

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DENISE MARIA SOUSA DE MELLO

**MARCADORES BIOQUÍMICOS DA ANSIEDADE E DO ESTRESSE
ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NEUROKINÉRGICO NK₁**

FLORIANÓPOLIS – SC
2007

DENISE MARIA SOUSA DE MELLO

**MARCADORES BIOQUÍMICOS DA ANSIEDADE E DO ESTRESSE -
ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NEUROKINÉRGICO NK₁**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Co-Orientadora:
Profa. Dra. Marta Aparecida Paschoalini

**FLORIANÓPOLIS – SC
2007**

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Jamil Assreuy
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Universidade Federal de Santa Catarina

SUPLENTE:

Prof. Dr. Leandro Bertoglio
Universidade Federal de Santa Catarina

DATA DA DEFESA: 3 de agosto de 2007.

Dedico e Agradeço

Aos meus pais, **Antonio** e **Irene**, pelo seu amor, pela vida, pelos ensinamentos. Amo vocês.

Às minhas irmãs, **Susana** e **Rosana**, pela amizade incondicional, pelo carinho, pela força.

Especialmente

Ao **Evilásio**, pela presença na minha ausência.

Ao **Mateus**, um presente de Deus.

*Obrigado **Deus**, por este momento,
por este dia e por mais uma
prova da Tua existência.*

Agradecimentos Especiais

Agradeço às minhas orientadoras,

Profa. Thereza Cristina Monteiro de Lima

Profa. Marta Aparecida Paschoalini

Pela orientação, conhecimentos, paciência, confiança,
compreensão, amizade em todos os momentos...

AGRADECIMENTOS

"Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais,
que vêm de muito longe com a origem do indivíduo, e de
tão perto como o pulsar do coração".
(Pablo Neruda)

Ao **Raphael Branco**, técnico responsável pelo Laboratório de Anatomia da Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC, pela amizade, pela colaboração e disponibilidade, pelo comprometimento e responsabilidade, enfim meu fiel escudeiro.

Às minhas queridas ex-alunas **Débora Marcinichen Ramos, Daniela Madruga e Joana Matos Baratieri**, que aceitaram o desafio de *voluntariamente* fazer iniciação científica. Sem o esforço dessas gurias ficaria difícil realizar uma importante etapa desta tese. E ao bolsista **Dione Muniz L. Wolinger** pela continuidade do nosso trabalho.

Aos colegas do Laboratório da Farmacologia: **Raquel, Ana, Marcelo, Murilo, Tulani, Clarissa, Rebeca** e, de forma muito especial, ao *Filipe*.

À **Aliete, Arleide, Eliege, Marilane, Ivone e Zeni**, pela amizade, pelo apoio e pela cumplicidade nesses últimos quatro anos da minha vida.

À Prof. **Nara Maria Kuhn Göcks**, ex-reitora da UNIPLAC, pelo seu exemplo e sua dedicação, pelas oportunidades, pela confiança e amizade.

Ao Prof. **Jucílio Albuquerque Fernandes**, pelo auxílio técnico na dosagem da corticosterona no Serviço de Medicina Nuclear do HU/UFSC.

Aos colegas professores **Marli Adelina de Souza, Ester Santos de Souza e Robson Roman Pereira**, pela orientação e auxílio técnico na dosagem da corticosterona no HEMOSC/Lages.

À **UNIPLAC**, pelo apoio financeiro que permitiu a minha vinda/permanência no Programa de Doutorado em Farmacologia da UFSC.

“Gracias a la vida que me ha dado tanto ...”
(Mercedes Sosa)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
1. ESTRESSE	2
2. ANSIEDADE	10
3. SUBSTÂNCIA P NO ESTRESSE/ANSIEDADE	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1 - ANIMAIS.....	22
2 - PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	22
2.1 - Cirurgia Estereotáxica	22
2.2 - Adrenalectomia	23
2.3 Canulação da Veia Jugular	24
3 - DROGAS, SOLUÇÕES E TRATAMENTOS.....	25
3.1 - Injeção Intracerebroventricular.....	25
4 - MODELOS DE ESTRESSE	25
4.1 - Imobilização (IMO)	25
4.2 - Nado Forçado (NADO)	26
4.3 - Avaliação Comportamental no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	26
5 - HISTOLOGIA	27
6 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS	28
7 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
8. - ANÁLISE ESTATÍSTICA	30

