o estresse de separação neonatal. Muitos pacientes que sofrem de depressão ou ansiedade relatam histórias de traumas na infância ou na fase adulta (Miller *et al.*, 1996). Deste modo, a substância P poderia contribuir para, ou ser a fonte da ansiedade e do medo que acompanham estes distúrbios psiquiátricos.

Fuxe (1981) sugere que a substância P possa estar envolvida no mecanismo de ação das drogas antidepressivas, visto que o tratamento subcrônico (14 dias) com drogas bloqueadoras seletivas da recaptação de serotonina, altera os níveis de neurocininas no cérebro e medula espinhal de ratos. Somado a isso, existem estudos mostrando que a administração de drogas ansiolíticas e antidepressivas poderia causar uma diminuição da biossíntese de substância P (Brodin *et al.*, 1994; Shirayama *et al.*, 1996).

Semelhante ao que ocorre com drogas de perfil ansiolítico e antidepressivo, a infusão de antagonistas do receptor NK<sub>1</sub> (CP-99,994 e GR205171) promoveu a redução da vocalização dos filhotes no teste de avaliação da resposta de cobaias neonatos separados de suas mães (Rupniak *et al.*, 2000). Além disso, em 1998, um estudo duplo-cego foi conduzido para avaliar a segurança e

a eficácia do MK 869, um antagonista do receptor NK<sub>1</sub>, biodisponível oralmente, em pacientes com depressão maior e com moderados níveis de ansiedade. Os efeitos do MK 869 foram comparados com a paroxetina e placebo. Este estudo confirmou o efeito antidepressivo deste antagonista NK<sub>1</sub> e também demonstrou um efeito ansiolítico nesta população de pacientes depressivos (Kramer *et al.*, 1998).

Em 1986, Elliott e Iversen observaram que a injeção de substância P intracerebroventricular ou na área tegmental ventral do mesencéfalo de ratos causava um aumento na atividade locomotora, no comportamento de “sacudir de cachorro molhado” (*wet-dog shake*) e de auto-limpeza. Almay e colaboradores (1988) compararam a quantidade de SP no líquido cefalorraquidiano de pacientes com dor crônica e de voluntários saudáveis e encontraram uma relação inversa entre a intensidade de ansiedade relatada pelos pacientes e o nível de substância P, o que sugere que a substância P poderia ser ansiolítica.

Em 1996, Teixeira e colaboradores mostraram que a injeção central de SP e SP-metil éster, ambos agonistas do receptor NK<sub>1</sub>, promove um efeito do tipo ansiogênico em camundongos avaliados no LCE (Teixeira *et al.*, 1996). Por outro lado, o bloqueio seletivo dos receptores NK<sub>1</sub>, através da administração central de FK 888, produziu uma ação do tipo ansiolítica no teste do LCE (Teixeira *et al.*, 1996). A este respeito, o CGP 49823, outro antagonista do receptor NK<sub>1</sub>, mostrou um efeito do tipo ansiolítico no teste de interação social em ratos (File, 1997).

Do mesmo modo, a administração central de agonistas (NKA e  $\beta$ -Ala<sup>8</sup>-NKA) e do antagonista (SR 48968) seletivos para o receptor NK<sub>2</sub> resulta em efeitos do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, no LCE em camundongos (Teixeira *et al.*, 1996). Outros estudos, mostraram que o tratamento sistêmico ou central de antagonistas do receptor NK<sub>2</sub> (GR 100679,

SR 48969, GR 159897) reduz os comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos experimentais (teste de interação social, caixa claro-escuro, LCE) em camundongos (Bernatzky & Saria, 1995; Stratton *et al.*, 1993; Stratton *et al.*, 1994), reforçando a hipótese de que o sistema taquicinérgico desempenha um papel modulatório nos estados de ansiedade experimental.

O senktide, um agonista seletivo NK<sub>3</sub>, por sua vez, produz um aumento na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, característico de uma ação do tipo ansiolítica, enquanto que o tratamento central com um antagonista do receptor NK<sub>3</sub>, [Trp<sup>7</sup> β-Ala<sup>8</sup>]NKA, por outro lado, produziu um efeito do tipo ansiogênico no LCE (Ribeiro *et al.*, 1999).

Estudos recentes vêm demonstrando que o fragmento C-terminal da SP, mas não o N-terminal, quando injetado no ventrículo lateral e na substância cinzenta periaquedutal dorsal produz efeitos comportamentais aversivos semelhante ao que ocorre com a molécula íntegra nos ratos testados no LCE (De Araújo *et al.*, 1998; De Araújo *et al.*, 1999; De Lima & Silveira, 2000).

Por outro lado, Hasenöhrle e colaboradores (1998) observaram que a injeção de SP no núcleo *basalis* da região magnocelular produz efeitos do tipo ansiolítico em ratos avaliados no teste do LCE e da interação social. A administração periférica do antagonista NK<sub>1</sub>, o WIN 51708, atenua a resposta ansiolítica produzida pela injeção de SP no núcleo *basalis* (Nikolaus *et al.*, 1999). Estes estudos vêm demonstrando que as neurocininas modulam diversas funções no SNC, inclusive as reações de medo, dependendo do local da injeção e da dose utilizada, podendo produzir tanto efeitos ansiolíticos como ansiogênicos.

## BASES NEUROANATÔMICAS DA ANSIEDADE

### **Comportamento defensivo X Ansiedade**

Tanto a ansiedade como uma emoção correlata, o medo, são processos fisiológicos que envolvem um estado emocional de grande valor adaptativo, pois, além de detectar o perigo, são capazes de produzir respostas relacionadas com o comportamento de defesa (Le Doux, 1996). Admite-se que a principal distinção entre o medo e a ansiedade reside nas características dos estímulos ou das situações pelas quais estes estados emocionais são desencadeados. Enquanto o medo seria desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo e ameaça, a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Blanchard *et al.*, 1990; Brain *et al.*, 1991). É importante ressaltar que, embora distintos sob os aspectos mencionados acima, o medo e a ansiedade podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns para estes estados emocionais (Zangrossi Jr., 1998).

De uma perspectiva evolutiva, as bases neurais dos estados de ansiedade teriam relação com os mecanismos reguladores do comportamento de defesa dos animais diante de estímulos ameaçadores ou em situações de perigo (Panksepp, 1990). Por isso, os estudos com animais utilizando lesão, estimulação elétrica ou química do sistema nervoso central contribuíram muito para a identificação de algumas estruturas e sistemas neurais envolvidos com a ansiedade. Embora os modelos animais não tenham como ampliar de maneira direta o entendimento das bases neurais do componente subjetivo da ansiedade normal ou patológica, eles contribuem para desvendar a participação de estruturas e vias envolvidas nos componentes avaliativo e expressivo da ansiedade (Pratt, 1992).

De extrema importância no estudo da ansiedade é a grande variedade de distúrbios ansiosos que podem ser clinicamente diferenciados pela sintomatologia ou pela resposta terapêutica (Rodgers & Cole, 1994). Dificultando ainda mais o panorama já existente, várias evidências sugerem que diferentes modelos animais podem induzir diferentes tipos de ansiedade e que nem sempre está claro o tipo de distúrbio ansioso desencadeado pelo modelo usado (Lister, 1990).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo animal que representa o paradigma da resposta não-condicionada a ambientes potencialmente ameaçadores. Este modelo deriva do trabalho de Montgomery (1955) sobre a relação entre o medo e a motivação exploratória em ratos e baseia-se na seguinte premissa: um ambiente novo pode gerar tanto curiosidade quanto medo, portanto, pode criar um típico conflito aproximação-esquiva. O LCE consiste de quatro braços, dois braços abertos opostos à dois braços fechados, elevados do chão. A esquiva dos braços abertos é concordante com a idéia que estas áreas evocam uma reação de medo maior que a provocada pelos braços fechados (Handley & Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985), porém todos os braços do labirinto provavelmente induzem medo, visto que são ambientes desconhecidos. O efeito aversivo ou estressante da exposição ao LCE é percebido pelo aumento dos níveis de corticosterona plasmática, principalmente em animais confinados nos braços abertos (Calvo *et al.*, 1998; Copland & Balfour, 1987; File *et al.*, 1988; File *et al.*, 1994; Holmes *et al.*, 1998).

O LCE tem sido uma ótima ferramenta na avaliação dos efeitos ansiosseletivos de muitas drogas (File, 1992; Handley & MacBlane, 1993; Rodgers & Cole, 1994; Russo *et al.*, 1992). Além disso, a detecção imunohistoquímica da proteína *c-fos* em animais expostos ao LCE evidencia o envolvimento de estruturas cerebrais responsáveis pela mediação das reações de defesa no processamento da informação advinda da exploração do LCE (Silveira *et al.*, 1993).

## **Amígdala**

Em 1939, Heinrich Klüver e Paul Bucy estudaram o efeito da lesão do lobo temporal em macacos e perceberam que estes animais não exibiam reações de medo ou raiva, possuíam sim uma tendência a examinar os objetos com a boca e apresentavam um comportamento sexual exacerbado. Este conjunto de sintomas foi denominado de “psychic blindness” (ou síndrome de Klüver e Bucy), devido a incapacidade dos animais de entender o significado emocional de um estímulo aversivo (Klüver & Bucy, 1939). Estudos subseqüentes mostraram que a lesão da amígdala foi a responsável pelo déficit emocional causado nos macacos (Horel *et al.*, 1975; Weiskrantz, 1956).

A estimulação elétrica da amígdala produz reações de defesa e medo, por alterar a atividade autonômica e os comportamentos de orientação, habituação e exploração do animal (Isaacson, 1982). Em humanos, a mais comum emoção seguida após a estimulação da amígdala é o medo, acompanhado de manifestações autonômicas, como dilatação das pupilas, liberação de adrenalina e aumento dos batimentos cardíacos (Chapman *et al.*, 1954; Kuhar, 1986).

O medo pode ser expresso como uma reação aprendida a um estímulo que prediz uma situação de perigo (medo condicionado) ou como uma reação inata a um estímulo com propriedades intrínsecas que geram medo (medo incondicionado). Nos últimos anos, muitas pesquisas neurobiológicas sobre medo e ansiedade têm apontado a amígdala como uma estrutura crítica para a aquisição e expressão do medo condicionado (Davis, 1992; Graeff, 1994; Lavond, *et al.*, 1993; LeDoux, 1995; Maren & Fanselow, 1996). Lesões da amígdala extinguem vários comportamentos relacionados com o medo condicionado (para revisão ver Fendt & Fanselow, 1999).

A amígdala possui um complexo circuito neuroquímico, que envolve a participação da acetilcolina, dopamina, serotonina, noradrenalina, GABA (Alheid *et al.*, 1995) e neuropeptídeos, tais como a substância P, que possui um papel modulatório neste sistema (Roberts *et al.*, 1982).

Um estudo utilizando o registro de *patch-clamp* revelou que a SP aumenta a transmissão sináptica na amígdala, incrementando, particularmente, as correntes inibitórias pós-sinápticas (Suzuki & Konishi, 1999). Além disso, injeção de SP no núcleo basolateral da amígdala produz um efeito do tipo ansiogênico em ratos avaliados no LCE (De Lima & Ribeiro, 1996). Em gatos, a via contendo SP, que sai do núcleo medial da amígdala para o núcleo medial do hipotálamo, possui um papel importante na expressão do comportamento de defesa destes animais (Shaikh & Siegel, 1994). Estes dados reforçam o envolvimento da amígdala na mediação da resposta de defesa induzida pelo tratamento com substância P.

### **Substância cinzenta periaquedutal**

Nos últimos anos, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) tem sido relacionada a cinco grandes funções que incluem: regulação autonômica, vocalização, emoções relacionadas a medo e ansiedade, lordose reflexa característica do ato sexual, além de processamento e modulação da dor (Behbehani, 1995).

Devido às conexões recíprocas entre a SCP e o sistema límbico prosencefálico, a SCP foi postulada como pertencente à chamada área límbica mesencefálica (Nauta, 1958). A SCP é considerada um complexo neuroanatômico, pois é composta por várias sub-regiões capazes de controlar diferentes aspectos da resposta defensiva. Em ratos, a estimulação da SCP evoca a expressão de medo e aversão, que inclui agressão e reações de defesa, acompanhadas de mudanças autonômicas, tais como taquicardia, hiperventilação, aumento da pressão e do fluxo

sangüíneo para a musculatura esquelética (Olds & Olds, 1963). Similarmente, a estimulação da SCP em humanos produz sensação de medo/ansiedade, bem como mudanças autonômicas similares às descritas em animais (Nashold *et al.*, 1969).

Concentrações significantes de SP têm sido encontradas nas porções ventral e dorsal da SCP (Cuello & Kanazawa, 1978; Li *et al.*, 1990; Ljungdahl *et al.*, 1978) e um estudo recente utilizando anticorpo policlonal mostrou que a região dorsal da SCP possui a maior densidade de corpos celulares e dendritos imunorreativos à SP (Barbaresi, 1998). Estes dados colaboram com a idéia de que este área possui um sistema taquicinérgico desenvolvido para efetuar ou organizar reações de defesa (De Araújo *et al.*, 1999).

Estudos têm demonstrado que ratos expostos a eventos aversivos, tais como imobilização, injeção subcutânea, isolamento ou choque nas patas exibem um aumento nos níveis de substância P em várias áreas do sistema límbico, incluindo a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd; Brodin *et al.*, 1994; Rosén *et al.*, 1992). Além disso, a microinjeção de SP na SCPd produz aversão condicionada (Aguiar & Brandão, 1994; Elliott, 1988) e efeito do tipo ansiogênico no LCE tanto quanto a injeção intrecerebroventricular de SP (Aguiar & Brandão, 1996). Estas evidências sugerem que as reações aversivas são expressas pela SCPd, visto que esta área está envolvida na produção do medo (Bandler & Depaulis, 1991).

### **Área septal**

A área septal é conhecida por estar relacionada à modulação do comportamento defensivo de raiva e lesões nesta área têm sido classicamente associadas com um estado de hiperdefesa chamado de “raiva septal”. Alberts e Chew (1980) descreveram este comportamento, principalmente depois de estudarem lesões envolvendo a porção rostrolateral da área septal que

envia fibras para o circuito hipotalâmico medial envolvido com a iniciação das respostas de defesa em um ambiente de perigo (Canteras *et al.*, 1997; Risold & Swanson, 1997a /b).

A área septal é vista como uma interface entre regiões límbicas telencefálicas, associadas com cognição e motivação, e regiões hipotalâmicas e áreas do tronco cerebral, relacionadas com funções autonômicas e endócrinas (para revisão ver Paxinos, 1995). Estas conexões sugerem que a área septal possui um envolvimento direto na expressão da ansiedade (Thomas, 1988).

Estudos utilizando lesão, estimulação e registro de atividade unitária sugerem um papel importante para este núcleo na inibição do medo. A aquisição de comportamentos que dependem da redução do medo são prejudicados em animais com lesão septal, tal como o comportamento de esquiva. Animais lesionados septalmente mostram um déficit na aquisição da esquiva passiva e ativa (Gray & McNaughton, 1983) e um aumento dos níveis de ansiedade no teste da interação social (Clarke & File, 1982). A estimulação da área septal produz reações parassimpáticas (Kaada, 1951) e inibe as respostas aversivas produzidas pela estimulação de outras estruturas do cérebro. Gatos submetidos a estimulação do hipotálamo em regiões que causam aversão, aprendem a auto-estimular a área septal, extinguindo a reação aversiva (Thomas & Evans, 1983).

Por outro lado, Treit e colaboradores (1993) estudaram o efeito da lesão na porção mais posterior da área septal lateral e medial e observaram uma redução dos níveis de ansiedade em modelos animais etologicamente fundamentados, como no teste do labirinto em cruz elevado e, também, em modelos clássicos que envolvem uma situação conflitante para o animal, como no teste da ocultação defensiva condicionada (Menard & Treit, 1996; Treit & Menard, 1997). Somado à isso, o registro da atividade da área septal mostra que as células no septo medial aumentam a razão de disparo na presença de estímulos que indicam uma situação aversiva

(Thomas *et al.*, 1991), enquanto que a razão de disparo das células do septo lateral aumenta na presença de estímulos que reduzem o estado de medo e é suprimida durante os períodos associados com a elevação do medo (Yadin & Thomas, 1981). Estes dados contribuem com a hipótese de que o septo lateral possui um papel importante no alívio da ansiedade.

Na área septal há numerosos corpos celulares GABAérgicos e colinérgicos (Costa *et al.*, 1983), de aminoácidos excitatórios e mais de dez peptídeos têm sido detectados, entre eles a substância P (Palkovits, 1984). Dentre as regiões cerebrais que geram reações aversivas, o septo lateral contém uma das maiores densidades de inervações de SP (Otsuka e Yoshioka, 1993). Além disso, a área septal possui expressão significativa dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> (Yip & Chahl, 1999; Otsuka & Yoshioka, 1993; Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996). Estes estudos colaboram com a idéia de que este área possui um sistema taquicinérgico envolvido na expressão das reações de defesa.

É importante, no entanto, ressaltar que o substrato neural envolvido na ação ansiogênica da substância P ainda não é conhecido, mas as várias evidências até aqui apresentadas sugerem que este peptídeo poderia agir diretamente nas vias neuronais envolvidas com a expressão das emoções, visto que corpos celulares contendo SP, assim como, receptores taquicinérgicos são expressos amplamente no septo lateral, na substância cinzenta periaquedutal dorsal e na amígdala. A partir dessa hipótese propusemos o trabalho aqui apresentado de avaliar o substrato neuroanatômico envolvido no efeito ansiogênico da substância P em ratos.

OBJETIVOS

## OBJETIVOS

### Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o substrato neuroanatômico responsável pelo efeito ansiogênico da substância P em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado. Além disso, este trabalho se propôs a avaliar o envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> nesta resposta induzida pela administração central de substância P.

### Específicos

Para que objetivo geral fosse atingido, tornou-se necessário estabelecer alguns objetivos intermediários como:

→ Caracterizar a ação ansiogênica da substância P injetada centralmente em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado;

→ Verificar uma possível ação ansiogênica da SP em regiões do sistema límbico, como núcleo basolateral da amígdala, substância cinzenta periaquedutal e área septal lateral, sabidamente envolvidas com respostas comportamentais;

→ Estudar o envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> na área de maior relevância para o efeito ansiogênico induzido pela substância P.

# MATERIAL E MÉTODOS

## MATERIAL E MÉTODOS

### Considerações éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais delineados de maneira tal que o sofrimento dos animais utilizados fosse minimizado. Em adição, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com os procedimentos éticos estabelecidos na Assembléia Geral da SBNeC, Caxambu (1992).

### Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 280 e 320 g (cerca de 3 meses de idade). Os animais foram criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos, após o desmame, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. A temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7:00 h) foram controlados automaticamente, tanto no Biotério, como no Laboratório de Neurofarmacologia, onde os animais permaneceram por uma semana antes de qualquer manipulação experimental. Os ratos foram alojados em caixas de plástico forradas com serragem e tiveram livre acesso à água e à ração, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimentais ( $n=7-8/\text{grupo}$ ) foram escolhidos aleatoriamente, sendo que cada animal foi utilizado somente uma vez.

### Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

1. Por via intra-peritoneal (i.p.):

**Tiopental sódico**, Thionembatal ®, ABBOTT Laboratories (Illinois, EUA).

**Hidrato de Cloral**, Merck (Darmstadt, Alemanha).

2. Para a administração central:

**PBS** (“**physiological buffer solution**”), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), usado como solução controle: NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM.

**Substância P** (SP= **H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln- Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>**), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), neurocinina endógena com ação preferencial nos receptores NK<sub>1</sub> (Chang *et al.*, 1971).

**FK 888** {(4R)- 4-hidróxi- 1- [1-metil-1 H-indol-3 I] carbonil-propil] –L-N-benzil-N-metil-3-2-(2-naftil)-L-alaninamida}, gentilmente doado por Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão), antagonista seletivo dos receptores NK<sub>1</sub> (Fuji *et al.*, 1992).

**SR 48968** {(S) - N - metil - N- 4 [ 4-acetilamino- 4-fenilpiperidina- 2-( 3,4-ciclorofenil) butil] benzamida}, gentilmente doado por Sanofi Recherche (Montpellier, França), antagonista seletivo do receptor neurocinérgico NK<sub>2</sub> (Edmonds-Alt *et al.*, 1992).