RESULTADOS	32
1 - CURVAS TEMPO-RESPOSTA DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	33
1.1 - Efeito do estresse de imobilização (IMO) nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos	33
1.2 - Efeito do estresse de natação (NADO) nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos	34
1.3 - Efeito da exposição ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos	37
2 - INFLUÊNCIA DO EFEITO ANSIOGÊNICO PROVOCADO PELO TRATAMENTO CENTRAL COM SP NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS E O POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NK₁ NESSA RESPOSTA	43
2.1 - Efeito da injeção i.c.v. de SP, PBS ou WIN 51,708 (antagonista seletivo dos receptores NK ₁) em ratos submetidos ao LCE nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona	43
2.2 - Efeito da injeção i.c.v. de SP ou PBS em ratos nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona	48
2.3 - Efeito da administração i.c.v. de SP, PBS, WIN ou WIN/SP nos parâmetros etológicos e as medidas de exploração do LCE em ratos	52
3 - INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO PRÉVIA A UM ESTRESSOR NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS DE ESTRESSE, PARÂMETROS ETOLÓGICOS E MEDIDAS DE EXPLORAÇÃO NO LCE	54
3.1 - Efeito da exposição prévia a um estressor em animais submetidos ao LCE na concentração sanguínea de AGL, glicose e corticosterona	54
3.2 - Efeito da exposição prévia a um estressor em animais submetidos ao LCE nos parâmetros etológicos e as medidas de exploração do LCE em ratos	58
4 - PARTICIPAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL NO EFEITO DO ESTRESSE SOBRE AS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, PARÂMETROS ETOLÓGICOS E AS MEDIDAS DE EXPLORAÇÃO DO LCE	61
4.1 - Efeito da ADX nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona em ratos submetidos ou não ao LCE	61
4.2 - Efeito da ADX nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona em ratos submetidos ao LCE tratados com SP i.c.v.	65
4.3 - Efeito da ADX sobre os parâmetros etológicos e as medidas de exploração do LCE em ratos	69
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	108

LISTA DE ABREVIATURAS

A%	Porcentagem de entradas no braço aberto
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AGL	Ácidos Graxos Livres
ADX	Adrenalectomia
BF	Bolo Fecal
CRH	Hormônio Liberador da Corticotrofina
COR	Corticosterona
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GLI	Glicose
GRO	<i>Grooming</i>
HD	<i>Head-dipping</i>
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.c.v.	Injeção intracereboventricular
IMO	Imobilização
i.p.	Injeção intraperitoneal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NADO	Nado forçado
NKs	Neurocininas
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NPY	Neuropeptídeo Y
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
REA	<i>Rearing</i>
SAP	<i>Stretch attend posture</i>
SGA	Síndrome Geral de Adaptação
SHAM	Cirurgia fictícia
SP	Substância P
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SSA	Sistema Simpático-adrenal
TA%	Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAG	Triacilgliceróis
WIN 51,708	Antagonista seletivo dos receptores NK₁

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Efeito do estresse de IMO por 5 min nos níveis plasmáticos de AGL, glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos	35
Figura 2 -	Efeito do NADO nos níveis plasmáticos de AGL, glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos	38
Figura 3 -	Efeito do LCE nos níveis plasmáticos de AGL, glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos	41
Figura 4 -	Efeito da injeção i.c.v. de SP e PBS e de WIN/SP e WIN em ratos submetidos ao LCE por 5 min nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona	46
Figura 5 -	Efeito da injeção i.c.v. de SP e PBS em ratos submetidos ou não ao LCE nos níveis de AGL, glicose e corticosterona	51
Figura 6 -	Exploração do LCE por ratos 5 min após administração i.c.v. SP, PBS (controle) ou WIN, seguido ou não por SP	53
Figura 7 -	Efeito da combinação de dois estressores nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona	57
Figura 8 -	Exploração dos braços abertos do LCE por ratos após o estresse de IMO e NADO seguido do LCE por 5min	60
Figura 9 -	Alterações nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona em animais ADX ou SHAM, submetidos ou não ao LCE	64
Figura 10 -	Alterações nos níveis plasmáticos de AGL, glicose e corticosterona em animais ADX ou SHAM, com injeção i.c.v. de SP ou PBS, submetidos ao LCE	68
Figura 11 -	Efeito da adrenalectomia 5 min após a administração i.c.v. SP ou PBS na percentagem de entradas nos braços abertos.....	70
Figura 12 -	Efeito da adrenalectomia 5 min após a administração i.c.v. SP ou PBS sobre a percentagem de tempo gasto nos braços abertos.....	71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito da administração i.c.v. de SP, PBS, WIN ou WIN/SP nos parâmetros etológicos registrados do LCE em ratos..... 52**
- Tabela 2 - Influência de diferentes tipos de estresse aplicados imediatamente antes do LCE nos parâmetros etológicos registrados em ratos..... 58**
- Tabela 3 - Efeito da adrenalectomia nos parâmetros etológicos registrados no LCE em ratos..... 69**

RESUMO

Os hormônios relacionados ao estresse podem alterar funções metabólicas no tecido adiposo e no fígado. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é uma das vias endócrinas que promove lipólise aumentando os níveis de ácidos graxos livres (AGL) no sangue, além de indiretamente causar hiperglicemia. Assim, a lipólise e, conseqüentemente, os níveis de AGL e de glicose podem ser considerados marcadores confiáveis para a resposta individual a diferentes tipos de estresse. Por outro lado, a substância P (SP) está envolvida na patofisiologia de transtornos psiquiátricos graves e é considerado um neurotransmissor central do estresse. A SP está presente em inúmeras áreas cerebrais relacionadas ao estresse/ansiedade. No presente estudo, verificamos os níveis plasmáticos de AGL e glicose como marcadores metabólicos complementares do estresse/ansiedade em ratos machos adultos submetidos a diferentes estressores (imobilização, imobilização no frio, nado forçado, exposição ao labirinto em cruz elevado [LCE], e à administração intracerebroventricular de SP). A corticosterona sérica foi utilizada como marcador convencional de estresse. Nossos resultados mostraram elevados níveis de corticosterona, assim como de AGL e glicose (indicadores da mobilização de substratos energéticos induzidos pelo estresse), confirmando a situação aversiva induzida pela SP (parâmetros comportamentais acessados no LCE), e indicando a SP como um estressor “químico”, cujos efeitos envolvem receptores NK_1 pois o antagonista destes receptores reverte ambos efeitos, bioquímicos e comportamentais. Além disso, nossos resultados mostraram um aumento diferencial nos níveis de corticosterona, AGL e glicose após cada estressor, sendo a duração deste efeito dependente do tipo de estressor. Nossos resultados também mostraram que a mobilização de reservas energéticas, inferida pelos níveis de AGL, é um marcador confiável para diferentes condições de estresse agudo, sendo em algumas situações mais sensível que a corticosterona. Ainda, a adrenalectomia não impediu mobilização de AGL, mostrando que este marcador parece depender predominantemente de uma ativação do SNS.

ABSTRACT

Stress hormones can alter metabolic functions in white adipose tissue and liver. The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis is the endocrine pathway that promotes lipolysis increasing free fatty acid levels (FFA) in blood, besides indirectly causing hyperglycemia. Thus, lipolysis and, consequently, free fatty acids and glucose levels, could be considered reliable markers to individual responses to different forms of stress. Substance P (SP) is involved in the pathophysiology of several psychiatric disorders and is considered a central neurotransmitter related to stress situation. SP is distributed in various brain regions considered to be involved in the control of emotional states such as stress/anxiety. In the present study we have verified the plasmatic levels of free fatty acids and glucose as metabolic markers of stress/anxiety conditions in adult male rats submitted to different stressors (restraint, cold restraint, forced swimming stress and exposure to plus-maze) and in the anxiogenic-like effects of SP, as evaluated on the elevated plus-maze (EPM). Serum corticosterone was used as the traditional stress marker, while the plasma FFA and glucose were used as alternative anxiety/stress markers. Our results show elevated levels of corticosterone, as well as of FFA and glucose (indicators of stress-induced mobilization of energy substrate), confirming the aversive situation induced by SP (behaviorally assessed in the EPM) and indicating SP as a “chemical” stressor which effects involve the NK1 receptors. Moreover, our findings show that plasma corticosterone levels increased significantly after each stressor as well as free fatty acids and glucose with a time-course that differs depending on the nature of stress. Our results also show that the mobilization of energy reserves, inferred by the free fatty acids levels, is a reliable marker for different acute stressful conditions, being in some conditions even more sensitive than corticosterone. Moreover, adrenalectomy did not avoid the FFA mobilization, showing that this stress marker seems to predominantly depend on a SNS activation.

“Qualquer idéia que te agrade,
Por isso mesmo... é tua.
O autor nada mais fez que vestir a verdade
Que dentro em ti se achava inteiramente nua.”
(Mário Quintana)

INTRODUÇÃO

1. ESTRESSE

A vida existe devido à manutenção da homeostase, constantemente desafiada por forças adversas intrínsecas e extrínsecas. O organismo reage a essas forças por meio de ajustes autonômicos e respostas comportamentais. O estresse é, assim, definido como um estado de homeostase ameaçado, ou em desequilíbrio, e é controlado por uma série de respostas viscerais e comportamentais, que restabelecem a homeostase (Carrasco e Van de Kar, 2003).

Claude Bernard, em 1870, definiu o conceito de “meio interno” e ressaltou a importância da manutenção de seu equilíbrio para a sobrevivência das células e do organismo, mas não deu nenhuma denominação específica a esta condição de equilíbrio. Walter Cannon, em concordância com o conceito de Claude Bernard, denominou como homeostase essa condição de equilíbrio do meio interno. Ele também elaborou o conceito de “reação de emergência” como uma resposta de *luta ou fuga (fight or flight)* a um desafio de magnitude suficiente, para ativar a liberação de adrenalina da medula adrenal e de noradrenalina de terminais nervosos simpáticos (Stratakis e Chrousos, 1995; Carrasco e Van de Kar, 2003).

Em 1936, Hans Selye elaborou o conceito de *Síndrome Geral de Adaptação (SGA)* como uma "resposta inespecífica do organismo a qualquer demanda a ele imposta". Essas demandas que podem alterar a homeostasia são chamadas de agentes estressores (Charmandari *et al.*, 2005). Selye delimitou três fases da SGA: a fase inicial de alarme, descrita como o impacto inicial causado pelo agente agressor no organismo; a fase de resistência orgânica, no caso de o agente agressor permanecer no organismo por um período mais prolongado, fase durante a qual os mecanismos de adaptação desse organismo entram em ação tendo como objetivo a homeostase e a fase de esgotamento, exaustão ou fadiga, resultado de um longo e intenso esforço durante o qual o organismo tentou alcançar a

homeostase e a adaptação (Selye, 1936; Van de Kar *et al.*, 1991; Huether *et al.*, 1999; Carrasco e Van de Kar, 2003; McEwen, 2005).