A substância P foi preparada como solução estoque (1 mM), em solução de fosfato tamponada (PBS) e o FK 888 e o SR 48968 foram dissolvidos em etanol na concentração de 1 mM e estocados todos a – 20 °C em tubos de Eppendorf siliconizados. Essas drogas foram, posteriormente, diluídas em PBS, nas concentrações adequadas na hora do uso. É importante ressaltar que a solução controle dos antagonistas neurocinérgicos foi preparada com 5 % de etanol, para desconsiderar qualquer interferência do solvente do FK 888 e do SR 48968 na avaliação experimental.

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

### **Cirurgia Estereotáxica**

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (20 mg/kg, i.p.) e hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p.) e, após verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se à tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal. Os ratos foram imobilizados individualmente em um aparelho esterotáxico (Stöelting, mod.300, USA), realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então, uma solução de xilocaína com adrenalina 2% subcutaneamente, visando a formação de uma pápula, não só pelo seu efeito anestésico local, como também para orientar a retirada de uma pequena área ovalada de pele, para a abertura do campo cirúrgico. Em seguida realizou-se a raspagem do perióstio, deixando a calota craniana exposta. O crânio foi posicionado no aparelho esterotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados num mesmo plano horizontal. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma ou duas cânulas guias. Para o implante das cânulas foram obedecidas as coordenadas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986). Os animais foram canulados nas seguintes áreas:

1. ventrículo lateral (0,8 mm posterior ao bregma; 1,5 mm lateral e 2,5 mm abaixo da superfície do crânio);
2. área septal lateral (0,2 mm anterior ao bregma; 1,0 mm lateral e 3,8 mm abaixo da superfície do crânio);
3. substância cinzenta periaquedutal dorsal (7,6 mm posterior ao bregma; 1,9 mm lateral e 4,2 mm abaixo da superfície do crânio, em um ângulo de 22°);

4. núcleo basolateral da amígdala (2,8 mm posterior ao bregma; 5,0 mm lateral e 6,0 mm abaixo da superfície do crânio)

Uma vez adaptados os parafusos e as cânulas, a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico autopolimerizável (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). Decorridos alguns minutos para a secagem total do acrílico, foi colocado um mandril dentro da cânula-guia que só foi retirado no momento da infusão da droga.

Após a cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa para a recuperação, aquecida por uma lâmpada de 40 W, a fim de minorar a hipotermia, conseqüente à anestesia geral. Posteriormente, os animais foram colocados aos pares em gaiolas providas de água e comida, onde permaneceram por, em média, 5 dias até serem utilizados experimentalmente.

### **Cânulas**

As cânulas-guias implantadas, a fim de possibilitar as microinjeções intracerebrais, foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm (calibre 22 interno/28 externo). Com o auxílio de um paquímetro (General Hardware MFG. Inc., New York, EUA), as cânulas foram cortadas no comprimento de 16,5 mm. Um mandril, feito de fio de aço (nº 26), foi adaptado ao interior da cânula-guia para evitar a oclusão das mesmas.

### **Procedimentos para a administração central das drogas**

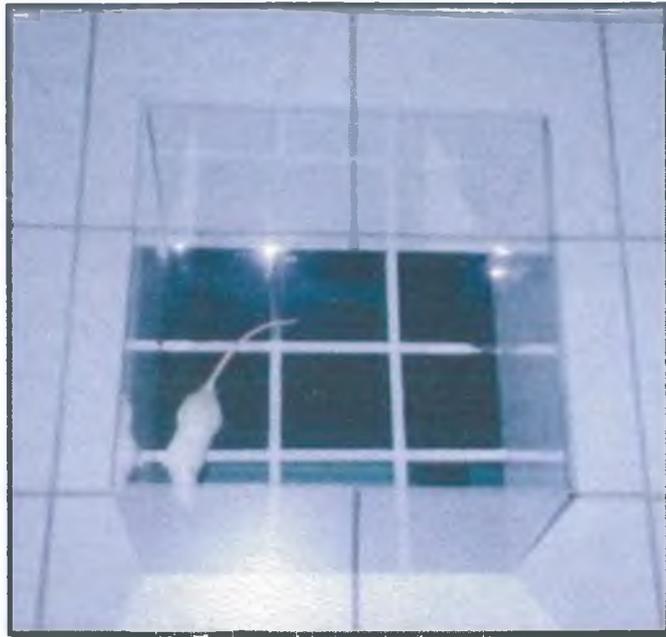
Os ratos foram imobilizados manualmente e, com um alicate, foi retirado o mandril adaptado à cânula-guia durante o ato cirúrgico. As drogas foram infundidas através de uma agulha injetora conectada por um tubo de polietileno (PE-10 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA), a uma micro-seringa de Hamilton 701 N (10 µl). As agulhas injetoras

utilizadas foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais odontológicas, sendo estas 1,0 mm maiores que a cânula-guia. Em cada animal foi injetado um volume de 2 µl das soluções, num período de 30 s. A agulha injetora permaneceu na cânula-guia por mais um período de 30s.

## **Equipamentos**

### *Arena*

Logo após a administração da droga, cada rato foi colocado, por 5 min, em uma arena (60 x 60 x 35 cm) dividida em 9 quadrados de 10 x 10 cm. O chão deste equipamento foi confeccionado em acrílico preto e as paredes em acrílico transparente (Figura 5), o experimento foi realizado sob luz vermelha de 15 W, o que permitiu o animal se habituar à pouca luminosidade. Foram avaliadas as seguintes respostas comportamentais: movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), número de comportamentos de levantar, comportamento de auto-limpeza e defecação.

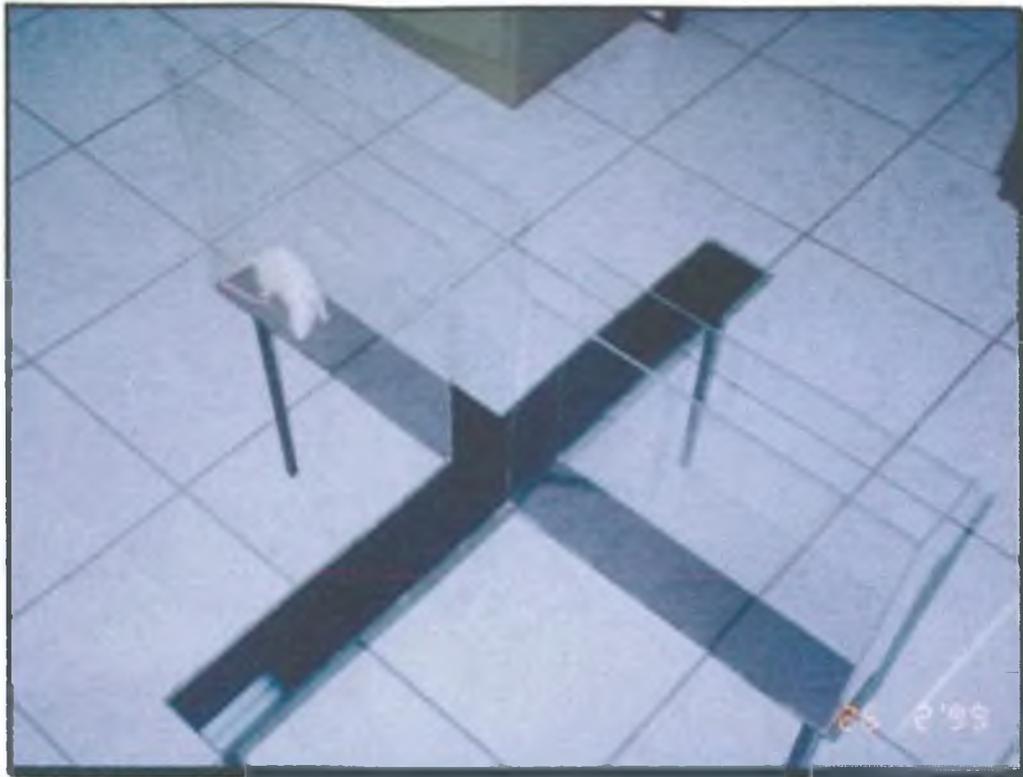


**Figura 5 – Arena para avaliação da atividade motora.**

#### *Labirinto em Cruz Elevado*

O teste comportamental utilizado para a avaliação da ansiedade experimental foi o labirinto em cruz elevado (LCE). Esse modelo foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) a partir do trabalho de Montgomery (1955). Posteriormente, Pellow e colaboradores (1985) forneceram validação comportamental, fisiológica e farmacológica do LCE para ratos.

O equipamento consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) opostos, em forma de cruz grega, elevado a 50 cm do chão. Os braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1 cm de altura) para evitar a queda dos animais. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). As paredes laterais foram confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto (Figura 6).



**Figura 6 – Labirinto em cruz elevado para avaliação da atividade ansiogênica/ansiolítica.**

Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do equipamento, sendo que o número de entradas nos braços fechados foram usados como medida da atividade locomotora (Rodgers *et al.*, 1995). A entrada em um dos braços foi considerada quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço. O número total de entradas foi obtido pela soma do número de entradas nos braços abertos e fechados. Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas e este índice multiplicado por 100 ( $[A/A + F] \times 100$ ). O percentual de tempo foi calculado de maneira semelhante: o tempo gasto nos braços abertos foi dividido pela somatória do tempo de permanência em ambos os braços e o quociente obtido foi multiplicado por 100 ( $[TA/TA + TF] \times 100$ ; Pellow *et al.*, 1985). Estes são os índices tradicionais de ansiedade, pois refletem o

medo induzido através da inibição das entradas nos braços abertos, que pode ser relatado como o nível de ansiedade experimentado pelo animal.

Foram também registrados no LCE medidas etológicas de avaliação, entre elas o número de comportamentos de auto-limpeza e de bolos fecais, como índice de emocionalidade (Archer, 1973) e, também, o número de imersões de cabeça e de estiramentos corporais, que são medidas do comportamento de avaliação de risco (Rodgers & Cole, 1994). Estudos recentes demonstraram haver uma correlação entre o número de estiramentos corporais e a elevação dos níveis de corticosterona plasmática no teste do labirinto em cruz elevado (Rodgers *et al.*, 1999), dado interessante pois relaciona este comportamento de avaliação de risco com a exposição a uma situação aversiva. Todos estes parâmetros foram registrados durante um período de 5 min após os diferentes tratamentos, como especificado adiante.

Os experimentos foram realizados entre 13:00 e 18:00 horas e, antecedendo os experimentos, os animais foram ambientalizados às condições experimentais em uma antesala do laboratório por um período de, no mínimo, 1 h. Os equipamentos utilizados para a avaliação experimental estavam localizados em uma sala com luz vermelha (15 W), com temperatura mantida em  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e, após o teste com cada animal, foram limpos com solução de etanol a 10 %.

As sessões experimentais foram gravadas por um VCR Philco PVC-4H10 conectado a uma câmera de vídeo localizada a 2 m do chão e, posteriormente, analisados. É importante ressaltar que o experimentador permanecia na sala durante a realização dos testes experimentais.

### *Rota-rod*

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do rota-rod, originalmente desenvolvido por Dunham & Miya (1957). O aparelho consiste em um cilindro horizontal de 12 cm de diâmetro, colocado a 45 cm de altura e girando, com auxílio de um motor elétrico, a 2 r.p.m. Os animais foram colocados no cilindro por 1 min e registrou-se o tempo de permanência no cilindro giratório (em segundos) e o número de quedas do aparelho.

### **Protocolo experimental**

O trabalho consistiu em duas etapas distintas, na **etapa A** foram verificados os efeitos da microinjeção de substância P em diferentes áreas do sistema límbico. Na **etapa B**, foram avaliados os efeitos da administração intracerebroventricular de substância P após à injeção de antagonistas neurocinérgicos na área septal lateral (FK 888 e SR 48968).

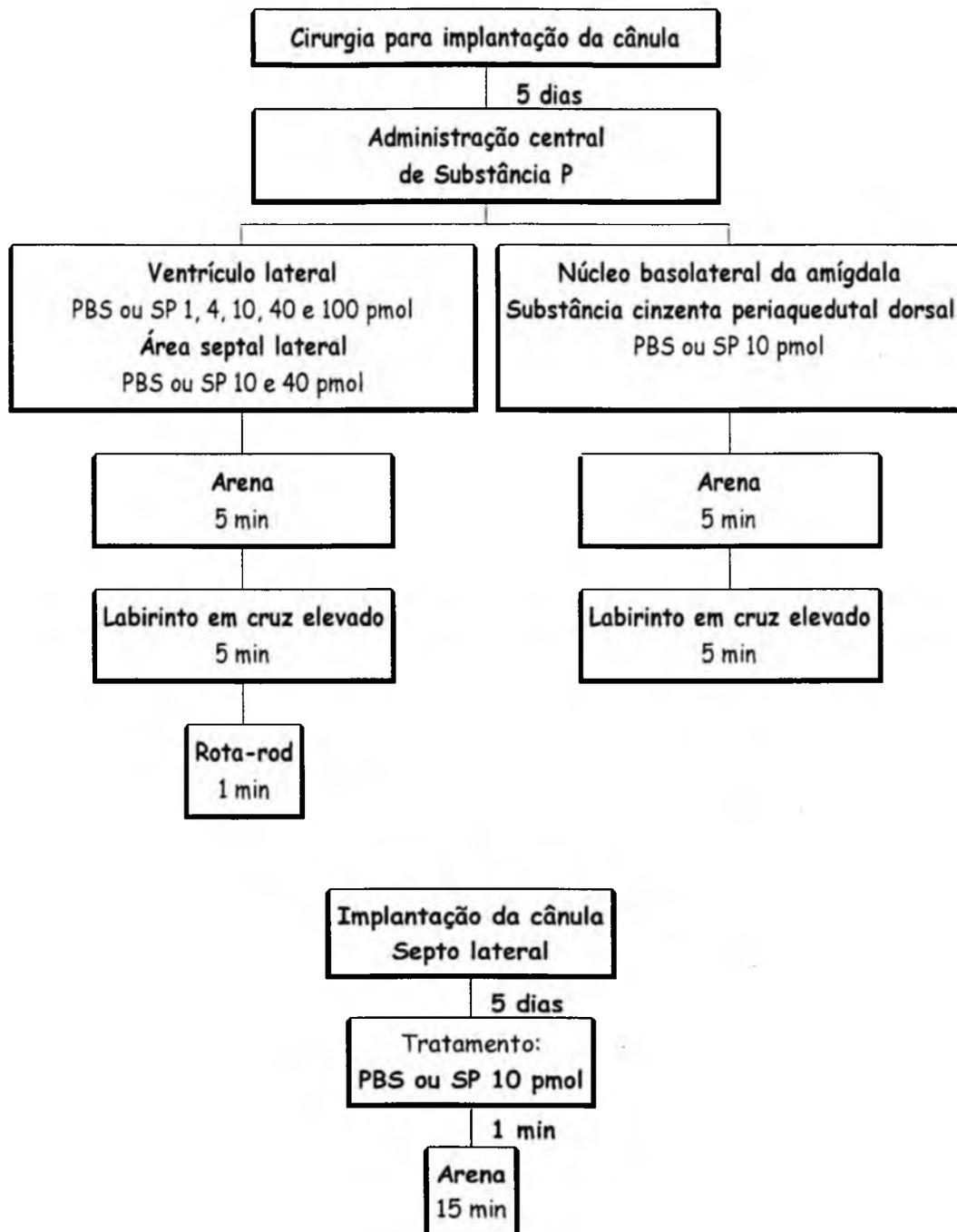
Na etapa A, no dia do teste, o animal era microinjetado ou com solução tamponada fisiológica (PBS) ou substância P nas doses de 1, 4, 10, 40 e 100 pmol no ventrículo lateral, afim de caracterizar o efeito da SP em ratos e caracterizar a dose capaz de produzir a melhor ação ansiogênica e, então, seguir com a análise das estruturas cerebrais envolvidas neste efeito induzido pela SP.

Os animais foram injetados com PBS ou SP 10 pmol na substância cinzenta periaquedutal dorsal e núcleo basolateral da amígdala. Na área septal lateral os animais foram tratados com PBS, SP 10 ou 40 pmol. A seguir, os animais foram colocados individualmente no centro da arena, onde foram observados por 5 min. Passado este tempo, foram transferidos para o centro do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e o comportamento era registrado por um período de 5 min, de acordo com os procedimentos descritos por Pellow e colaboradores (1985). Um outro grupo de animais tratados com PBS ou SP 10 pmol no septo lateral foi avaliado na arena por um período de 15 minutos.

Na etapa B, cada animal estava canulado no septo lateral e no ventrículo lateral. Desta forma, recebia uma microinjeção de PBS ou antagonista neurocinérgico, FK 888 ou SR 48968, ambos na dose de 100 pmol, no septo lateral e, após 5 min, era microinjetado PBS ou substância P 10 pmol no ventrículo lateral. Após 5 min, o animal era colocado no LCE e procedia-se como descrito anteriormente.

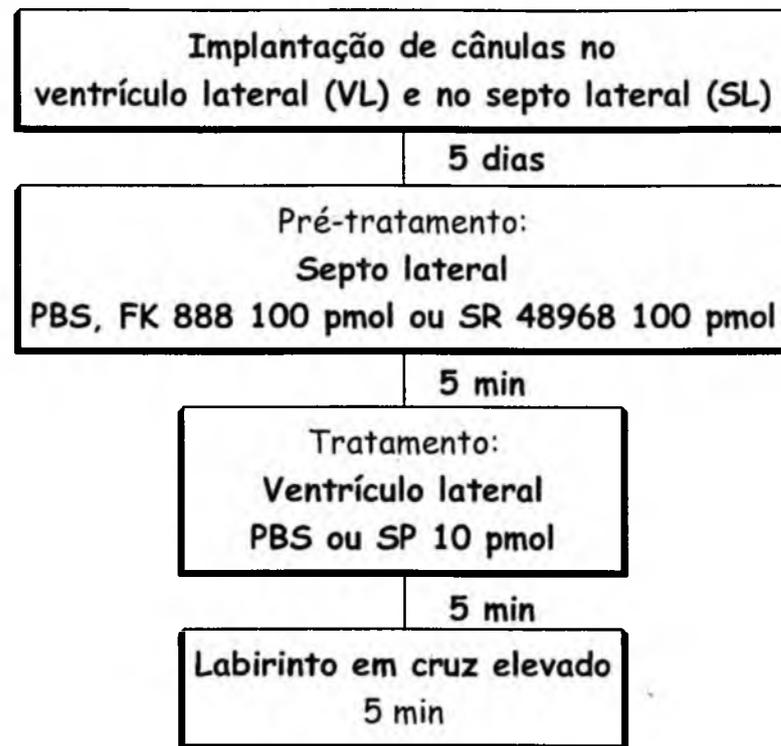
É importante ressaltar que os grupos experimentais e seus respectivos controles foram realizados em paralelo.

Os Esquemas 1 e 2 ilustram resumidamente os procedimentos experimentais das etapas A e B, respectivamente, realizadas neste trabalho.

**ESQUEMA 1****Procedimento experimental – Etapa A**

## ESQUEMA 2

## Procedimento experimental – Etapa B



## Histologia

Ao final dos procedimentos experimentais, todos os ratos foram anestesiados com éter e então perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl 0,9 %), seguido por solução de formaldeído (10 %). Posteriormente, os animais foram decapitados e receberam um microinjeção de solução de Azul de Evans (2  $\mu$ l). Os cérebros foram removidos imediatamente e fixados em uma solução de formalina 10 % - sacarose 20 %, sendo então congelados e cortados em fatias de 30  $\mu$ m no plano frontal. As fatias foram preparadas em lâminas e coradas com tionina. Os locais das injeções foram identificados em microscópio óptico, sem prévio conhecimento dos dados comportamentais. Todos os animais que não apresentaram a localização correta das cânulas foram descartados do estudo.

## Análise estatística

Os dados foram analisados pelo software Graphpad INSTAT<sup>®</sup> versão 2.05 e foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett, para a verificação da homogeneidade das variâncias. Na ocorrência de valores não homogêneos, os dados foram transformados pelo logaritmo ou foi utilizado um teste não-paramétrico, com o objetivo de homogeneizar a amostra.

O tratamento e a posição da cânula foram considerados como variáveis independentes. No caso de 3 ou mais amostras, os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (uma via) e, em seguida, ao teste de Bonferroni, porém no caso de apenas 2 amostras era utilizado o teste *t* de Student não-pareado bicaudal, conforme indicado na legenda das figuras. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) e o nível de significância estatística considerado foi  $P < 0,05$ .