Porém, os níveis necessários de atividade fisiológica para restabelecer ou manter a homeostasia diferem; e essa diferenciação depende das condições em que cada organismo se encontra. Sterling e Eyer (1988) denominaram “alostasia” os níveis de atividade requerida para “manter a estabilidade durante uma mudança” ou seja, para que o organismo possa adaptar-se a uma nova condição. Aos efeitos da ativação de efetores alostáticos, ou seja, dos fatores envolvidos na adaptação por um período intermitente ou contínuo, McEwen (1998) denominou “carga alostática”. Esses conceitos propostos recentemente ampliam a teoria homeostática inicial e podem ajudar a compreender as conseqüências do estresse agudo ou crônico sobre os organismos.

Diante desses novos conceitos, o estresse pode ser redefinido como a reação que é desencadeada quando as expectativas, geneticamente programadas, estabelecidas pelo aprendizado prévio ou deduzidas pelas circunstâncias, não correspondem às percepções reais ou antecipadas do ambiente externo e interno. Esta diferença entre o que é esperado, ou programado, e o que é observado, ou sentido, desencadeiam respostas compensatórias que constituem a reação de estresse (McEwen, 2000; Carrasco e Van de Kar, 2003). A resposta ao estresse é resultado da interação entre as características do indivíduo e as demandas do meio, ou seja, as discrepâncias entre o meio externo e interno e a percepção do indivíduo quanto à sua capacidade de resposta. Esta resposta ao estressor compreende aspectos cognitivos, comportamentais e viscerais, visando propiciar uma melhor percepção da situação e de suas demandas, assim como um processamento mais rápido da informação disponível, possibilitando uma busca de soluções, selecionando comportamentos adequados e preparando o organismo para agir de maneira rápida e eficiente (McEwen, 2000). A sobreposição destes três níveis (visceral, cognitivo e comportamental) é eficaz até certo limite, o qual, uma vez

ultrapassado, poderá desencadear um efeito desorganizador (Van de Kar e Blair, 1999; Carrasco e Van de Kar, 2003).

Várias estruturas cerebrais estão envolvidas na resposta ao estressor. O conjunto de componentes mobilizados para adaptação do organismo a situações de estresse é designado como “sistema de estresse”. Seus componentes são estruturas do sistema nervoso central (SNC) como o sistema límbico cortical e sub-cortical, componentes endócrinos como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e as catecolaminas liberadas pela medula adrenal (Dunn e Berridge, 1990; Van de Kar e Blair, 1999; Pacák e Palkovits, 2001; Aguilera *et al.*, 2001; González e Escobar, 2002; Tsigos e Chrousos, 2002; Charmandari *et al.*, 2005).

As duas respostas clássicas ao estresse são a rápida resposta da reação de *luta ou fuga*, e a elevação da concentração sanguínea de cortisol (humanos) ou corticosterona (ratos). Para as respostas rápidas, há também o envolvimento do sistema nervoso autônomo (SNA). O sistema nervoso simpático (SNS), ativado, libera a noradrenalina neuronal e secreta adrenalina pela medula adrenal. A ativação do SNA é responsável por alterações fisiológicas como aumento da frequência cardíaca, aumento do fluxo sanguíneo para músculos, aumento da glicemia, aumento do metabolismo celular e da atividade mental, permitindo um desempenho físico e mental aumentado (Dunn e Berridge, 1990; Van de Kar e Blair, 1999; Pacák e Palkovits, 2001; Aguilera *et al.*, 2001; González e Escobar, 2002; De Kloet *et al.*, 2005; Charmandari *et al.*, 2005).

O controle central da secreção de glicocorticóides é regulado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que, sob condições de estresse, secreta o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) que, por sua vez, induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, resultando no aumento da produção de corticosterona na zona fasciculada das adrenais (Delbende, *et al.*, 1992; Pihoker *et al.*, 1993; Pacák *et al.*, 1995; Kvetnanský, *et al.*, 1995; Fukuhara *et al.*, 1996; Herman e Cullinan, 1997;

Jezova *et al.*, 1999). A corticosterona tem uma importância primária nos estados de estresse, influenciando o metabolismo celular e gerando uma mobilização de substratos energéticos necessários para a produção de respostas fisiológicas adaptativas à presença dos agentes estressores (Pacák e Palkovits, 2001; González e Escobar, 2002).

A magnitude da resposta do eixo HPA ao estresse induzida pelo PVN, via liberação de CRH, é limitada por mecanismos neuronais e hormonais, para manter os níveis de corticosterona dentro de limites toleráveis. O PVN parece ser o ponto crucial na regulação do eixo HPA (Herman e Cullinan, 1997). A ativação do eixo HPA é considerada um dos principais indicadores de estresse (Martí *et al.*, 1999). Assim, foi observado um aumento significativo do CRH e de corticosterona em ratos submetidos à laparotomia e craniotomia, demonstrando que o estresse cirúrgico ativa o eixo HPA (Dekeyser *et al.*, 2000), assim como ocorre em ratos submetidos ao estresse crônico por imobilização (Gómez *et al.*, 1996; Jezova *et al.*, 1999). Em ratos jovens, foi demonstrado um aumento marcante na resposta adrenocortical ao estresse induzido pela privação materna (Rosenfeld *et al.*, 1992; Pihoker *et al.* 1993). Um aumento da concentração plasmática de ACTH e de corticosterona foi observado em ratos expostos a vários agentes estressores – imobilização, frio, hemorragia, hipoglicemia causada pela injeção de insulina, dor e lesão tecidual causada pela injeção de formalina (Pacák *et al.*, 1995).

A corticosterona é o marcador mais utilizado para caracterizar uma situação de estresse. Mas na literatura há evidências de que outros marcadores de estresse também podem ser utilizados (Marti e Armário, 1998). Em ratos submetidos a um estresse agudo, hormônios derivados da pro-opiomelanocortina – POMC (ex., ACTH), e a prolactina parecem refletir a intensidade do estresse experimentado pelos animais (Euker *et al.*, 1975; Armario *et al.*, 1986; Marti e Armario, 1998; Reis *et al.*, 1998; Márquez *et al.*, 2006). Também foi demonstrado, em ratos, que o nível plasmático de adrenalina e noradrenalina podem ser considerados como

marcadores de estresse (Natelson *et al.*, 1987; de Boer *et al.*, 1990). O aumento dos níveis de cálcio sérico foi usado como marcador de estresse em camundongos submetidos a estresse físico - choque nas patas – e estresse emocional - animais que presenciavam a sessão de choque de outro animal (Sutoo e Akiyama, 2002), e em humanos, após a exposição ao frio (Lennquist, 1975). Verago e colaboradores (2001) submeteram ratos a três sessões de choque nas patas e dosaram, além dos níveis sanguíneos de corticosterona, os de glicose, de triacilgliceróis (TAG) e de glicerol. A corticosterona aumentou significativamente após cada sessão de estresse; os níveis de TAG aumentaram somente após a primeira sessão; os de glicose aumentaram apenas após a segunda e a terceira sessão e os níveis de glicerol não foram alterados. O aumento nos níveis séricos de colesterol foi usado como indicador do estresse crônico por imobilização em ratos (Jain *et al.*, 2000).

Assim, o aumento na concentração plasmática destes hormônios do estresse inicia alterações metabólicas que produzem mobilização de substratos energéticos a partir de tecidos de armazenamento, como o hepático e adiposo branco. O aumento da mobilização metabólica resulta em disponibilização de carboidratos e lipídios para a atividade celular, as quais contribuem para a manutenção da homeostasia em situações de estresse, por meio de ajustes de outros sistemas como, por exemplo, o cardiovascular, o respiratório, o nervoso e o muscular (Selye, 1936; Carrasco e Van de Kar, 2003).

A literatura tem mostrado o aumento da concentração de substratos energéticos no sangue, acompanhado de alterações comportamentais induzidas pela ansiedade e por outras modalidades de estresse (Hofmann e Kleemann, 1991; Widmaier *et al.*, 1992; Wennlund *et al.*, 1994; Jeukendrup *et al.*, 1998; Ottosson *et al.*, 2000). Alguns trabalhos propuseram que os níveis de glicose circulante poderiam ser usados como um marcador confiável de estresse em ratos. Márquez e colaboradores (2004), pesquisando as diferenças individuais na sensibilidade ao estresse em linhagens consangüíneas de ratos (Sprague-Dawley),

submeteram os animais ao estresse de imobilização por 1h/dia durante 13 dias e usaram como marcadores de estresse, além da corticosterona e do ACTH, os níveis plasmáticos de glicose. O aumento na glicemia foi semelhante ao aumento de outros marcadores nos primeiros dias do experimento. A hiperglicemia foi verificada também em ratos expostos agudamente à imobilização (Armario *et al.*, 1990; Reis *et al.*, 1998).

O pâncreas endócrino, a medula adrenal e o fígado são órgãos importantes na regulação dos níveis de glicose sanguínea. Além deste controle endócrino, sinais nervosos, central e periférico, podem contribuir para o controle da glicemia (Nijima, 1989). Relatos da literatura mostram que a regulação autonômica e hormonal da glicemia está subordinada ao controle exercido pelo SNC, possibilitando, com isso, elevação rápida, intensa e preventiva da glicemia em situações de emergência ou de demanda energética elevada (exercício físico e exposição aguda ao frio) e também durante alterações metabólicas que acompanham diferentes comportamentos emitidos. A estimulação elétrica do hipotálamo de coelhos provocou uma elevação da glicemia quando pontos ao longo da área hipotalâmica medial eram estimulados (Shimazu *et al.*, 1966). A partir destes estudos, inúmeros outros surgiram na literatura, apontando o envolvimento do hipotálamo no controle do metabolismo de carboidratos (Benzo, 1982; Barbosa e Migliorini, 1982; Leibowitz, 1988; Ionescu *et al.*, 1989; Steffens *et al.*, 1984; Timo-Iaria, 1990; Brito, 1996; Zaia *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2003; 2005).