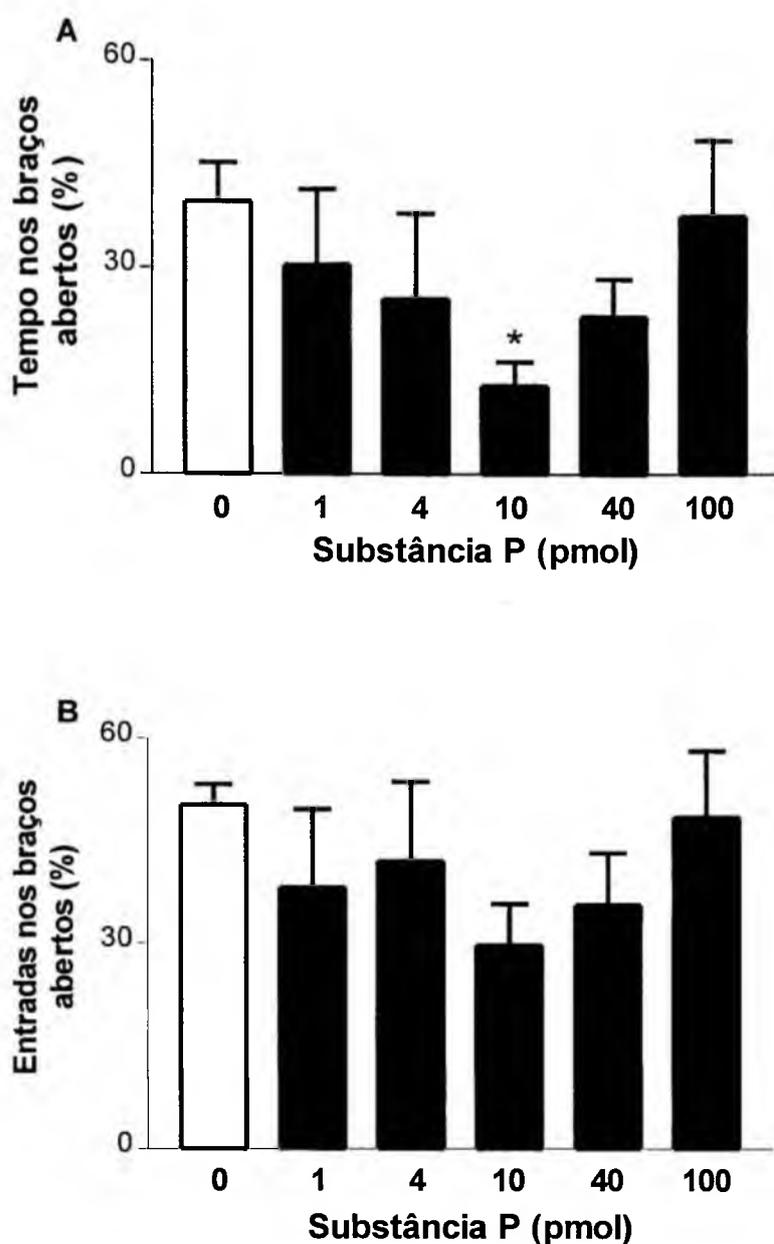
RESULTADOS

## RESULTADOS

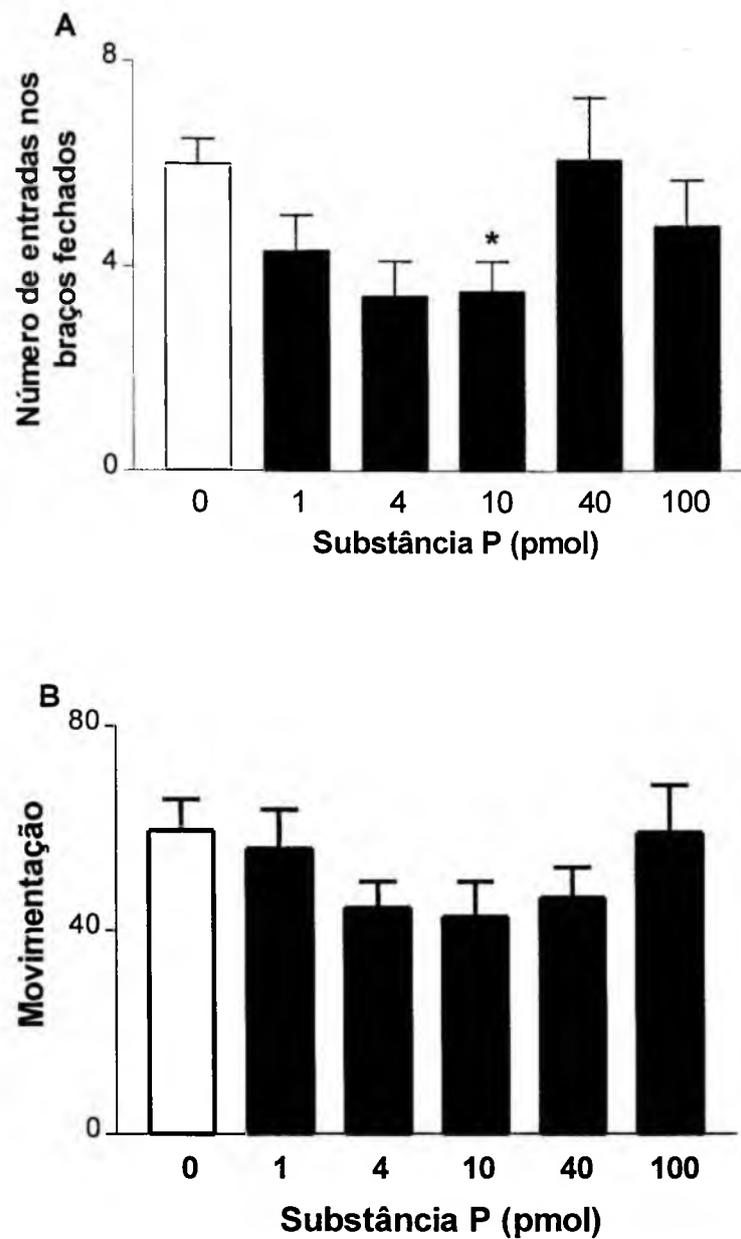
### 1. Caracterização do efeito ansiogênico da substância P administrada intracerebroventricular em ratos

Os efeitos da administração i.c.v. de substância P, um agonista fisiológico do receptor NK<sub>1</sub>, na arena, no labirinto em cruz elevado e rota-rod estão representados nas Figuras 7 e 8 e nas Tabelas 1 e 2.

O tratamento central com substância P na dose de 10 pmol reduziu o tempo de permanência nos braços abertos (Figura 7A;  $F_{(5,45)} = 2,57$ ;  $P < 0,05$ ), o número de entradas nos braços fechados (Figura 8A;  $F_{(5,45)} = 2,43$ ;  $P < 0,05$ ) e o número total de entradas (Tabela 1;  $F_{(5,45)} = 2,83$ ;  $P < 0,05$ ) no LCE, perfil semelhante às drogas com efeito ansiogênico. A porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE (Figura 7B;  $F_{(5,45)} = 1,35$ ;  $P > 0,05$ ) e a atividade locomotora avaliada na arena (Figura 8B;  $F_{(5,45)} = 1,15$ ;  $P > 0,05$ ), assim como os demais parâmetros registrados no teste do labirinto em cruz elevado, arena e rota-rod (Tabela 2) não foram modificados pela administração i.c.v. de SP.



**Figura 7** – Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de substância P no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8. (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P \leq 0,05$ )



**Figura 8** – Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de substância P no número de entradas nos braços fechados no LCE (A) e na atividade locomotora avaliada na arena (B) em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8. (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P \leq 0,05$ )

**Tabela 1** - Efeito do tratamento i.c.v. com SP em doses crescentes nos parâmetros registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Tratamento	Estiramento	Levantar	Auto-limpeza	Imersão de cabeça	Total de entradas
Controle	3,5 ± 0,8	11,5 ± 1,8	1,4 ± 0,5	9,2 ± 1,5	12,5 ± 1,4
SP 1 pmol	3,0 ± 0,7	10,0 ± 2,0	0,7 ± 0,3	6,4 ± 2,7	9,7 ± 2,8
SP 4 pmol	6,0 ± 2,3	7,2 ± 1,2	0,8 ± 0,4	4,2 ± 1,0	6,4 ± 1,4
SP 10 pmol	5,0 ± 1,8	6,2 ± 1,5	2,9 ± 1,1	4,6 ± 1,6	5,8 ± 1,2*
SP 40 pmol	6,2 ± 1,1	11,8 ± 1,3	1,7 ± 0,6	5,3 ± 1,3	9,8 ± 1,8
SP 100 pmol	4,4 ± 1,0	10,1 ± 1,8	0,4 ± 0,3	10,1 ± 2,3	11,0 ± 2,0

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni).

**Tabela 2** - Efeito do tratamento i.c.v. com SP em doses crescentes em alguns parâmetros registrados na arena e no teste do rota-rod.

Tratamento	ARENA		ROTA-ROD	
	Auto-limpeza	Levantar	Número de quedas	Tempo de permanência
Controle	3,8 ± 0,7	26,6 ± 3,4	1,8 ± 0,9	51,7 ± 4,2
SP 1 pmol	1,7 ± 0,3	20,6 ± 3,6	1,0 ± 1,0	55,0 ± 5,0
SP 4 pmol	2,2 ± 0,6	18,6 ± 5,8	2,6 ± 0,9	48,3 ± 2,0
SP 10 pmol	3,5 ± 0,6	18,8 ± 1,8	1,3 ± 0,3	53,3 ± 1,7
SP 40 pmol	5,0 ± 1,0	25,0 ± 2,9	2,3 ± 0,8	52,0 ± 2,8
SP 100 pmol	3,1 ± 1,0	22,1 ± 3,5	1,5 ± 0,4	56,2 ± 2,0

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni).

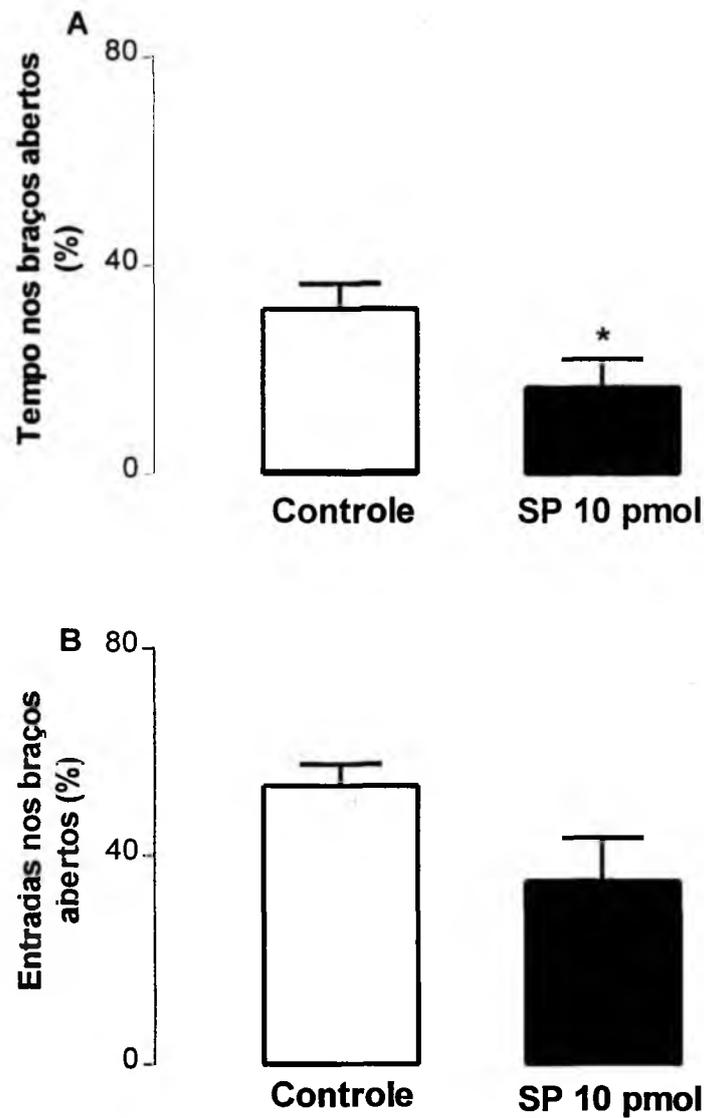
## 2. Efeito comportamental da substância P após a administração no núcleo basolateral da amígdala e na substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos

Os efeitos da administração de substância P no núcleo basolateral da amígdala e na substância cinzenta periaquedutal dorsal avaliados na arena e no labirinto em cruz elevado estão representados nas figuras 9, 10, 11 e 12 e nas tabelas 3 e 4.

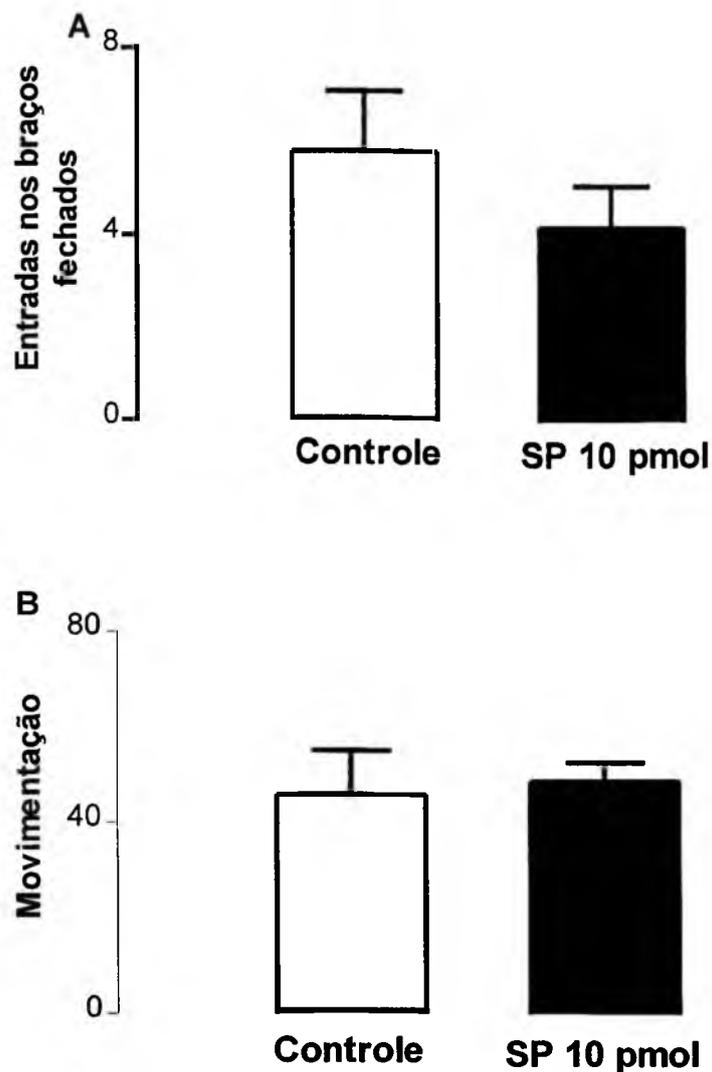
O tratamento com SP 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala reduziu o tempo de permanência nos braços abertos (Figura 9A;  $t_{14} = 1,89$ ;  $P < 0,05$ ) no LCE, indicando um perfil ansiogênico para a SP na amígdala. A porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 9B;  $U_{(6,10)} = 18,5$ ;  $P > 0,05$ ), o número de entradas nos braços fechados no LCE (Figura 10A;  $t_{14} = 1,07$ ;  $P > 0,05$ ) e a atividade locomotora avaliada na arena (Figura 10B;  $U_{(8,10)} = 39,0$ ;  $P > 0,05$ ) não foram modificados pela administração de SP no núcleo basolateral da amígdala.

Nas Tabelas 3 e 4 estão representados os parâmetros etológicos avaliados no LCE e na arena. A microinjeção de SP no núcleo basolateral da amígdala aumentou o número de comportamentos de auto-limpeza (Tabela 3;  $t_{14} = 3,33$ ;  $P < 0,05$ ), reduziu o número de imersões de cabeça (Tabela 3;  $t_{12} = 2,11$ ;  $P < 0,05$ ) no LCE, quando comparados aos dados obtidos no grupo controle. Na arena, o tratamento com SP na amígdala produziu um aumento no comportamento de auto-limpeza (Tabela 4;  $t_{16} = 1,83$ ;  $P < 0,05$ ), enquanto que os outros parâmetros comportamentais não foram alterados.

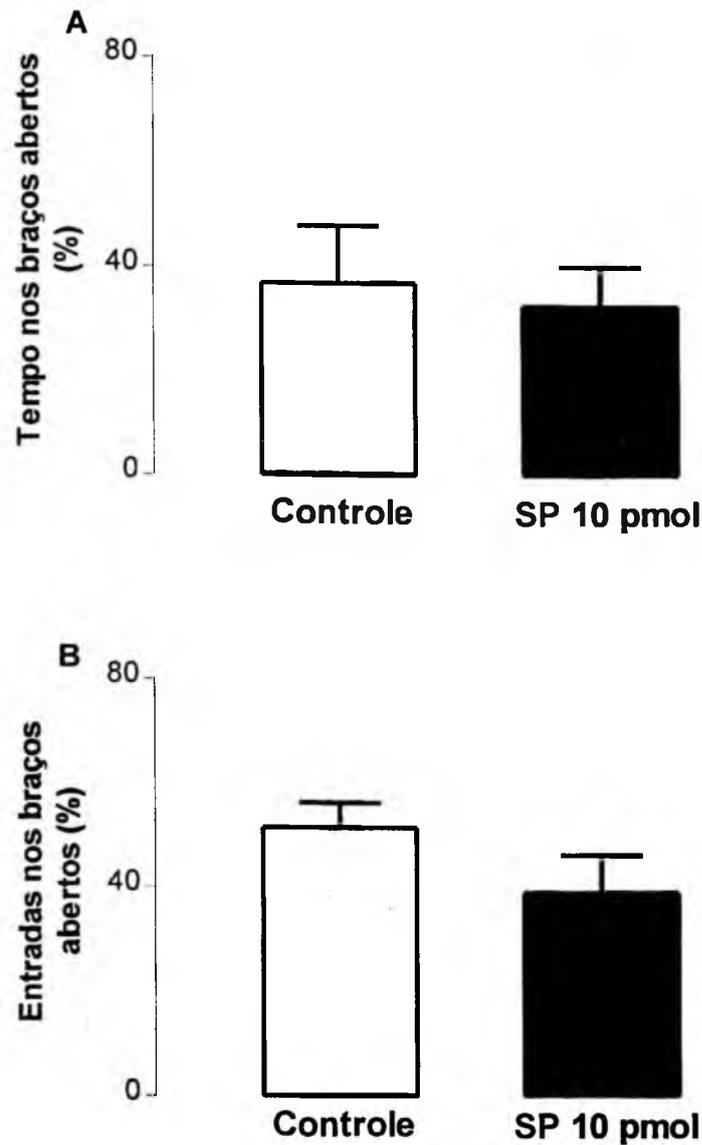
Por outro lado, a administração de SP na SCPd não modificou os parâmetros avaliados no LCE e na arena (Figuras 11 e 12 e Tabelas 3 e 4).



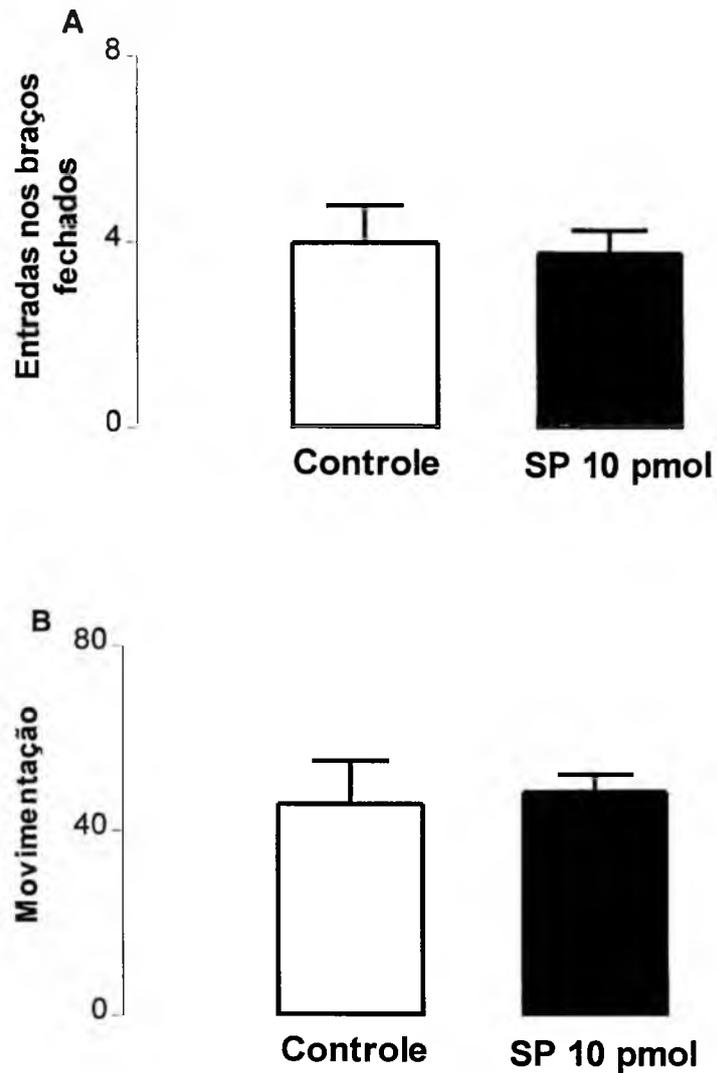
**Figura 9** – Efeito da injeção de substância P na dose de 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8. (A) teste *t* de Student não-pareado bicaudal, \*  $P < 0,05$  e (B) teste U de Mann Whitney bicaudal.



**Figura 10** – Efeito da injeção de substância P na dose de 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala no número de entradas nos braços fechados no LCE (A) e na atividade locomotora avaliada na arena (B) em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8. (A) teste *t* de Student não-pareado bicaudal e (B) teste U de Mann Whitney bicaudal.



**Figura 11** – Efeito da injeção de substância P na dose de 10 pmol na substância cinzenta periaquedutal dorsal no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8 (teste *t* de Student não-pareado bicaudal).



**Figura 12** – Efeito da injeção de substância P na dose de 10 pmol na substância cinzenta periaquedutal dorsal no número de entradas nos braços fechados no LCE (A) e na atividade locomotora avaliada na arena (B) em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8 (teste *t* de Student não-pareado bicaudal)

**Tabela 3** - Efeito do tratamento com SP 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala (BLA) e na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Local	Tratamento	Estiramento	Levantar	Auto-limpeza	Imersão de cabeça
BLA	Controle	2,3 ± 0,7	12,0 ± 2,6	1,0 ± 0,2	8,3 ± 2,0
BLA	SP 10 pmol	3,4 ± 0,7	7,9 ± 1,5	1,8 ± 0,5*	3,8 ± 1,1*
SCPd	Controle	3,7 ± 0,7	6,7 ± 1,8	0,6 ± 0,3	5,7 ± 1,0
SCPd	SP 10 pmol	2,7 ± 0,7	6,7 ± 1,0	1,2 ± 0,3	5,5 ± 1,0

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais (teste *t* de Student não-pareado bicaudal, \*  $P < 0,05$ ).

**Tabela 4** - Efeito do tratamento com SP 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala (BLA) e na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) nos parâmetros etológicos registrados na arena.

Local	Tratamento	Levantar	Auto-limpeza	Bolo fecal
BLA	Controle	19,5 ± 3,8	1,9 ± 0,7	2,0 ± 1,0
BLA	SP 10 pmol	23,0 ± 2,5	3,3 ± 0,4*	1,6 ± 0,5
SCPd	Controle	17,3 ± 4,5	1,4 ± 0,4	2,1 ± 1,1
SCPd	SP 10 pmol	18,4 ± 2,1	2,7 ± 0,5	1,1 ± 0,3

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais (teste *t* de Student não-pareado bicaudal, \*  $P < 0,05$ ).

### 3. Efeito comportamental da substância P após a administração na área septal lateral em ratos

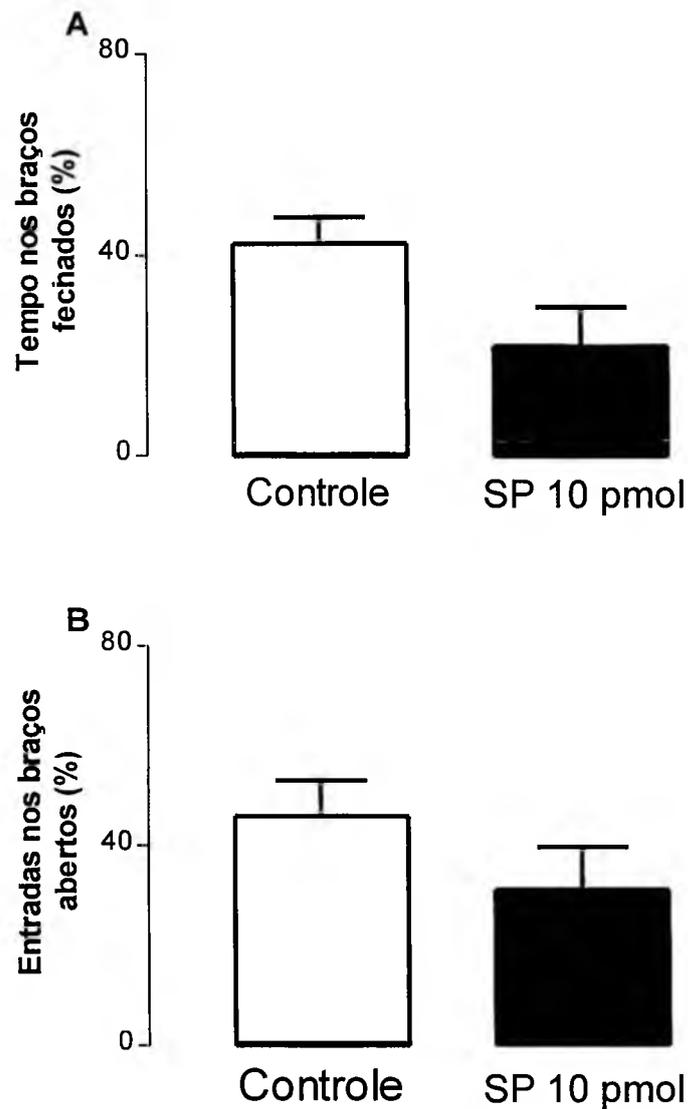
Os efeitos da administração de substância P na área septal lateral nos comportamentos avaliados na arena e no labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 13, 14 e 15 e nas Tabelas 5 e 6.

O tratamento com SP 10 pmol no septo lateral não produziu alterações significantes nos parâmetros avaliados no teste do LCE (Figura 13) e arena (dados não apresentados), mas observou-se que o comportamento desses animais tratados com SP 10 pmol no septo lateral eram respostas aversivas e se dividiam em dois grupos distintos, conhecidos na literatura como comportamento de “darting” e “freezing”. O comportamento de “freezing” foi caracterizado pela interrupção do comportamento exploratório, no qual o animal permaneceu tenso, imóvel, com piloereção e em estado de alerta, além de apresentar valores inferiores a 2 % do tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Por outro lado, a resposta de “darting” foi caracterizada por uma reação motora explosiva, associada ao comportamento de levantar, onde o animal pulava junto às paredes dos braços fechados em direção ao topo.

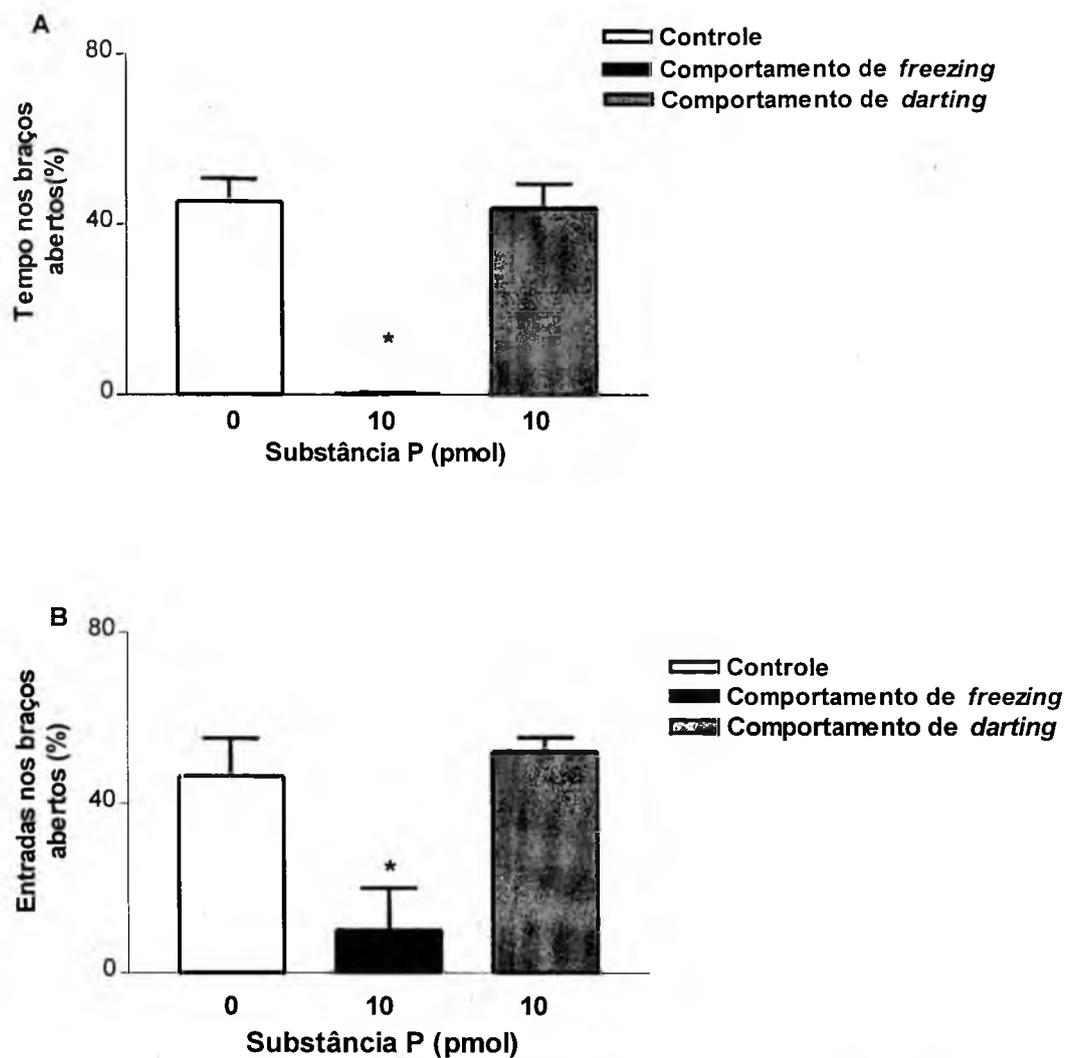
Foi encontrado que 50 % dos ratos apresentaram o comportamento de “freezing” após a administração de SP intra-septal, o que acarretou em uma redução significativa no tempo de permanência (Figura 13A;  $F_{(2,12)} = 30,96$ ;  $P < 0,05$ ), na porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 13B;  $F_{(2,12)} = 8,34$ ;  $P < 0,05$ ) e no número de entradas nos braços fechados (Figura 14A;  $F_{(2,12)} = 6,77$ ;  $P < 0,05$ ) no LCE, no entanto, sem prejuízo da atividade locomotora avaliada na arena (Figura 14B;  $F_{(2,12)} = 1,29$ ;  $P > 0,05$ ). Estes resultados mostram um perfil ansiogênico clássico para os animais que exibiram comportamento de “freezing” no LCE após a injeção de SP 10 pmol no septo lateral. No entanto, os animais tratados com SP 10 pmol no septo lateral que exibiram as respostas de “darting” não diferiram do grupo controle nos vários parâmetros comportamentais registrados no LCE.

Nas Tabelas 5 e 6 estão representados os parâmetros etológicos avaliados no LCE e na arena. A microinjeção de SP no septo lateral reduziu o número de imersões de cabeça nos animais que apresentaram comportamento de “freezing” no LCE (Tabela 5;  $F_{(2,12)} = 9,68$ ;  $P < 0,05$ ). Os outros parâmetros etológicos avaliados na arena e no LCE não sofreram alteração após a injeção de SP 10 pmol .

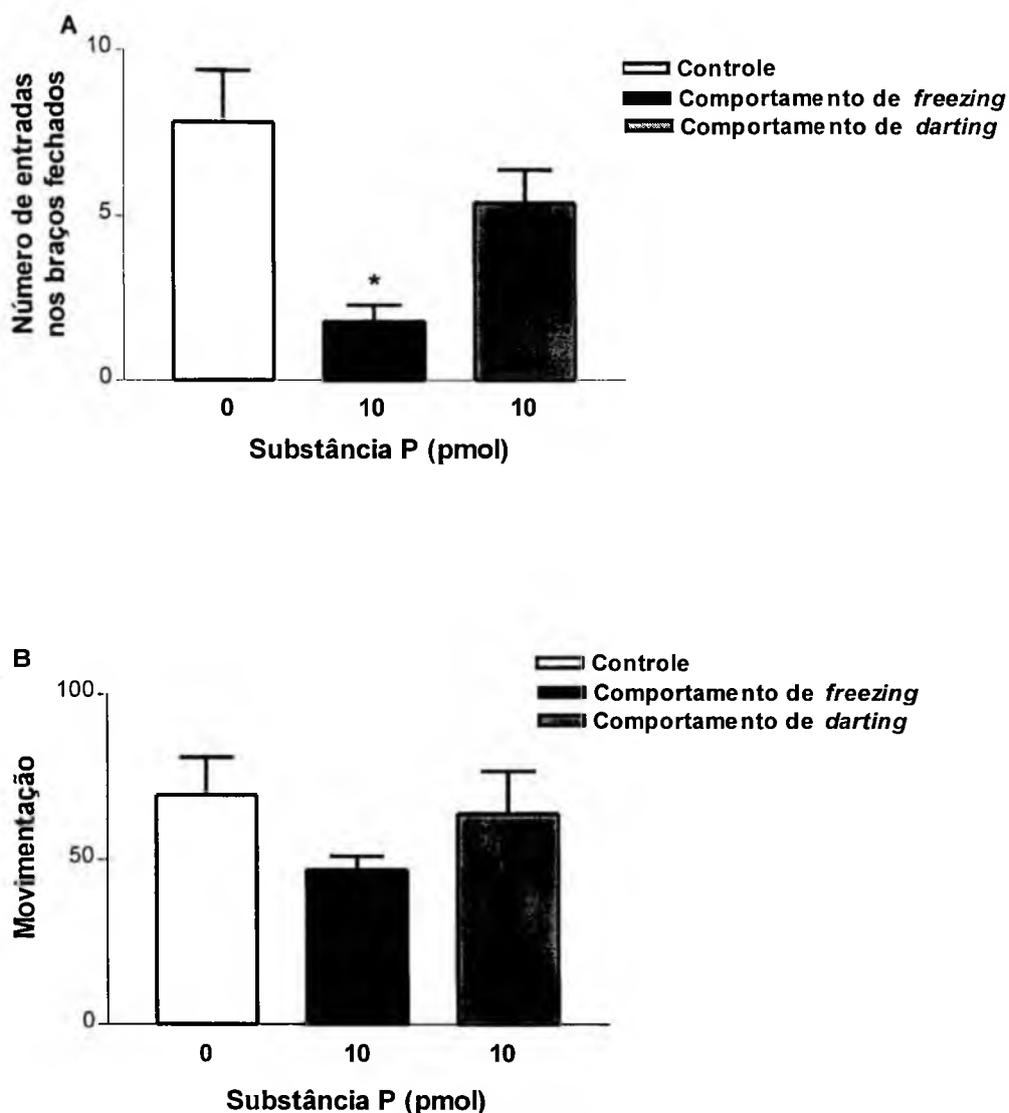
A fim de verificar o efeito de uma dose maior que 10 pmol de SP no septo lateral, animais foram tratados com SP 40 pmol e avaliados na arena e no LCE. A Figura 15 e as Tabelas 5 e 6 demonstram que o tratamento de SP 40 pmol na área septal não alterou os parâmetros avaliados na arena e no LCE.



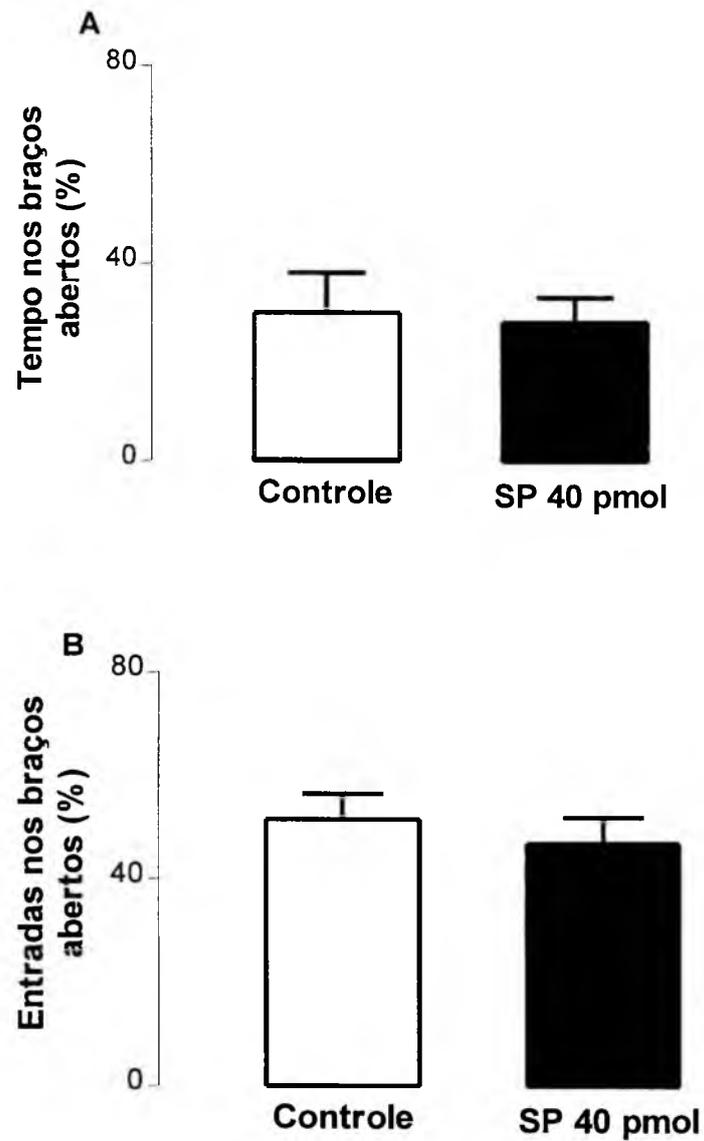
**Figura 13** – Efeito da injeção de substância P na dose de 10 pmol na área septal lateral no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 12 (teste *t* de Student não-pareado bicaudal).



**Figura 14** – Análise comportamental de animais tratados com SP 10 pmol na área septal lateral no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Com este tratamento é possível observar respostas comportamentais distintas (comportamentos de *freezing* e *darting*). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada grupo foi de 6 (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).



**Figura 15** - Análise comportamental de animais tratados com SP 10 pmol na área septal lateral no número de entradas nos braços fechados no LCE (A) e na atividade locomotora avaliada na arena (B) em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada grupo foi de 6 (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).



**Figura 16** – Efeito da injeção de substância P na dose de 40 pmol na área septal lateral no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8 (teste *t* de Student não-pareado bicaudal).

**Tabela 5** - Efeito do tratamento com SP 10 e 40 pmol na área septal lateral nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni ou teste *t* de Student não-pareado bicaudal, \*  $P \leq 0,05$ ).

Tratamento	Estiramento	Levantar	Auto-limpeza	Imersão de cabeça
Controle	4,0 $\pm$ 0,9	12,3 $\pm$ 2,0	1,3 $\pm$ 0,7	12,6 $\pm$ 2,1
SP 10 pmol <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,9	7,0 $\pm$ 1,9	1,4 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,9*
SP 10 pmol <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 0,5	8,8 $\pm$ 2,3	0,6 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 2,0
SP 40 pmol	2,3 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 1,2

a: animais tratados com SP que apresentaram comportamento de “freezing”

b: animais tratados com SP que apresentaram comportamento de “darting”

**Tabela 6** - Efeito do tratamento com SP 10 e 40 pmol na área septal lateral em alguns parâmetros registrados na arena e no teste do rota-rod. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni ou teste *t* de Student não-pareado bicaudal, \*  $P \leq 0,05$ ).