Wennlund e colaboradores (1994) sugeriram que a lipólise é um marcador de maior valor para as respostas individuais a diferentes formas de estresse. A este respeito, o tecido adiposo branco (TAB) tem se revelado como um local de um metabolismo ativo capaz de sintetizar e armazenar TAG, liberar ácidos graxos livres (AGL) e glicerol para o sangue, em situações de demanda energética como jejum, exercício físico ou exposição aguda ao frio (Coimbra e Migliorini, 1988; Coppack *et al.*, 1994; Migliorini *et al.*, 1997; Bamshad *et al.*,

1998; Lima *et al.*, 1998; Trayhum e Beattie, 2001; Lacerda *et al.*, 2006; Balthazar *et al.*, 2007).

Mudanças rápidas da liberação de AGL, como as exigidas durante a exposição ao frio ou durante exercícios, são mediadas diretamente por impulsos nervosos. Vários estudos apontam o SNS como o principal regulador da mobilização de AGL no TAB (Coimbra e Migliorini, 1988; Carey, 1998; Bamshad *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Rayner, 2001; Demas e Bartness, 2001; Lacerda *et al.*, 2006). A estimulação elétrica, *in vitro*, de nervos simpáticos que inervam o TAB epididimal de ratos ou coelhos provoca rápida liberação de AGL para o meio de incubação (Correl, 1961, 1963a), sendo esta uma evidência direta de que a inervação simpática promove lipomobilização. Os níveis de AGL no plasma apresentam uma queda após a administração de bloqueadores ganglionares ou adrenérgicos (Goodman e Knobil, 1959; Havel e Godfien 1959a e b), sugerindo uma atividade tônica de nervos simpáticos estimulando a lipólise. No TAB, as catecolaminas envolvem ambos os receptores adrenérgicos α (inibidores) e β (ativadores) com efeitos sobre a lipólise (Fain e Garcíja-Sáinz, 1983; Coppack *et al.*, 1994). A noradrenalina liberada pelas terminações simpáticas no TAB aumenta a mobilização de AGL, primariamente, por acelerar a hidrólise dos TAG. Aumento da concentração plasmática de AGL e glicerol foram observados em cães, e em humanos, após infusão endovenosa de catecolaminas (Connolly *et al.*, 1991). Galitzky e colaboradores (1993) observaram a elevação de AGL no plasma de cães durante a infusão de noradrenalina, de adrenalina, de isoproterenol, de BRL37344 e de outros agonistas beta-adrenérgicos. Darimont e colaboradores (1996) demonstraram, *in situ*, uma maior liberação de glicerol pelo tecido adiposo de ratos, após infusão de isoproterenol.

Em contraste, as catecolaminas circulantes não desempenham papel importante na lipomobilização, pois os níveis dos AGL no plasma não são reduzidos em cães adrenalectomizados mantidos com cortisona (Havel e Golfien, 1959a e b). Ratos

adrenomedulectomizados expostos ao frio conseguiam manter a temperatura corporal e a elevação dos níveis plasmáticos de AGL tão bem como os animais intactos (Gilgen *et al.*, 1962). No entanto, ratos expostos ao frio apresentaram um aumento no *turnover* de noradrenalina no TAB e aumento dos níveis plasmáticos de AGL, resposta que não foi bloqueada em animais adrenomedulectomizados (Garafolo *et al.*, 1996). Em ratos adrenomedulectomizados houve uma supressão da hiperglicemia, mas não do aumento dos AGL, induzido pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) de 2-DG (2-dioxiglicose), um inibidor competitivo da glicose (Paschoalini e Migliorini, 1990). Também durante o exercício prolongado ocorre a elevação da concentração de AGL no plasma de indivíduos normais (Basu *et al.*, 1960; Friedberg *et al.*, 1963; Havel *et al.*, 1963) e a adrenalectomia não modifica essa resposta durante o exercício (Basu *et al.*, 1960; Lima *et al.*, 1998).

Há ainda várias evidências de que o hipotálamo também está envolvido no controle neural da mobilização de AGL no TAB. A estimulação elétrica do hipotálamo de coelhos (Correl, 1963b; Kumon *et al.*, 1976 e 1977), macacos (Correl, 1963b), cães (Öro *et al.*, 1965), gatos (Barkai e Allweis, 1972a) e ratos (Barkai e Allweis, 1972b) provoca aumento dos níveis de AGL e glicerol no plasma dessas espécies. A desconexão hipotalâmica anterior interfere na mobilização de AGL do TAB durante o jejum, o exercício físico e a exposição ao frio (Gross e Migliorini, 1977), situações fisiológicas durante as quais o SNS intervém amplamente. Esses estudos indicam que as áreas do SNC responsáveis pelo controle neural da lipólise se situam rostralmente ao hipotálamo médio, ou ainda, no local próximo à lesão causada durante a desconexão hipotalâmica. Coimbra e Migliorini (1983) sugeriram a existência de uma via longitudinal que vincula a área pré-óptica, o hipotálamo lateral e o hipotálamo posterior, e que participa do processo de mobilização de AGL em ratos. A ativação de glicorreceptores sensíveis à insulina, localizados na área pré-óptica, enviaria impulsos a fibras simpáticas que inervam o TAB por meio de projeções às áreas hipotalâmica

lateral e hipotalâmica posterior (Coimbra e Migliorini, 1986; Ferreira *et al.*, 1999). A este respeito, Ruffin e Nicolaidis (1999) sugeriram que o hipotálamo ventro-medial é capaz de induzir a lipólise. Além disso, a utilização de lipídios e a taxa metabólica, eventos associados à alteração da atividade locomotora, são aumentadas pela estimulação elétrica do hipotálamo ventro-medial.