Tratamento	ARENA		ROTA-ROD	
	Auto-limpeza	Levantar	Número de quedas	Tempo de permanência
Controle	3,3 $\pm$ 0,8	20,5 $\pm$ 3,3	1,1 $\pm$ 0,5	54,1 $\pm$ 2,8
SP 10 pmol <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,6	21,6 $\pm$ 3,2	1,0 $\pm$ 0,3	53,2 $\pm$ 2,0
SP 10 pmol <sup>b</sup>	3,0 $\pm$ 0,7	21,0 $\pm$ 5,4	0,8 $\pm$ 0,6	55,0 $\pm$ 3,5
SP 40 pmol	2,2 $\pm$ 0,4	20,3 $\pm$ 2,0	-	-

a: animais tratados com SP que apresentaram comportamento de “freezing”

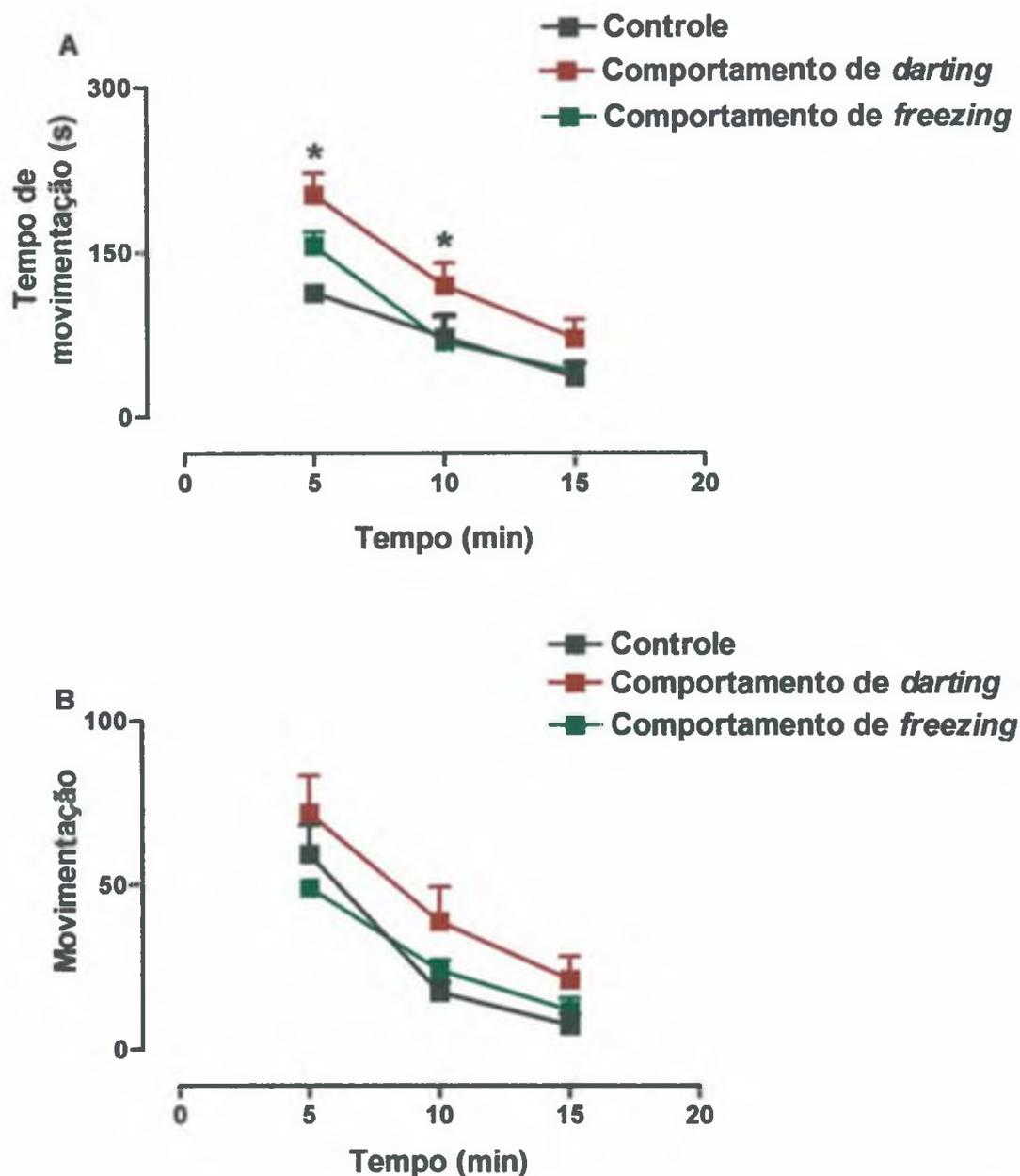
b: animais tratados com SP que apresentaram comportamento de “darting”

### 3.1. Avaliação da movimentação espontânea no tempo de 15 min na arena em ratos tratados com substância P 10 pmol na área septal lateral

Os efeitos da administração de substância P na área septal lateral avaliados na arena durante 15 min estão representados na Figura 17.

Em um grupo de animais tratados com SP 10 pmol no septo lateral, a arena foi utilizada para avaliar a atividade motora em um período de 15 min, que incluiu: *movimentação espontânea*, por 15 min, dividido em 3 tempos de 5 min, e *tempo de movimentação*, o tempo, em segundos, gasto para desempenhar a atividade locomotora, durante o período de registro (O'Neill & Liebman, 1987). Seguindo este protocolo, os animais que exibiram respostas de “darting” apresentaram um tempo de movimentação maior do que a média do grupo controle aos 5 min.

Quando se avaliou o tempo de movimentação e também a movimentação espontânea num período de 15 min, pode-se perceber que após a administração de SP 10 pmol intra-septal, 50 % dos animais apresentaram uma elevação significativa no tempo de movimentação na arena nos primeiros 10 min, comparados com o grupo controle, (Figura 17A; 5 min  $F_{(2,12)} = 7,22$ ; 10 min  $F_{(2,12)} = 3,15$ ;  $P < 0,05$ ), comportamento condizente com as respostas de “darting” observadas no LCE. Observou-se também uma tendência a aumentar a movimentação espontânea na arena aos 10 min (Figura 17B;  $F_{(2,12)} = 2,30$ ;  $P > 0,05$ ). No entanto, os outros 50 % dos animais tratados com SP 10 pmol no septo lateral não diferiram do grupo controle nos vários parâmetros comportamentais registrados na arena, sugerindo que estes animais poderiam exibir respostas de “freezing”, caso fossem avaliados no LCE.



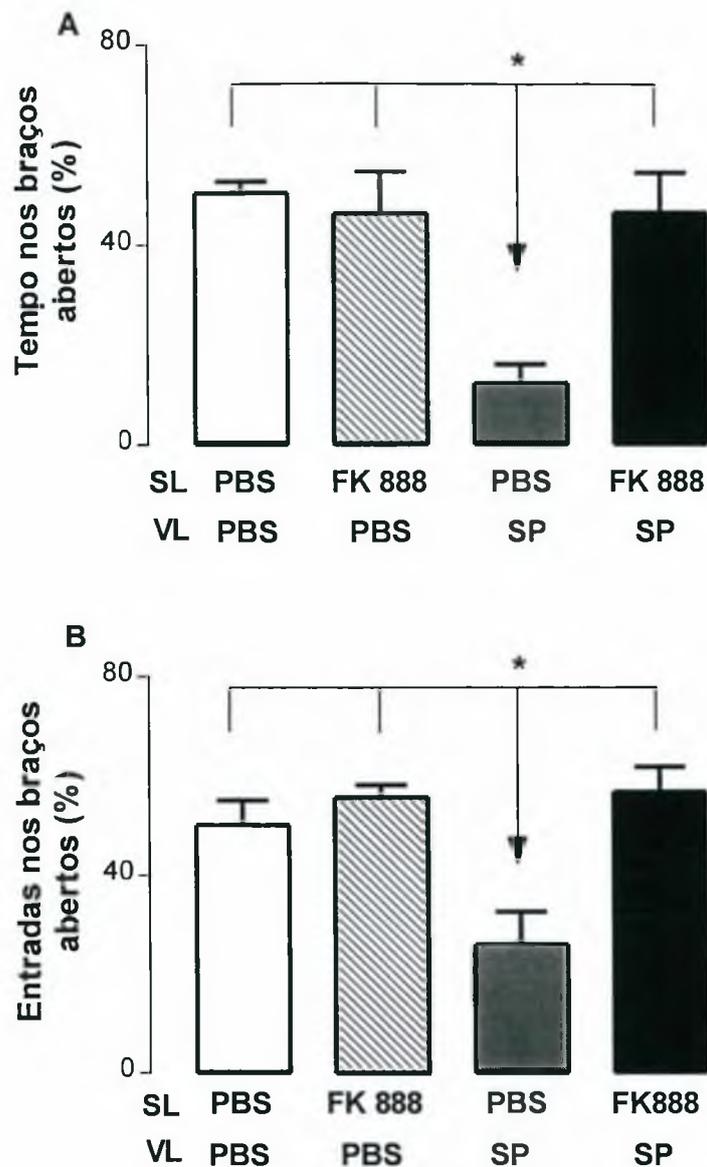
**Figura 17** – Efeito da injeção de substância P na dose de 10 pmol na área septal lateral no tempo de movimentação (A) e na movimentação espontânea (B) na arena em ratos, em um período de 15 min. Cada ponto representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada grupo foi de 5 (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).

#### **4. Influência do tratamento intra-septal com antagonista NK<sub>1</sub> no efeito ansiogênico da substância P**

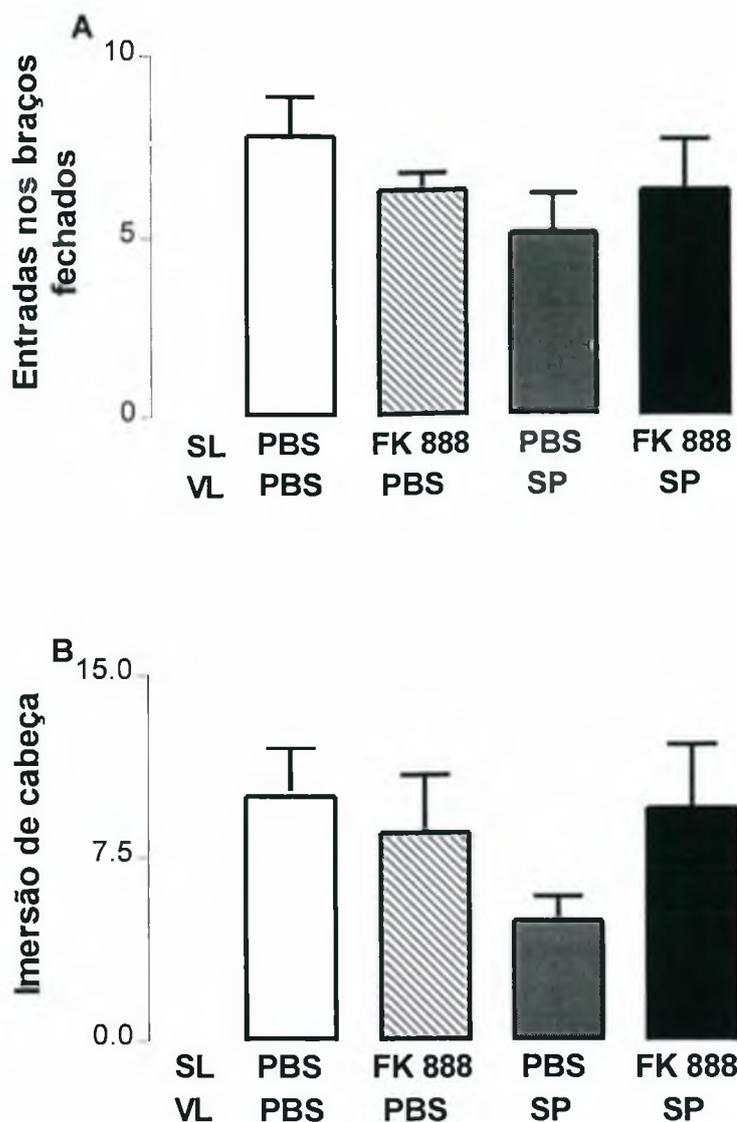
Os efeitos da administração no ventrículo lateral (i.c.v.) de substância P 10 pmol, 5 min após o tratamento com FK 888 100 pmol no septo lateral em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 17 e 18 e na Tabela 7.

A administração na área septal lateral do antagonista NK<sub>1</sub> (FK 888 100 pmol) inibiu o efeito do tipo ansiogênico produzido pelo tratamento i.c.v. com SP 10 pmol no LCE, como pode ser observado nos parâmetros tempo de permanência (Figura 17A;  $F_{(3,20)} = 14,35$ ;  $P < 0,05$ ), porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 17B;  $F_{(3,20)} = 6,61$ ;  $P < 0,05$ ) e tempo despendido no braço fechado (Tabela 7;  $F_{(3,20)} = 12,62$ ;  $P < 0,05$ ) no LCE quando comparado com o tratamento com PBS intra-septal + SP i.c.v.. Os demais parâmetros etológicos avaliados no LCE não foram alterados (Tabela 7).

O tratamento intra-septal de FK 888, antagonista NK<sub>1</sub>, não promoveu qualquer efeito “per se” no LCE (Figuras 17 e 18 e Tabela 7), quando comparado com o grupo controle (PBS intra-septal + PBS i.c.v.).



**Figura 18** – Efeito da administração i.c.v. (VL) de SP (10 pmol), 5 min após o tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista  $NK_1$ , no septo lateral (SL) no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8 (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).



**Figura 19** – Efeito da administração i.c.v. (VL) de SP (10 pmol), 5 min após o tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista NK<sub>1</sub>, no septo lateral (SL), no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8 (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).

**Tabela 7** - Efeito da administração i.c.v. de SP 10 pmol, 5 min após o tratamento com FK 888 100 pmol no septo lateral, nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Ventrículo lateral	Septo lateral	Estiramento	Levantar	Auto-limpeza	Tempo nos braços fechados
PBS	PBS	3,0 ± 1,4	11,6 ± 1,7	2,4 ± 0,7	142,4 ± 6,3
PBS	FK 888 100 pmol	1,8 ± 0,5	6,5 ± 1,3	1,8 ± 0,5	155,5 ± 23,4
SP 10 pmol	PBS	3,1 ± 0,6	9,6 ± 2,0	3,1 ± 0,6	245,3 ± 9,7 *
SP 10 pmol	FK 888 100 pmol	1,8 ± 0,5	8,5 ± 1,8	1,8 ± 0,5	155,8 ± 25,2 <sup>#</sup>

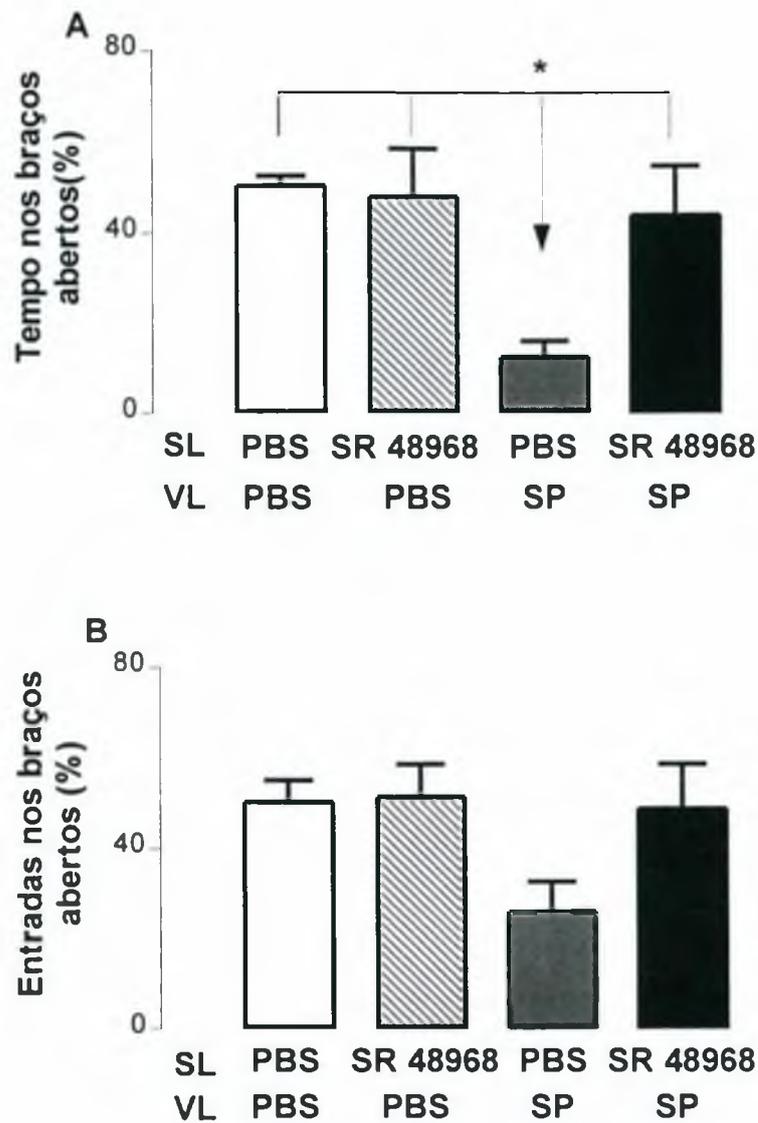
Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$  quando comparado com a injeção de PBS i.c.v. + PBS intra-septal; <sup>#</sup>  $P < 0,05$  quando comparado com a injeção de SP i.c.v. + PBS intra-septal).

## 5. Influência do tratamento intra-septal com antagonista NK<sub>2</sub> no efeito ansiogênico da substância P

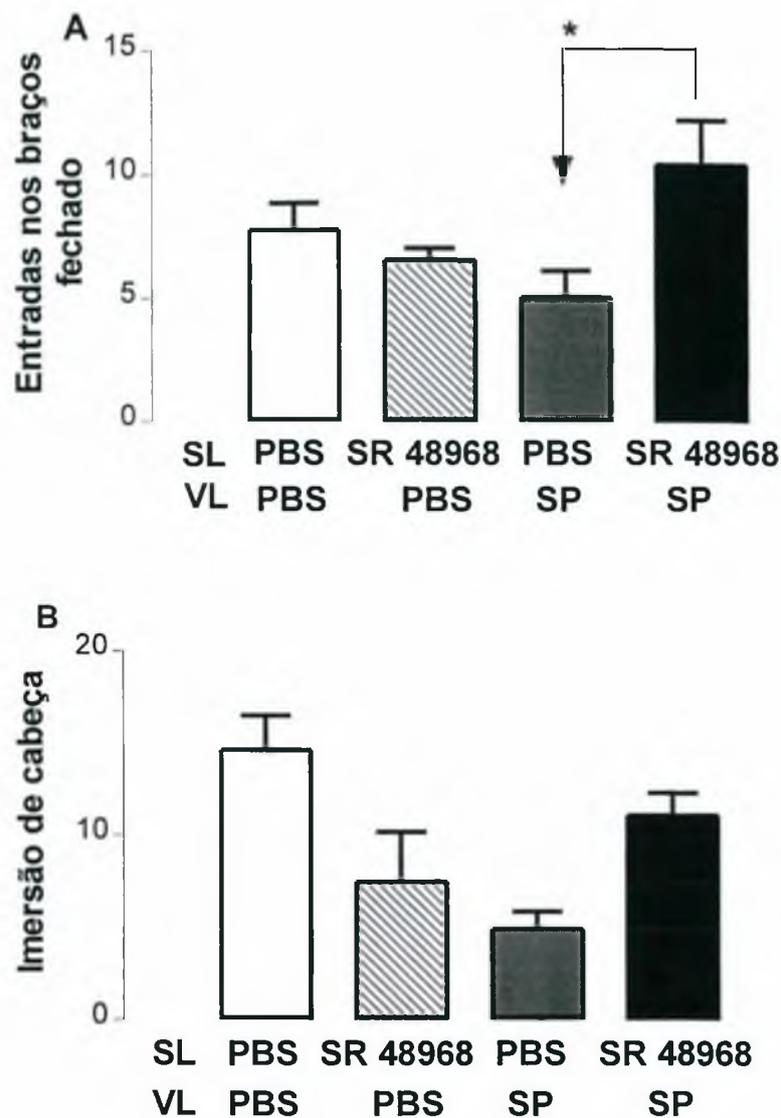
Os efeitos da administração no ventrículo lateral (i.c.v.) de SP 10 pmol, 5 min após o tratamento com SR 48968 100 pmol no septo lateral em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 20 e 21 e na Tabela 8.

A injeção intra-septal do SR 48968 100 pmol, não promoveu qualquer efeito “per se”, mas inibiu a ação do tipo ansiogênica induzida pela SP 10 pmol i.c.v., como pode ser observado no tempo de permanência no braço aberto (Figura 20A;  $F_{(3,18)} = 8,41$ ;  $P < 0,05$ ) e no tempo despendido no braço fechado (Tabela 8;  $F_{(3,18)} = 8,37$ ;  $P < 0,05$ ) no LCE, quando comparados ao grupo injetado com PBS intra-septal + SP i.c.v..

O tratamento com SR 48968 no septo lateral, 5 min após a administração i.c.v. de SP, inibiu a redução do número de entradas nos braços fechados do LCE (Figura 21B;  $F_{(3,18)} = 3,58$ ;  $P < 0,05$ ), por outro lado, a porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 20B;  $F_{(3,18)} = 3,41$ ;  $P > 0,05$ ), assim como os demais parâmetros etológicos avaliados no LCE, não foram alterados pelo tratamento com SR 48968 no septo lateral e SP i.c.v. (Tabela 8), quando comparados com o grupo controle (PBS intra-septal + PBS i.c.v.).



**Figura 20** – Efeito da administração i.c.v. (VL) de SP (10 pmol), 5 min após o tratamento com SR 48968 (100 pmol), antagonista  $NK_2$ , no septo lateral (SL), no tempo de permanência (A) e na porcentagem de entradas dos braços abertos (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8 (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).



**Figura 21** – Efeito da administração i.c.v. (VL) de SP (10 pmol), 5 min após o tratamento com SR 48968 (100 pmol), antagonista NK<sub>2</sub>, no septo lateral (SL), no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais usados em cada tratamento foi de 8. (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$ ).

**Tabela 8** - Efeito da administração i.c.v. de SP 10 pmol, 5 min após o tratamento com SR 48968 100 pmol no septo lateral, nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Ventrículo lateral	Septo lateral	Estiramento	Levantar	Auto-limpeza	Tempo nos braços fechados
PBS	PBS	3,0 ± 1,4	11,6 ± 1,7	2,4 ± 0,7	142,4 ± 6,3
PBS	SR 48968 100 pmol	4,0 ± 1,5	10,8 ± 2,3	3,1 ± 0,6	135,0 ± 31,9
SP 10 pmol	PBS	4,5 ± 1,5	9,6 ± 2,1	3,2 ± 0,9	245,3 ± 9,7 *
SP 10 pmol	SR 48968 100 pmol	2,3 ± 01,1	12,8 ± 1,7	1,5 ± 0,3	158,5 ± 31,3 #

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais (ANOVA univariada seguida do teste de Bonferroni, \*  $P < 0,05$  quando comparado com a injeção de PBS i.c.v. + PBS intra-septal; #  $P < 0,05$  quando comparado com a injeção de SP i.c.v. + PBS intra-septal).

DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Na primeira parte dos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, demonstramos que a substância P induz um efeito aversivo em várias regiões do sistema límbico em ratos avaliados no teste do LCE.

A administração de substância P no ventrículo lateral produziu uma curva dose-resposta em forma de U, na qual a dose intermediária (10 pmol) foi efetiva, enquanto que doses altas (40 e 100 pmol) foram inefetivas na produção de efeitos pró-aversivos. Desta análise determinamos a dose de 10 pmol de substância P como a mais apropriada para reduzir o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, alteração condizente com uma ação do tipo ansiogênica. Esta ação aversiva da SP para ratos está de acordo com os resultados em camundongos, nos quais a SP e os agonistas seletivos dos receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> produzem efeitos do tipo ansiogênicos (Teixeira *et al.*, 1996).

No entanto, apesar da substância P possuir um perfil ansiogênico, nossos resultados mostram que a injeção de SP diminuiu o número de entradas nos braços fechados e no total de entradas no LCE. Esses parâmetros têm sido correlacionados a modificações da atividade locomotora do animal (Rodgers *et al.*, 1997; Rodgers & Cole, 1994). A este respeito, Montgomery propôs que o nível de exploração exibido pelo animal é resultado de competição entre dois sistemas motivacionais, um deles é o “instinto exploratório” que induz as respostas de exploração do ambiente e o outro é o medo/ansiedade que inibem este comportamento exploratório. É conhecido que os braços abertos do labirinto podem ser mais aversivos do que os braços fechados, porém todos os braços do labirinto provavelmente induzem medo, visto que são ambientes desconhecidos. O efeito aversivo ou estressante da exposição ao labirinto em cruz elevado é evidenciado através da elevação do limiar da dor (Rodgers & Cole, 1994), elevação dos níveis de condutância da pele (Suer *et al.*, 1998) e pelo aumento dos níveis de

corticosterona plasmática, principalmente em animais confinados nos braços abertos (Calvo *et al.*, 1998; Copland & Balfour, 1987; File *et al.*, 1988; File *et al.*, 1994; Holmes *et al.*, 1998). Somado à isto, em algumas circunstâncias de medo ocorre uma inibição comportamental, que inclui uma redução do comportamento exploratório (Gray, 1982). Esta inibição comportamental está relacionada com o estado de congelamento (*freezing*), no qual o animal permanece imóvel. Deste modo, drogas que induzem medo/ansiedade podem produzir supressão comportamental no LCE, não reduzindo apenas a preferência pelos braços abertos, mas também pelos braços fechados do labirinto. Alguns estudos têm demonstrado que drogas com perfil ansiogênico como o pentilenotetrazol, o m-clorofenilpiperazina e o FG-7142 reduzem as entradas nos braços abertos e fechados do LCE e, conseqüentemente, reduzem o total de entradas neste braços (Cruz *et al.*, 1995; Dawson *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1994; Pellow *et al.*, 1986). Assim, nossos resultados com a injeção i.c.v. de SP 10 pmol mostram que este peptídeo induz um estado aversivo capaz de produzir uma supressão comportamental no LCE, reduzindo a preferência pelos braços abertos e fechados do labirinto, semelhante à outras drogas com perfil ansiogênico. No entanto, isso ocorre sem que haja alteração da atividade locomotora avaliada na arena, apesar da arena ser um modelo experimental diferente e, por esse motivo, não se pode comparar o grau de aversão induzido pela arena e pelo LCE. É interessante relatar que a arena é também um ambiente desconhecido para o animal e, deste modo, é capaz de induzir comportamentos aversivos (Weiss *et al.*, 1998).

As drogas com perfil ansiogênico não apenas levam o animal a evitar os braços abertos do LCE, mas também promovem alterações nas medidas etológicas. Situações potencialmente perigosas, como é o caso de um ambiente desconhecido ou a presença de um predador, favorecem a exibição do comportamento de avaliação de risco (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard *et al.*, 1989). O número de imersões de cabeça e de estiramentos corporais, que são elementos posturais considerados indicativos do comportamento de

avaliação de risco, têm mostrado serem indicadores sensíveis de drogas efetivas no LCE (Rodgers & Cole, 1994). Nossos resultados mostram que a administração i.c.v. de SP 10 pmol não alterou significativamente os parâmetros etológicos avaliados no LCE.

Deste modo, as evidências sugerem que este peptídeo poderia agir diretamente nas vias neuronais do sistema límbico envolvidas com a expressão das emoções, visto que corpos celulares contendo SP e receptores taquicinérgicos são expressos amplamente nessas áreas do sistema límbico. Após determinarmos a dose de 10 pmol de substância P como a dose i.c.v. adequada para produzir um efeito do tipo ansiogênico, demos continuidade ao nosso trabalho, injetando esta dose de SP diretamente no núcleo basolateral da amígdala, na substância cinzenta periaquedutal dorsal e no septo lateral.

A amígdala é uma estrutura anatômica importante na expressão dos sintomas do medo e da ansiedade (LeDoux, 1986; Davis, 1990). Apesar do tamanho reduzido, a amígdala possui um complexo circuito neuroquímico, que envolve a participação da acetilcolina, dopamina, serotonina, noradrenalina, GABA (Alheid *et al.*, 1995) e neuropeptídeos, tais como a substância P que possui um papel modulatório neste sistema (Roberts *et al.*, 1982). Este peptídeo está presente, principalmente, na porção central e medial da amígdala (Harlan *et al.*, 1989; O'Donohue *et al.*, 1990; Cuello & Kanazawa, 1978). No entanto, apenas os receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>3</sub> possuem significativa expressão no complexo amigdalóide (Yip & Chahl, 1999; Ding *et al.*, 1996).

Em estudos preliminares, a injeção de SP no núcleo basolateral da amígdala produz um efeito do tipo ansiogênico em ratos avaliados no LCE (De Lima e Ribeiro, 1996). Nossos resultados confirmam esse efeito, pois o tratamento com SP 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala reduz o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE. Além disso, esse tratamento diminui o número de imersões de cabeça que é um parâmetro etológico relacionado com estados de ansiedade. Estes dados reforçam o envolvimento da amígdala na

mediação da resposta de defesa induzida pela administração central de substância P. Contudo, é importante ressaltar que o efeito aversivo produzido pela microinjeção de SP na amígdala não difere da resposta observada após a injeção deste peptídeo nos ventrículos laterais.

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é considerada um complexo neuroanatômico, pois é composta por várias sub-regiões capazes de controlar diferentes aspectos da resposta defensiva. Em ratos, a estimulação da porção dorsal da SCP produz comportamentos de luta, taquicardia e hipertensão. Por outro lado, a estimulação da parte ventral da SCP produz comportamentos de congelamento, bradicardia e hipotensão (Bandler & Depaulis, 1991).

Alguns estudos mostram que ratos expostos a eventos aversivos tais como imobilização, injeção subcutânea, isolamento ou choque nas patas exibem um aumento nos níveis de substância P em várias áreas do sistema límbico, incluindo a SCPd e que o tratamento com drogas ansiolíticas, como o diazepam, reduz os níveis de substância P na substância cinzenta periaquedutal dorsal (Brodin *et al.*, 1994; Rosen *et al.*, 1992; Siegel *et al.*, 1984).

Concentrações significantes de SP têm sido encontradas nas porções ventral e dorsal da SCP (Cuello & Kanazawa, 1978; Li *et al.*, 1990; Ljungdahl *et al.*, 1978). Além disso, um estudo recente utilizando anticorpo policlonal mostrou que a região dorsal da SCP possui a maior densidade de corpos celulares e dendritos imunorreativos à SP (Barbaresi, 1998). Outros estudos vêm demonstrando que os receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>3</sub> são expressos na SCP (Yip & Chahl, 1999; Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996). Estes dados corroboram a idéia de que esta área possui um sistema taquicinérgico desenvolvido para efetuar ou organizar reações de defesa (De Araújo *et al.*, 1999).

A este respeito, estudos têm mostrado que a microinjeção de SP na SCPd produz aversão condicionada (Aguiar & Brandão, 1994; Elliot, 1988) e um efeito do tipo ansiogênico

no LCE tão efetivo quanto a injeção intrecerebroventricular de SP (Aguiar & Brandão, 1996). Nossos resultados, no entanto, mostram que a SP 10 pmol injetada na SCPd não produz alterações comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado e na arena. Essa discrepância pode ser atribuída a vários fatores referentes às condições experimentais, como a diferente dose usada nos estudos citados acima (aproximadamente o dobro), o fato do labirinto em cruz elevado ser construído de madeira e do animal não ter sido exposto previamente a arena, ou a um outro fator que no momento não podemos determinar e que deve ser melhor investigado com a repetição desses experimentos para a confirmação ou não dessa ausência de efeito.

A área septal, por outro lado, é conhecida por estar relacionada à modulação do comportamento defensivo de raiva e lesões nesta área têm sido classicamente associadas com um estado de hiperdefesa chamado de “raiva septal”. Alberts e Chew (1980) descreveram este comportamento, principalmente depois de estudarem lesões envolvendo a porção rostrolateral da área septal, que envia fibras para o circuito hipotalâmico medial envolvido com a iniciação das respostas de defesa em um ambiente de perigo (Canteras *et al.*, 1997; Risold e Swanson, 1997a /b).

A área septal é vista como uma interface entre regiões límbicas telencefálicas associadas com cognição e motivação, e regiões hipotalâmicas e áreas do tronco cerebral relacionadas com funções autonômicas e endócrinas (para revisão ver Paxinos, 1995). Estas conexões sugerem que a área septal possui um envolvimento direto na expressão da ansiedade (Thomas, 1988).

Na área septal foram detectados numerosos corpos celulares GABAérgicos e colinérgicos (Costa *et al.*, 1983), aminoácidos excitatórios e mais de dez peptídeos, entre eles a substância P (Palkovits, 1984). Dentre as regiões cerebrais que geram reações aversivas, o septo lateral contém uma das maiores densidades de inervações de SP (Otsuka e Yoshioka,

1993). Além disso, a área septal possui expressão significativa dos receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> (Yip & Chahl, 1999; Otsuka & Yoshioka, 1993; Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996).

Nossos dados mostram que, comparados ao grupo controle, os animais que receberam SP 10 pmol no septo lateral expressaram reações de defesa exacerbadas no teste do LCE, denominadas como respostas de “freezing” e “darting”. O comportamento de “freezing” foi caracterizado pela interrupção do comportamento exploratório, no qual o animal permaneceu tenso, imóvel e em estado de alerta, por outro lado, a resposta de “darting” foi caracterizada por uma reação motora explosiva, associada ao comportamento de levantar, onde o animal pulava junto às paredes dos braços fechados em direção ao topo.

Quando observamos o tempo de movimentação avaliado na arena após a microinjeção de SP 10 pmol no septo lateral, percebemos que havia uma tendência dos animais se dividirem em grupos de baixo e alto nível de movimentação, condizentes com as respostas de “freezing” e “darting”, respectivamente, observadas no LCE.

Essas respostas lembram reações instintivas apresentadas durante a exposição a um predador ou em um ambiente desconhecido e são caracterizadas por reações de defesa, que incluem respostas de “freezing” e “circa-strike” (resposta de defesa caracterizada por tentativas de escape associadas ao ataque defensivo), analgesia e manifestações autonômicas, nas quais, provavelmente, são coordenadas por um sistema comportamental de defesa (Blanchard *et al.*, 1989). Krieger e Graeff, em 1985, observaram respostas defensivas similares às apresentadas neste trabalho, onde 50 % dos animais expressaram reações de “freezing” e os outros 50 %, respostas de “darting” na arena, após a microinjeção de glutamato 5 nmol na SCPd, paralelo a um aumento da pressão arterial, porém, neste trabalho não foi levantada qualquer hipótese para explicar esses achados. No nosso caso, a dose de SP usada não alterou os níveis pressóricos de ratos anestesiados (Bareta, 1998).

Claramente, apenas os animais que apresentaram “freezing” mostraram um claro perfil ansiogênico nos parâmetros testados no LCE, enquanto que aqueles que apresentaram respostas de “darting” não diferiram do grupo controle. Uma possível explicação para esse fato, pode ser que as respostas de “darting” refletem uma condição muito mais aversiva na qual os efeitos ansiogênicos podem ser encobertos quando avaliados no teste do LCE. mas que pode estar associada a uma maior movimentação expressa no modelo da arena. Uma situação similar na análise do perfil ansiogênico avaliada no teste do LCE ocorreu com animais que apresentaram respostas de defesa explosivas após as microinjeções de bloqueadores de receptores GABA na substância cinzenta periaquedutal dorsal (Schmitt *et al.*, 1985).

Um efeito ansiogênico (ou a falta dele) parece depender de, no mínimo, quatro variáveis: o local da injeção, a droga, a dose e o teste comportamental (Menard & Treit, 1999). O fato das respostas de “freezing” serem mais evidentes no LCE e as de “darting” na arena sugerem que a substância P presente no septo lateral não é a responsável pelas respostas aversivas, mas apenas as modula, pois os animais ao receberem a mesma droga, na mesma dose e pela mesma via, exibem respostas aversivas diferentes de acordo com o grau de aversão individual induzido pelo modelo. Outro fato importante foi a dose de SP utilizada, visto que a injeção de SP 40 pmol no SL não denota nenhum efeito ansiogênico, sugerindo que uma maior disponibilidade de SP pode levar a ações em vários receptores/áreas, cuja somatória de efeitos não difere comportamentalmente do grupo controle.

A exposição ao LCE de animais tratados no septo lateral com SP 10 pmol promoveu a redução do número de imersões de cabeça nos animais que apresentaram as reações de “freezing”. Esse parâmetro etológico avaliado no LCE está relacionado com a capacidade exploratória perante um ambiente desconhecido e drogas com perfil ansiogênico reduzem este

valor, reforçando que o tratamento com SP 10 pmol no septo lateral produz reações de medo/ansiedade no LCE.

Deste modo, comparando com os dados obtidos no teste de LCE após a injeção no núcleo basolateral da amígdala, na substância cinzenta periaquedutal dorsal ou no ventrículo lateral, um efeito ansiogênico mais evidente foi observado quando a SP foi injetada no septo lateral. Como mencionado acima, lesões no septo lateral produzem uma síndrome hiperdefensiva conhecida como “raiva septal” (Albert & Chew, 1980). De fato, a área septal lateral contém uma grande população de neurônios GABAérgicos (Risold & Swanson, 1997 a/b) e, por sua vez, é provável que forneça fibras aferentes inibitórias para o circuito hipotalâmico, mediando o comportamento defensivo de raiva (Canteras *et al.*, 1997; Risold & Swanson, 1997 a/b). Portanto, o efeito ansiogênico observado após a injeção de SP pode ser devido a uma modulação inibitória sobre os neurônios GABAérgicos no SL e algumas evidências sugerem haver uma inter-relação entre o sistema GABAérgico e o neurocinérgico na modulação da ansiedade experimental (Ribeiro, 1999).

Um planejamento experimental importante para avaliar a especificidade de uma droga é a demonstração da reversibilidade dos efeitos através da co-administração, periférica ou central, de um antagonista apropriado do seu receptor, pois, deste modo é possível avaliar se a estrutura é crítica ou não para a ação da droga (Menard & Treit, 1999). Uma vez que o efeito ansiogênico da SP no septo lateral é mais evidente do que quando esse peptídeo é injetado no núcleo basolateral da amígdala, na substância cinzenta periaquedutal dorsal ou no ventrículo lateral, na segunda etapa do nosso trabalho, avaliamos se a área septal lateral é crítica para a expressão do efeito ansiogênico da SP usando antagonistas neurocinérgicos seletivos.

A área septal possui uma das maiores densidades de SP (Otsuka & Yoshioka, 1993), além disso, muitos estudos denotam a presença de receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub>

nesta região. A administração de um agonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub> no cérebro de cobaia, revelou que um grande número de células expressam a proteína *Fos* em várias regiões do sistema límbico, inclusive no septo lateral (Yip & Chahl, 1999).

Nossos resultados mostram que a injeção de substância P 10 pmol intracerebroventricular produz um efeito do tipo ansiogênico no LCE, verificado pela redução da frequência de entradas e pelo tempo de permanência nos braços abertos do LCE. O tratamento com FK 888 100 pmol, antagonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub>, ou com SR 48968, antagonista seletivo do receptor NK<sub>2</sub> no septo lateral foi capaz de inibir o efeito ansiogênico da SP. Assim, estes resultados confirmam a relevância do septo lateral como substrato neuroanatômico responsável pela mediação do efeito ansiogênico da substância P, além de sugerirem que os receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> da área septal lateral estão envolvidos na expressão da resposta aversiva observada.

A inclusão de um grupo controle tratado com a droga, cuja cânula esteja próxima, mas fora da área pré-determinada é importante para a avaliação do efetivo envolvimento da área escolhida no efeito observado (Menard & Treit, 1999). Assim, observamos que as injeções de FK 888 e SR 48968 (100 pmol) fora do septo lateral, em estruturas como o núcleo do leito da estria terminal e o *caudatum putamen*, não são capazes de reverter o efeito ansiogênico produzido pela injeção i.c.v. de SP 10 pmol em ratos submetidos ao modelo do LCE (dados não apresentados).