2. ANSIEDADE

O conceito de estresse pressupõe que, após a reação de estresse, o organismo recupera a homeostasia, ou seja, garante a manutenção do equilíbrio interno, apesar das variações do meio externo. Esta constância do meio interno é obtida com a regulação por retroalimentação negativa, que direciona para o retorno à situação inicial. Recentemente, alguns autores propuseram um novo conceito para designar a estabilidade do meio interno, nas situações de mudança fisiológica a que o organismo é submetido constantemente. O novo conceito propõe que a homeostasia existe apenas para alguns poucos parâmetros fisiológicos, por exemplo, a constância do pH ou osmolaridade dos fluidos corporais, enquanto os demais parâmetros se alteram para garanti-la. Assim sendo, sistemas efetores, tais como o SNC e o sistema hormonal, são ativados para promover a adaptação do organismo à nova situação e não para o retorno a uma situação anterior que não mais existe. A este conceito, segundo o qual “a estabilidade é mantida por meio da mudança” foi dado o nome de alostasia (Sterling e Eyer, 1988). Os mecanismos acionados são chamados de mecanismos alostáticos (Chrousos e Gold, 1992; Mc Ewen, 2000; 2005; Santos e Spadari-Bratfisch, 2006).

O conjunto dos mecanismos alostáticos ativos em determinado instante constitui a “carga alostática” e o processo por ele desencadeado é denominado de adaptação. No entanto, se a carga alostática é excessiva ou persiste por muito tempo, seja de modo contínuo ou

intermitente, passa a configurar uma outra situação denominada de “sobrecarga alostática”. Essa situação pode resultar em má-adaptação devida à ativação exacerbada dos sistemas efetores (Santos e Spadari-Bratfisch, 2006), o que promove as mesmas conseqüências da fase de exaustão da SGA de Selye, podendo surgir, assim, as chamadas doenças relacionadas ao estresse.

Acredita-se que o estresse, a ansiedade e a depressão são processos inter-relacionados. O estresse está implicado na etiologia tanto da ansiedade quanto da depressão ou é consequência delas. Modelos animais de ansiedade e depressão são baseados na exposição de animais a situações de estresse de maior ou menor intensidade, para medir respostas comportamentais e/ou viscerais (Anisman e Zacharko, 1982; Peeters e Broekkamp, 1994; Gorwood, 1999; Bremner, 1999).

O estresse, a ansiedade e a depressão têm efeitos similares no eixo HPA e no sistema funcional das catecolaminas (Holsboer, 1999), sugerindo que há considerável sobreposição fisiológica entre os três sistemas. A ativação do eixo HPA por estímulos estressores desencadeia a liberação do hormônio CRH do PVN, seguido pela liberação do ACTH hipofisário e dos glicocorticóides da adrenal. O CRH é um potente mediador das respostas endócrina, autonômica e imune para o estresse (Owens e Nemeroff, 1991; De Souza, 1995; Holsboer e Barden, 1996; González e Escobar, 2002). O CRH tem sido implicado também na modulação de diferentes tipos de comportamento, incluindo aqueles relacionados à função motora, ingestão de alimentos, reprodução e ansiedade (Dunn e Berridge, 1990; De Souza, 1995; Brandão *et al.*, 2003). Uma propriedade ansiogênica atribuída ao CRH e uma disfunção no sistema CRH estariam relacionadas, conforme sugerido por Steckler e Holsboer (1999), a uma variedade de distúrbios psiquiátricos envolvidos com estresse, tais como ansiedade, depressão e distúrbios alimentares (Treit, 1985; Holsboer *et al.*, 1992; Skutella *et al.*, 1998).

Inúmeras pesquisas no campo da ansiedade têm mostrado que as raízes biológicas da

ansiedade encontram-se nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a diferentes estímulos em situações de perigo (Graeff, 1983; Sandford *et al.*; 2000). A ansiedade é descrita como um estado emocional de grande valor adaptativo que é experienciado de maneira subjetiva como sendo desagradável, tendo como características o medo, a apreensão, o temor e sentimentos correlatos. Sua expressão envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (Graeff, 1983; 1994). Ao contrário do medo, que se manifesta em situações em que o perigo é iminente, a ansiedade se manifesta em situações onde o perigo é apenas potencial e incerto (Graeff, 1983; Rodgers *et al.*, 1997; Lang, *et al.*, 2000).

As manifestações psicológicas e fisiológicas da ansiedade têm sido extensamente estudadas, mas os mecanismos biológicos envolvidos na sua regulação não são completamente conhecidos. Estudos animais sugerem que reações análogas ao medo humano são mediadas e integradas por substratos neuroanatômicos localizados no sistema límbico, como amígdala, septo, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal [PAG] (Kopchia *et al.*, 1992; Yadin *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Graeff, 1994; Sanders e Shekhar, 1995; Aguiar e Brandão, 1996; De Souza *et al.*, 1998; Sandford *et al.*; 2000).