Nossos dados mostram que a injeção de FK 888 e SR 48968 no septo lateral não produziram efeito “per se” nos animais avaliados no LCE. Por outro lado, Teixeira e colaboradores (1996) mostraram que o bloqueio seletivo dos receptores NK<sub>1</sub>, através da administração i.c.v. de FK 888, produziu uma ação do tipo ansiolítica no teste do LCE, em camundongos. No mesmo sentido, a administração central do antagonista (SR 48968) seletivo para o receptor NK<sub>2</sub> resultou em um efeito do tipo ansiolítico em camundongos avaliados no

LCE (Teixeira *et al.*, 1996). Outros estudos têm mostrado que o tratamento sistêmico ou central de antagonistas do receptor NK<sub>2</sub> (GR 100679, SR 48969, GR 159897) reduz os comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos animais (teste de interação social, caixa claro-escuro, LCE) e espécies animais (camundongos, ratos e primatas; Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995). Este fato sugere que o septo lateral, apesar de ser um substrato neural envolvido na expressão do efeito ansiogênico da SP, pode não ser o único responsável pela expressão das reações aversivas observadas no LCE, fator que deve ser melhor investigado.

CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

Nosso estudo do substrato neuroanatômico envolvido na modulação da ansiedade experimental pela substância P sugere que a área septal lateral parece ser de grande importância na expressão do efeito ansiogênico da SP e que os receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> desta região parecem estar envolvidos nessa modulação avaliada no LCE.

Os resultados do presente trabalho indicam que a injeção de SP em doses crescentes no ventrículo lateral produz efeito do tipo ansiogênico no LCE, especialmente na dose de 10 pmol, escolhida por produzir maior aversão no LCE. A injeção de SP 10 pmol em outras áreas do sistema límbico, como o núcleo basolateral da amígdala, a substância cinzenta periaquedutal dorsal e o septo lateral serviram para determinar a área envolvida na expressão do efeito aversivo induzido pela SP. A microinjeção de SP 10 pmol no núcleo basolateral da amígdala induziu um efeito aversivo em ratos avaliados no LCE, que não diferiu da ação observada após a injeção de SP no ventrículo lateral. O tratamento com SP 10 pmol na substância cinzenta periaquedutal dorsal não produziu efeito aversivo significativo.

Os nossos dados mostraram também que, comparado ao grupo controle, os animais que receberam SP 10 pmol no septo lateral expressaram reações de defesa exacerbadas no teste do LCE, denominadas como respostas de “freezing” e “darting”. Além disso, no teste da arena (15 min) após a microinjeção de SP 10 pmol no septo lateral, os animais se dividiram em grupos de baixo e alto nível de movimentação, condizentes com as respostas de “freezing” e “darting”, observadas no LCE, respectivamente.

Os tratamentos com FK 888 100 pmol, antagonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub>, e com SR 48968, antagonista seletivo do receptor NK<sub>2</sub> no septo lateral foram capazes de inibir o efeito ansiogênico induzido pela SP 10 pmol, administrada no ventrículo lateral. Estes resultados confirmam a relevância do septo lateral como substrato neuroanatômico

responsável pela mediação do efeito ansiogênico da substância P, além de mostrarem que os receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> da área septal lateral estão envolvidos na expressão da resposta aversiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGUIAR, M. S. e BRANDÃO, M. L. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. **Behav. Pharmacol.**, **5**: 369-373, 1994.
- AGUIAR, M.S. e BRANDÃO, M.L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.**, **60**:1183-1186, 1996.
- ALBERT, D.J. e CHEW, G.L. The septal forebrain and the inhibitory modulation of attack and defense in the rat: A review. **Behav. Neural. Biol.**, **30**: 357-388, 1980.
- ALHEID, G. F, OLMOS, J. S. e BELTRAMINO, C. Amygdala and extended amygdala. *In*: GEORGE, P. **The rat nervous system**. 2 ed. Australia: Academic Press, 495-572, 1995.
- ALMAY, B. G. L., JOHANSSON, F., VON KNORRING, L., LE GREVES, P. E TERENIUS, L. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. **Pain**, **33**: 3-9, 1988.
- AMARAL, D. G., PRICE, J. L., PITKANEN, A. e CARMICHAEL, S. T. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. *In*: AGGLETON, J. P. (Eds.). **The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction**. New York: wiley, 1-66, 1991.
- ARAI, H. e EMSON, P. C. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. **Brain Res.**, **399**: 240-249, 1986.
- ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, **21**: 205-235, 1973.

- AUBRY, J. M., LUNDSTROM, K., KAWASHIMA, E., AYALA, G., SCHULZ, P., BARTANUSZ, V. e KISS, J. Z. NK<sub>1</sub> receptor expression by cholinergic interneurons in human striatum. **Neuroreport**, **5**: 1597-1600, 1994.
- BARBARESI, P. Immunocytochemical localization of substance P receptor in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. **J. Comp. Neurol.**, **398**: 473-490, 1998.
- BARETTA, I. P. **Efeito ansiogênico da substância P: envolvimento do óxido nítrico.** Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Florianópolis, SC, 1998.
- BEAUJOUAN, J. C., TORRENS, Y., SAFFROY, M. e GLOWINSKI, J. Quantitative autoradiographic analysis of the distribution of binding sites for [<sup>125</sup>I]Bolton-hunter derivatives of eleidosin and substance P in the rat brain. **Neuroscience**, **18**: 857-875, 1986.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, **46**: 575-605, 1995.
- BERTACCINI, G. Active polypeptides of non-mammalian origin. **Pharmacol. Rev.**, **28**: 127-177, 1976.
- BERNATZKY, G. e SARIA, A. Behavior effects of the NK<sub>2</sub> antagonist SR48968 but not of the NK<sub>1</sub> antagonist SR140333 in the mouse black and white box model. **Proceedings of the 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, San Diego, 1995.
- BLANCHARD, D. C. e BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.**, **39**: 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. e HORI, K. An ethoexperimental approach to the study of defense. *In*: BLANCHARD, R.J., BRAIN, P.F., BLANCHARD, D.C. E PARMIGIANI, S. (Eds.) **Ethoexperimental approaches to the study of behavior.** Dordrecht: Kluwer, 114-136, 1989.

- BLANCHARD, D. C., BLANCHARD, R. J. e RODGERS, R. J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Agressive Behav.**, **16**: 165-176, 1990.
- BRAIN, P. F., KUSUMORINI, N. BENTON, D. "Anxiety" in laboratory rodents: a brief review of some recent behavioral developments. **Behav. Proc.**, **25**: 71-80, 1991.
- BRENT, P., CHAHL, J., LORIS, A. e CANTARELLA, P.A. Effects of intracerebroventricular injection of substance P on biogenic amine concentrations in guinea-pig brain. **Biogenic. Amines**, **10**: 319-327, 1994.
- BRISTOW, L. J. e YOUNG, L. Chromodacryorrhea and repetitive hind paw tapping: models of peripheral and central NK<sub>1</sub> receptor activation in gerbils. **Eur. J. Pharmacol.**, **253**: 245-252, 1994.
- BRODIN, E., ROSEN, A., SCHOTT, E. e BRODIN, K. Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. **Neuropeptides**, **26**: 253-260, 1994.
- CALVO, N., MARTIJENA, I. D., MOLINA, V. A. e VOLOSIN, M. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. **Brain Res.**, **800**: 227-235, 1998.
- CANTERAS, N.S., CHIAVEGATTO, S., RIBEIRO DO VALLE, L.E. e SWANSON, L.W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res. Bull.**, **44**:297-305, 1997.
- CHANG, M.M., LEEMAN, S.E. e NIALL, H.D. Amino acid sequence of substance P. **Nature**, **232**: 86-87, 1971.
- CHAPMAN, W. P., SCHROEDER, H. R., GEYER, G., BRAZIER, M. A., FANGER, C., POPPEN, J. S., SOLOMON, H. C. e IAKOLEV, P. I. Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear regions in the integration of circulatory function and emotion in man. **Science**, **120**: 949-950, 1954.

- CLARKE, A. e FILE, S. E. Selective neurotoxin lesions of the lateral septum: Changes in social and aggressive behaviors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, **17**: 623-628, 1982.
- COOPER, P.E., FERNSTROM, M.H., RORSTAD, O.P., LEEMAN, S.E. e MARTIN, J.B. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. **Brain res.** **218**: 219-232, 1981.
- COPLAND, A. M. e BALFOUR, D. J. K. Spontaneous activity and brain 5-hydroxyindole levels measured in rats tested in two designs of elevated X-maze. **Life Sci.**, **41**: 57-64, 1987.
- COSTA, E., PANULA, P., THOMPSON, H.K. e CHENEY, D.L. The transsynaptic regulation of the septo-hippocampal cholinergic neurons. **Life Sci.**, **32**: 165-179, 1983.
- CRUZ, A. P. M., FREI, F. e GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **pharmacol. Biochem. Behav.**, **49**: 171-176, 1994.
- CUELLO, A.C. e KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **178**: 129-156, 1978.
- CULMAN, J. e UNGER, T. Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. **J. Physiol. Pharmacol.**, **73**: 885-891, 1995.
- DAM, T. V. e QUIRION, R. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of substance P receptors in guinea pig brain. **Peptides**, **7**: 855-864, 1986.
- DANKS, J. A., ROTHMAN, R. B., CASCIERI, M. A., CHICCHI, G. G., LIANG T. e HERKENHAM, M. A comparative autoradiographic study of the distributions of substance P and edoisin binding sites in rat brain. **Brain Res.**, **385**: 273-281, 1986.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. *In*: AGGLETON, J. **The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction**. New York: Wiley, 255-305, 1992.

- DAWSON, G. R., CRAWFORD, S. P., COLLINSON, N., IVERSEN, S. D. e TRICKLEBANK, M. D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlodiazepoxide on the elevated plus-maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology**, **118**:316-323, 1995.
- DE ARAÚJO, J.E., BRANDÃO, M.L. e HUSTON, J.P. Aversive effects of the C-fragment of substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. **Exp. Brain Res.**, **123**: 84-89, 1998.
- DE ARAÚJO, J. E., SILVA, R. C. B., HUSTON, J. P., HUSTON, J. P. e BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. **Peptides**, **20** : 1437-1444, 1999.
- DE LIMA, T.C.M. e RIBEIRO, S.J. Central effects of tachykinin NK1 receptor agonists and antagonists on the plus maze behavior in rats. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **22**: 1154, 1996.
- DE LIMA, T. C. M. e SILVEIRA, F. D. Further analysis of the anxiogenic-like effect induced by SP as evaluated in the plus-maze. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **26**, 2000.
- DEL FIACCO, M., LEVANTI, M.C., DESSI, M.L. e ZUCCA, G. The human hippocampal formation and parahippocampal gyrus: localization of substance P-like immunoreactivity newborn and adult *post-mortem* tissue. **Neuroscience**, **21**:141-150, 1987.
- DEN'ETSU, S., YABE, K. e AKIYAMA, K. Quantitative imaging of substance P in the human brain using a brain mapping analyzer. **Neurosci. Res.**, **35**: 339-346, 1999.
- DING, Y. Q., SHIGEMOTO, R., TAKADA, M., OHISHI, H., NAKANISHI, S. e MIZUNO, N. Localization of the neuromedin K receptor (NK<sub>3</sub>) in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.**, **364**: 290-310, 1996.
- DUNHAM, N. W. e MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. American Pharmac. Assoc.**, **46**: 208-210, 1957.
- ELLIOTT, P. J. Place aversion induced by the substance P analogue, dimethyl-C7, is not state dependent: implication of substance P in aversion. **Exp. Brain Res.**, **73**: 354-356, 1988.

- ELLIOTT, P. J. e IVERSEN, S. D. Behavioral effects of tachykinins and related peptides. **Brain Res.**, **381**: 68-76, 1986.
- EMERY, N. J., LORINEZ, E. N., PERRETT, D. I., ORAM, M. W. e BAKER, C. I. Gaze following and joint attention in rhesus monkeys. **J. Comp. Psychol.**, **111**: 1-8, 1997.
- EMONDS-ALT, X., BICHON, D., DUCOUX, J. P., HEAULME, M., MILOUX, B., PONCELET, M., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., VILAIN, P., NELIAT, G., SOUBRIÉ, P., LE FUR, G., BRELIÈRE, J. C. SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK<sub>3</sub> receptor. **Life Sci.**, **56**: 27-32, 1995.
- EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E., NELIAT, G., LE FUR, G. e BRELIÈRE, J. C. A potent and selective non peptide antagonist of the neurokinin A (NK-2) receptor. **Life Sci.**, **50**: 101-106, 1992.
- ERSPAMER, V. Biogenic amines and active polypeptides of amphibian skin. **Annu. Ver. Pharmacol.**, **11**: 327-350, 1971.
- ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. **Trends Neurosci.**, **4**: 267-269, 1981.
- ERSPAMER, V. e MELCHIORRI, P. Active polypeptides: from amphibian skin and their synthetic analogues. **Pure Appl. Chem.**, **35**: 463-494, 1973.
- ERSPAMER, V. e MELCHIORRI, P. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and barin mammals. **Trends Pharmacol. Sci.**, **1**: 391-395, 1980.
- FENDT, M. e FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci. Behav. Rev.**, **23**: 743-760, 1999.
- FILE, S. E. Behavioral detection of anxiolytic action. *In*: FILE, S. E. (Ed.), **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**. Wiley: Manchester, 25-44, 1992.

- FILE, S.E. Anxiolytic action of a neurokinin-1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **58**: 747-752, 1997.
- FILE, S. E., JOHNSTON, A. L. e BALDWIN, H. A. Anxiolytic and anxiogenic drugs: changes in behaviour and endocrine responses. **Stress Med.**, **4**: 221-230, 1988.
- FILE, S. E., ZANGROSSI, H., SANDERS, F. L., MABBUTT, P. S. Raised corticosterone after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacol.**, **113**: 543-546, 1994.
- FUJI, T., MURAI, M., MORIMOTO, H., MAEDA, Y., YAMAOKA, M., HAGIWARA, D., MIYAKE, H., IKARI, N. e MATSUO, M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK<sub>1</sub> receptor antagonist, FK 888. **Br. J. pharmacol.**, **107**: 785-789, 1992.
- FUXE, K. The role of noradrenaline and adrenaline neuron system and substance P in the control of central cardiovascular functions **Perspectives in cardiovasc. Res.**, **6**: 89-113, 1981.
- GADDUM, J.H. e SCHILD, H.O. Depressor substances in extracts of intestine. **J. Physiol.**, **83**: 1-14, 1934.
- GARCIA, M., SAKAMOTO, K., SHIGEKAWA, M., NAKANISHI, S., ITO, S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor. **Biochem. Pharmacol.**, **48**: 1735-1741, 1994.
- GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J. F., BLANCHARD, J. C. e LADURON, P. M. Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 10208-10212, 1991.
- GIBSON, E. L., BARNFIELD, A. M. C. e CURZON, G. Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT<sub>2C</sub> receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology**, **33**: 457-465, 1994.

- GORBULEV, V., AKHUNDOVA, A., LUZIUS, H. e FAHRENHOLZ, F. Molecular cloning of substance P receptor cDNA from guinea-pig uterus. **Biochem. Biophys. Acta**, **1131**: 99-102, 1992.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**: 811-829, 1994.
- GRAY, J. A. **The neuropsychology of anxiety**: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford: Clarendon Press, 1982.
- GRAY, J. A. e McNAUGHTON, N. Comparison between the behavioral effects of septal and hippocampal lesions: A review. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **7**: 119-188, 1983.
- GUARD, S. e WATSON, S. P. Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. **Neurochem. Int.**, **18**: 149-165, 1991.
- HAGAN, R. M., BERESFORD, I. J. M., STABLES, J., DUPERE, J., STUBBS, C. M., ELLIOT, R. L. N., SHELDRIK, A., CHOLLET, A., KOWASHIMA, E., McELROY, A. B. e WARD, P. Characterization, CNS distribution and function of NK<sub>2</sub> receptors: new tools for investigating neurokinin function. **Neuropeptides**, **19**: 127-135, 1991.
- HAHN, M. K. e BANNON, M. J. Stress-induced c-fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation. **Neuroscience**, **94**: 1183-1188, 1999.
- HANDLEY, S. e McBLANE, J. W. An assessment of the elevated x-maze for studying and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, **29**: 129-138, 1993.
- HANDLEY, S. e MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear-motivated" behavior. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, **327**: 1-5, 1984.
- HARLAN, R.E., GARCIA, M.M. e KRAUSE, J.E. Cellular localization of substance P- and neurokinin A- encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. **J. Comp. Neurol.**, **287**: 179-212, 1989.

- HASENÖHRL, R. U., JENTJENS, O., SILVA, A. S., TOMAZ, C. e HUSTON, J. P. Anxiolytic-like action of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region. **Eur. J. Pharmacol.**, **354**: 123-133, 1998.
- HENRY, J. L. Discussions of nomenclature for tachykinins and tachykinin receptors. *In: Substance P and neurokinins*. HENRY, J. L. , COUTURE R., CUELLO, A. C., PELLETIER, G., QUIRION, R. E REGOLI, D. (Eds.) New York: Springer-Verlag, 1987: xvii-xviii.
- HILL, R. NK<sub>1</sub> (substance P) receptor antagonists – why are they not analgesic in humans? **Tips**, **21**: 244-246, 2000.
- HÖKFELT, T. , JOHANSSON, O., KELLERTH, J. O., LJUNGDAHL, A., NILSSON, G., NYGARDS, A. e PERNOW, B. Immunohistochemical distyribution of substance P. *In: Substance P*. VON EULER, U. S. e PERNOW, B. (Eds.) New York: Raven, 117-145, 1977.
- HÖKFELT, T.; MILLHORN, D., SEROOGY, K., TSURUO, Y., CECCATELLI, S., LINDH, B., MEISTER, B., MELANDER, T., SCHALLING, M., BERTFAI, T. e TEREUNIS, L. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. **Experientia**, **43**: 768-780, 1987.
- HOLLAND, P. e GALLAGHER, M. Amygdala circuitry in attentional and representational processes. **Trends in Cognitive Sciences**, **3**: 65-73, 1999.
- HOLMES, A., DIFFLEY, E. P., WALTON, T. P., BRAIN, P. F. e RODGERS, R. J. Lack of habituation of corticosterone responses in mice repeatedly exposed to the plus-maze. **Psychopharmacol.**, **125**: 32, 1998.
- HOREL, J. A., KEATING, E. G. e MISANTONE, L. J. Partial Klüver-Bucy syndrome produced by destroying temporal neocortex ar amygdala. **Brain Res.**, **94**: 347-359, 1975.
- ISAACSON, R. L. **The limbic system**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1982.

- IVERSEN, L. L., HANLEY, M. R., SANDBERG, B. E. B., LEE, C. M., PINNOCK, R. D. e WATSON, S. P. Substance P receptors in the nervous system and the possible receptor subtypes. *In: Substance P in the nervous system*. PORTER, R. e O'CONNOR, M. (Eds.) London: Pitman, 1982 : 186-205 (Ciba Found. Symp. 91).
- JAKAB, R.L. e LERANTH, C. Septum. *In: PAXINOS, G (Ed.). The rat nervous system*. 2 ed. London: Academic Press, 405-442, 1995.
- KAADA, B. R. Somatomotor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of "rhinencephalic" and other structures in primates, cats, and dogs. *Acta Physiol. Scand.*, **24**: 1-258, 1951.
- KACZMARCK, K. The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. *Trends Neurosci.*, **10**: 30-34, 1987.
- KAGE, R., MCGREGOR, G. P., THIM, L. e CONLON, J. M. Neuropeptide  $\gamma$ : a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from  $\gamma$ -preprotachykinin. *J. Neurochem.*, **50**: 1412-1417, 1988.
- KANGAWA, K., MINAMINO, N., FUKUDA, A. e MATSUO, H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**: 533-540, 1983.
- KAPP, B. S., GALLAGHER, M., UNDERWOOD, M. D., McNALL, C. L. e WHITEHORN, D. Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. *Brain Res.*, **234**: 251-262, 1982.
- KIMURA, S. OKADA, M., SUGITA, Y., KANAZAWA, I. e MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin  $\alpha$  and  $\beta$ , isolated from porcine spinal cord. *Proc. Jpn. Acad.*, **59**: 101-104, 1983.
- KLÜVER, H. e BUCY, P. Preliminary analysis of functional of the temporal lobe in monkeys. *Archives of Neurology*, **42**: 979-1000, 1939.

- KRAMER, M. S., CUTLER, N., FEIGHNER, J., SHRIVASTAVA, R., CARMAN, J., SRAMEK, J. J., REINES, S. A., LIU, G., SNAVELY, D., WYATT, K. E., HALE, J. J., MILLS, S. G., MacCOSS, M., SWAIN, C. J., HARRISON, T., HILL, R. G., HEFTI, F., SCOLNICK, E. M., CASCIERI, M. A., CHICCHI, G., G., SADOWSKI, S., WILLIAMS, A. R., HEWSON, L., SIMITH, D., RUPNIAK, N. M.. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, **281**: 1640-1645, 1998.
- KRAUSE, J. E., STAVETEIG, P. T., MENTZER, J. N., SCHMIDT, S. K., TUCKER, J. B., BRODBECK, R. M., BU, J. Y. e KARPITSKIY, V. V.. Functional expression of a novel human neurokinin-3 receptor homolog that binds [<sup>3</sup>H]senktide and [<sup>125</sup>I-MePhe7]neurokinin B, and is responsive to tachykinin peptides agonists. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 310-315, 1997.
- KRIEGER, J. E. e GRAEFF, F. G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **18**: 61-67, 1985.
- KUHAR, M. J. Neuroanatomical substrates of anxiety: a brief survey. **Trends Neurosci.**, **9**: 307-311, 1986.
- LANEUVILLE, O., DORAIS, J. e COUTURE, R. Characterization of the effects produced by neurokinin and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat. **Life Sci.**, **42**: 1295-1305, 1988.
- LAVOND, D. G., KIM, J. J. e THOMPSON, R. F. Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. **Annu. Rev. Psychol.**, **44**: 317-342, 1993.
- LEDOUX, J. E. Emotion: clues from the brain. **Annu. Rev. Psychol.**, **46**: 209-235, 1995.
- LEDOUX, J. E. **The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life.** New York: Simon and Schuster, 1996.

- LI, Y. Q., JIA, H. G., RAO, Z. R. e SHI, J. W. Serotonin-, substance P- or leucine-enkephalin-containing neurons in the midbrain periaqueductal gray and nucleus raphe dorsalis send projection fibres to the central amygdaloid nucleus in the rat. **Neurosci. Lett.**, **120**: 124-127, 1990.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.**, **46**: 321-340, 1990.
- LJUNGDAHL, A., HÖEKFELT, T. e NILSSON, G. Distribution of substance p-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminalis. **Neuroscience**, **3**: 861-943, 1978.
- MAGGI, C. A., PATACCHINI, R., ROVERO, P. e GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptors antagonists. **J. Autonom. Pharmacol.**, **13**: 23-75, 1993.
- MAGGI, C. A. e SCHWARTZ, T. W. The dual nature of the tachykinin NK<sub>1</sub> receptor. **Trends Pharmacol. Sci.**, **18**: 351-355, 1997.
- MAGGIO, J. E., SANDBERG, B. E. B., BRADLEY, C.V., IVERSEN, L.L., SANTIKAN, S., WILLIAMS, B. H., HUNTER, J. C. e HANDLEY, M. R. Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord. *In*: SHRABANEK P. E POWELL D. (Eds.) **Substance P**. Dublin: Boole, 1983: 20-21.
- MANTYH, P. W., HUNT, S. P. e MAGGIO, J. E. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [<sup>3</sup>H]SP as the radioligand. **Brain Res.**, **307**: 147-165, 1984.
- MAREN, S. e FANSELOW, M. S. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked. **Neuron.**, **16**: 237-240, 1996.
- MARKSTEINER, J., SARIA, A., MILLER, C.H. e KRAUSE, J.E. Increased synthesis of neurokinin B and enkephalin after chronic haloperidol treatment. **Regul. Pept.**, **46**: 349-351, 1993.

- MASON, G. S. e ELLIOT, P. J. Behavioral consequences following infusion of selective neurokinin agonists into the median raphe nucleus of the rat. **Neuropharmacol.**, **31**: 757, 1992.
- MENARD, J. e TREIT, D. lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. **Physiology and Behavior**, **60**: 845-853, 1996.
- MENARD, J. e TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic in animal models of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **23**: 591-613, 1999.
- MILLER, C., KIRCHMAIR R, TROGER J, SARIA A, FLEISCHHACKER WW, FISCHER-COLBRIE R, BENZER A, WINKLER H. CSF of neuroleptic-naive first-episode schizophrenic patients: levels of biogenic amines, substance P, and peptides derived from chromogranin A (GE-25) and secretogranin II (secretoneurin). **Biol. Psychiatry**, **39**: 911-918, 1996.
- MITSUHASHI, M., OHASHI, Y., SHICHIJO, S., CHRISTIAN, C., SUDDUTH, K. J., HARROWE, G. e PAYAN, D. G. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor. **J. Neurosci. Res.**, **32**: 437-443, 1992.
- MOCHIZUKI, O. N., NAKAJIMA, Y., NAKANISHI, S. e ITO, S. Characterization of the substance P receptor-mediated calcium influx in cDNA transfected Chinese hamster ovary cells. A possible role of inositol 1,4,5-trisphosphate in calcium influx. **J. Biol. Chem.**, **269**: 9651-9658, 1994.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Psychol.**, **48**: 254-260, 1955.
- MUSSAP, C. J., GERAGHTY, D. P. e BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **J. Neurochem.**, **60**: 1987-2009, 1993.
- NAHORSKI, S. R. Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis. **Trends Neurosci.**, **11**: 444-448, 1988.

- NAKAJIMA, Y., TSUCHIDA, K., NEGISHI, M., ITO, S. e NAKANISHI, S. Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of bath phosphatidyl-inositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, **267** : 2437-2442, 1992.
- NASHOLD Jr., B.S., WILSON, N. P. e SLAUGHTER, G. S. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J. Neurosurg.**, **30**: 14-24, 1969.
- NAUTA, W. J. H. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat brain. **Brain**, **81**: 319-340, 1958.
- NIKOLAUS, S., HUSTON, J. P. e HASENÖHRL, R. U. The neurokinin-1 receptor antagonist WIN 51,708 attenuates the anxiolytic-like effects of ventralpallidal substance P injection. **Neuroreport**, **10**: 2293-2296, 1999.
- O'DONOHUE, T. L., HELKE, C. J., BURCHER, E., SHULTS, C. W. e BUCK, S. H. Autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. *In*: HENRY, J. L., COUTURE, R., CUELLO, A. C., PELLETIER, G., QUIRION, R. e REGOLI, D. (Eds.) **Substance P and neurokinins**. New York: Springer-Verlag, 93-95, 1987.
- OLDS, M. E. e OLDS, J. Approach-escape interactions in the rat brain. **Am J. Physiol.**, **203**: 803-810, 1962.
- O'NEILL, K. e LIEBMAN, J. M. Unique behavioral effects of the NMDA antagonist, CPP, upon injection into the medial pre-frontal cortex of rats. **Brain Res.**, **435**: 371-376, 1987.
- OTSUKA, M. e YOSHIOKA, L. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.**, **73**: 229-308, 1993.
- PALKOVITS, M. Distribution of neuropeptides in the central nervous system: a review of biochemical mapping studies. **Prog. Neurol.**, **229**: 151-189, 1984.

- PANKSEPP, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. *In*: BURROWS, M., ROTH, M. e NOYES, Jr. (Eds.) **The Neurobiology of Anxiety**. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 3-58, 1990.
- PATACCHINI, R. e MAGGI, C. A. Tachykinin receptors and receptor subtypes. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **329**: 161-184, 1995.
- PAXINOS, G. e WATSON, C. **The rat brain – in stereotaxic coordinates**. 2 ed. Australia: Academic Press, 1986.
- PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 2 ed. Australia: Academic Press, 1995.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. e BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. **J. Neurosci. Meth.**, **14**: 149-167, 1985.
- PELLOW, S. e FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **24**: 526-530, 1986.
- PESOLD, C. e TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Res.**, **671**: 213-221, 1995.
- PIOT, O., BETSCHART, J., GRALL, I., RAVARD, S., GARRET, C. e BLANCHARD, J. C. Comparative behavioral profile of centrally administered tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors agonists in the guinea-pig. **Br. J. Pharmacol.**, **116**: 2496-2502, 1995.
- PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmac. Ther.**, **55**: 149-181, 1992.
- RAFFA, R.B. Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. **Neuroscience and Biobehav. Rev.**, **6**: 789-813, 1998.

- RAVARD, S., BETSCHAT, J., FARDIN, V., FLAMAND, O. e BLANCHARD, J. C. Differential ability of tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> agonists to produce scratching and grooming behaviors in mice. **Brain Res.**, **651**: 199-208, 1994.
- REGOLI, D., BOUDON, A. e FAUCHÈRE, J. C. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol. Rev.**, **46**: 551-589, 1994.
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. e D'ORLÉANS-JUSTE, P. Receptors for substance P and related tachykinins. **Pharmacology**, **38**: 1-15, 1989.
- RIBEIRO, R. L. **Participação GABAérgica na modulação da ansiedade experimental pelos receptores neurocinérgicos.** Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 1999.
- RIBEIRO, S. J., TEIXEIRA, R. M., CALIXTO, J. B., DE LIMA, T. C. Tachykinin NK(3) receptor involvement in anxiety. **Neuropeptides**, **33**: 181-188, 1999.
- RISOLD, P.Y. e SWANSON, L.W. Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. **Brain Res. Rev.**, **24**: 91-113, 1997a.
- RISOLD, P.Y. e SWANSON, L.W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Res. Rev.**, **24**: 115-195, 1997b.
- ROBERTS, G. W., WOODHAMS, P. L., POLAK, J. M. e CROW, T. J. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. **Neurosci.**, **7**: 99-131, 1982.
- RODGERS, R. J., CAO, B-J. e HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **30**: 299-204, 1997.
- RODGERS, R. J. e COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. *In*: COOPER, S. J. e HENDRIE, C. A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology.** Wiley: Chichester, 9-44, 1994.

- RODGERS, R. J., COLE, J. C., ABOUALFA, K. e STEPHENSON, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative “anxiogenic” agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **52**: 805-813, 1995.
- RODGERS, R. J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T. J. e BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiol. Behav.**, **68**: 47-53, 1999.
- ROSEN, A., BRODIN, K., ENEROTH, P. e BRODIN, E. Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the periaqueductal grey and limbic regions of rat brain. **Acta Physiol. Scand.**, **146**: 341-348, 1992.
- RUPNIAK, N., CARLSON, E. C., HARRISON, T., OATES, B., SEWARD, E., OWEN, S., DE FELIPE, C., HUNT, S. e WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK<sub>1</sub>) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacol.**, **39**: 1413-1421, 2000.
- RUPNIAK, N. e KRAMER, M. Discovery of the anti-depressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK<sub>1</sub>) antagonists. **Tips**, **20**: 485-490, 1999.
- RUSSO, A. S., GUIMARÃES, F. S., DE AGUIAR, J. C. e GRAEFF, F. G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. **Psychopharmacol.**, **110**: 198-202, 1993.
- SAFFROY, M., BEAUJOUAN, J. C., TORRENS, Y., BESSEYRE, J., BERGSTROM, L. e GLOWINSKI, J. Localization of tachykinin binding sites (NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub> ligands) in the rat brain. **Peptides**, **9**: 227-241, 1988.
- SAKANAKA, M., SHIOSAKA, S., TAKATSUKI, K., INAGAKI, S., HARA, Y., KAWAI, Y., SENBA, E. e TOHYAMA, M. Origins of substance P-containing fibers in the lateral septal area of young rats: immunohistochemical analysis of experimental manipulations. **J. Comp. Neurol.**, **212**: 268-277, 1982.

- SAKURADA, T., YAMADA, T., SAKURADA, S., KISARA, K. e OHBA, M. Substance P analogues containing D-histidine antagonize the behavioral effects of intrathecally co-administered SP in mice. **European J. Pharmacol.**, **174**: 153-160, 1989.
- SARIA, A. The tachykinin NK<sub>1</sub> receptor in the brain: pharmacology and putative functions. **European J. Pharmacol.**, **375**: 51-60, 1999.
- SCHIMADA, S., INAGAKI, S., KOBOTA, Y., KITO, S., SHIOTANI, Y. e TOHYAMA, M. Co-existence of substance P and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.**, **425**: 256-262, 1983.
- SCHIMITT, P., DI SCALA, G., BRANDÃO, M. L. e KARLI, P. Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus or the mesencephalic central gray. **Eur. J. Pharmacol.**, **117**: 149-158, 1985.
- SEABROOK, G. R. e FONG, T. M. Thapsigargin blocks the mobilisation of intracellular calcium caused by activation of human NK<sub>1</sub> receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Neurosci. Lett.**, **152**: 9-12, 1992.
- SHAIKH, M.B. e SIEGEL, A. Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defense rage behavior in the cat. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**: 2759-2779, 1994.
- SHIGEMOTO, R., NAKAYA, Y., NOMURA, S., OGAWA-MEGURO, R., OHISHI, H., KANEKO, T., NAKANISHI, S. e MIZUNO, N. Immunocytochemical localization of rat substance P receptor in the striatum. **Neurosci. Lett.**, **153**: 157-160, 1993.
- SHIRAYAMA, Y., MITSUSHIO, M., TAKASHIMA, H., ICHIKAWA, K. e TAKAHISHI, K. Reduction of substance P after chronic antidepressant treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. **Brain Res.**, **739**: 70-78, 1996.
- SHUGHRUE, P. J., LANE, M. V. e MERCHENTHALER, V. In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **372**: 395-414, 1996.

- SHULTS, C.W., QUIRION, B., CHRONWALL, B., CHASE, T.N. e O'DONOHUE, T.L. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, **5**: 1097-1128, 1984.
- SIEGEL, R. A., DUKER, E. M., FUCHS, E., PAHNKE, U. e WUTTKE, W. Responsiveness of mesolimbic, mesocortical, septal and hippocampal cholecystokinin and substance P neuronal system to stress in the male rat. **Neurochem. Int.**, **6**: 783-789, 1984.
- SILVEIRA, M. C. L., SANDNER, G. e GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.**, **56**: 115-118, 1993.
- SIVAM, S. P. & KRAUSE, J. E. Tachykinin systems in the spinal cord and basal ganglia: influence of neonatal capsaicin treatment or dopaminergic intervention on levels of peptides, substance P-encoding mRNAs, and substance P receptor mRNA. **Neurochem.**, **59**: 2278-2284, 1992.
- SMITH, D. W., HEWSON, L., FULLER, P., WILLIAMS, A. R., WHEELDON, A. e RUPNIAK, N. M. J. The substance P antagonist L-760,735 inhibits stress-induced NK<sub>1</sub> receptor internalisation in the basolateral amygdala. **Brain Res.**, **848**: 90-95, 1999.
- SNIDER, R. M., CONSTANTINE, J. W., LOWE, J. A., LONGO, K. P., LABEL, W. S., WOODY, H. A., DROZDA, S. E., DESAI, M. C., VINICK, F. J., SPENCER, R. W. e HESS, H. J. A potent non-peptide antagonist of the substance P (NK-1) receptors. **Science (Wash. DC)**, **251**: 435-437, 1991.
- STABLE, J.M., BERESFORD, I.J.M., ARKINSTALL, S., IRELAND, S.J., WALSH, D.M., SEALE, P.W., WARD, P. e HAGAN, R.M. GR138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK<sub>3</sub> receptors. **Neuropeptides**, **27**: 333-341, 1994.
- STERN, P. Sarajevo Symposium on Substance P. **Proc. Sci. Soc.**, Bosnia Herzegovina 1: 1961.

- STOESSL, A. J., BRACKSTONE, M., RAJAKUMAR, N. e GIBSON, C. J. Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK<sub>1</sub> tachykinin receptor agonist. **Brain res.**, **700**: 115-120, 1995.
- STRATTON, S.C., BERESFORD, I.J.M., HARVEY, F.J., TURPIN, M.P., HAGAN, R.M. e TYERS, M.B. Anxiolytic activity of tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonists in the mouse light-dark box. **European J. Pharmacol.**, **250**: 11-12, 1993.
- STRATTON, S.C., BERESFORD, I.J.M. e HAGAN, R.M. GR159897, a potent non-peptide tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonist, release suppressed behaviors in a novel aversive environment. **British J. Pharmacol.**, **112**: 49P, 1994.
- SUER, C., DOLU, N., OZESMI, C., SAHIN, O. e ULGEN, A. The relation between skin conductance level and plus-maze behavior in male mice. **Physiol. Behav.**, **64**:573-576, 1998.
- SUNDELIN, J. B., PROVVEDINI, D. M., WAHLESTEDT, C. R., LAURELL, H., POHL, J. S. e PETERSON, P. A. Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. **Eur. J. Biochem.**, **203**: 625-631, 1992.
- SUZUKI, H. e KONISHI, S. Roles of tachykinin in synaptic mechanisms in the rat amygdala. **Neuropeptides at the Millenium**, 1999.
- TAKAMAYA, H., OTA, Z. e OGAWA, N. Effects of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. **Regulat. Pept.**, **15**: 239-248, 1986.
- TAKEDA, Y., BLOUNT, P., SACHAIS, B. S., HERSHEY, A. D., RADDATZ, R. e KRAUSE, J. E. Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic AMP second messenger responses. **J. Neurochem.**, **59**: 740-745, 1992.

- TATEMOTO, K., LUNDENBERG, J. M., JORNVALL, H. e MUTT, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **128**: 947-953, 1985.
- TEIXEIRA, R.M., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., RAE, G.A. e DE LIMA, T.C.M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **European J. Pharmacol.**, **311**: 7-14, 1996.
- THOMAS, E. Forebrain mechanisms in the relief of fear: The role of the lateral septum. **Psychobiology**, **16**: 36-44, 1988.
- THOMAS, E., YADIN, E. e STRICKLAND, C. E. Septal unit activity during classical conditioning: A regional comparison. **Brain Res.**, **547**: 303-308, 1991.
- THOMAS, E. e EVANS, G. J. Septal inhibition of aversive emotional states. **Physiol. Behav.**, **31**: 673-678, 1983.
- TREAGER, G., NIALL, H.D., POTTS, J.T., LEEMAN, S.E. e CHANG, M.M. Synthesis of substance P. **Nature**, **232**: 87-89, 1971.
- TREIT, D. e MENARD, J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. **Behav. Neurosci.**, **111**: 653-658, 1997.
- TREIT, D., PESOLD, C. e ROTZINGER, S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. **Behav. Neurosci.**, **107**: 770-785, 1993.
- TSCHÖPE, C., PICARD, P., CULMAN, N.J., PRAT, A., ITOI, K., REGOLI, D., UNGER, T. e COUTURE, R. Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioral effects of tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the rat. **British J. Pharmacol.**, **107**: 750-755, 1992.
- UNGER, T. H., CAROLUS, S., DEMMERT, G., GATEN, D., LANG, R. E., MASER-GLUTH, C., STEINBERG, H. e VEELKEN, R. Substance P induces a cardiovascular

- defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.*, **63**: 812-820, 1988.
- VON EULER, V. e GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.*, **72**: 74-87, 1931.
- WEISKRANTZ, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **4**: 381-391, 1956.
- WEISS, S. M., WADSWORTH, G., FLETCHER, A., DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **23**: 265-271, 1998.
- WHITTY, C. J., WALKER, P. D., GOEBEL, D. J., POOSCH, M. S. e BANNON, M. J. Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra. *Neuroscience*, **64**: 419-425, 1995.
- WHITTY, C. J., PAUL, M. A. e BANNON, M. J. Neurokinin receptor mRNA localization in human midbrain dopamine neurons. *J. Comp. Neurol.*, **382**: 394-400, 1997.
- YADIN, E. e THOMAS, E. Septal correlates of conditioned inhibition and excitation. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **95**: 331-340, 1981.
- YIP, J. e CHAHL, L.A. Distribution of fos-like immunoreactivity in guinea-pig brain following administration of the neurokinin-1 receptor agonist, [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] substance P. *Neuroscience*, **2**: 663-673, 1999.
- ZANGROSSI JR., H. Modelos animais de ansiedade. In: GRAEFF, F. e HETEM, L. A. B. (Eds.). **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, 85-120, 1997.
- ZERNIG, G., TROGER, J. e SARIA, A. The substance P (NK<sub>1</sub>) receptor antagonist (+)-CP-96345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. *Neurosci. Lett.*, **143**: 169-172, 1992.