Muitos neurotransmissores parecem estar envolvidos na gênese e modulação da ansiedade, entre eles a noradrenalina, a serotonina, a dopamina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glicina, os aminoácidos excitatórios, o CRH, a corticosterona e a colecistocinina, entre outros neuropeptídeos (Behan *et al.*, 1996 a,b; Southwich *et al.*, 1999; Millan, 2003).

Atualmente, existem várias evidências de que os neuropeptídeos desempenham um papel importante na modulação do estado de ansiedade (Harro *et al.*, 1993; Wettstein *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1996; Strohle *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998; Gavioli, *et al.*, 1999; Rupniak *et al.*, 2000). A este respeito, segundo Otsuka e Yoshioka (1993), a substância P (SP), que é um co-transmissor de alguns dos neurotransmissores já citados, assim como outras neurocininas (NKs), está distribuída por inúmeras regiões do SNC envolvidas na

modulação da ansiedade (Brownstein *et al.*, 1976; Kanazawa e Jessell, 1976; Ljungdahl *et al.*, 1978; Gale *et al.*, 1978; Cuello e Kanazawa, 1978; Pickel *et al.*, 1979; Cooper *et al.*, 1981; Douglas *et al.*, 1982; Tsuruo *et al.*, 1983; Beach e McGeer, 1984; Panula *et al.*, 1984; Loopuijt e Van der Kooy, 1985; Hayashi e Oshima, 1986; Arai e Emson *et al.*, 1986; Nagashima *et al.*, 1989; Shaik e Siegel, 1994; Graeff, 1994).

Na verdade, o primeiro neuropeptídeo identificado foi a substância P (SP), descoberta por Von Euler e Gaddum, em 1931. Entretanto, a estrutura química da SP foi descrita somente em 1971, quando Susan Leeman e colaboradores demonstraram que a SP era um peptídeo C-terminal. Após a identificação da SP, vários outros peptídeos a ela relacionados foram descritos (Saria, 1999; Hökfelt *et al.*, 2000; 2003).

As NKs incluem a SP, a neurocinina A (NKA), a neurocinina B (NKB), e as formas expandidas de NKA (neuropeptídeo K = NPK; neuropeptídeo Y = NPY), entre outras. Suas atividades "agonísticas" estão associadas ao domínio carboxi-terminal (C-terminal = Phe-X-Gli-Leu-Met-NH₂), que é comum a todos estes peptídeos (Mussap *et al.*, 1993; Stahl, 1999), denominados também de taquicininas (McLean, 1996). O domínio amino-terminal (N-terminal), por sua vez, confere seletividade aos diferentes tipos de receptores (Piedimonte, 1995; Saria, 1999; Strand, 1999; Hökfelt *et al.*, 2000; 2003).

Os efeitos fisiológicos das NKs são mediados por três tipos de receptores, NK₁, NK₂ e NK₃ (Regoli *et al.*, 1989; Guard e Watson, 2003; Nakanishi, 1991; Seabrook *et al.*, 1995; Stahl, 1999; Pennefather *et al.*, 2004). As NKs endógenas podem interagir com os três tipos de receptores, com diferentes graus de afinidade. Assim, a SP é o agonista preferencial do receptor NK₁, enquanto a NKA e a NKB são agonistas preferenciais para os receptores NK₂ e NK₃, respectivamente (Maggi *et al.*, 1993; Stables *et al.*, 1994; Culman e Unger, 1995; Patacchini e Maggi, 1995; Strand, 1999).

As NKs encontram-se amplamente distribuídas no sistema nervoso de mamíferos e

estão envolvidas na regulação de várias funções fisiopatológicas (Nakanishi, 1991; Otsuka e Yoshioka, 1993; Patacchini e Maggi, 1995), como a transmissão dolorosa, vasodilatação, broncoconstrição, contração da musculatura lisa, ativação do sistema imunológico, inflamação neurogênica e respostas comportamentais (Pernow, 1983; Maggio, 1988; Strand, 1999). A SP é o neuropeptídeo mais abundante no cérebro do rato (Arai e Emson, 1986; Jessop *et al.*, 1990). Os novos membros da família das takicininas, a hemocinina (HK-1) e as endocininas A, B, C e D são primariamente expressas em células não neuronais (Zhang *et al.*, 2000; Kurtz *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2003).

A SP foi o primeiro peptídeo neuroativo identificado e também o primeiro a ser proposto com função de transmissor ou modulador no sistema nervoso (Hasenohrl *et al.*, 2000). A SP, agonista natural e preferencial dos receptores NK₁, induz reações cardiovasculares de defesa em ratos (Unger *et al.*, 1988; Itoi *et al.*, 1992; Culman e Unger, 1995; De Araújo *et al.*, 1998) e apresenta efeitos pró-aversivos quando microinjetada na PAG (Aguiar e Brandão, 1996). A SP, e seu receptor preferencial NK₁, é encontrada na amígdala, septo, hipocampo, hipotálamo e PAG (Severini *et al.*, 2002; Pennefather *et al.*, 2004).

Os agonistas seletivos de receptores NK₁ produzem também uma gama de respostas comportamentais nociceptivas, que incluem comportamentos compulsivos de coçar, morder e lambe os membros posteriores ou o abdômen e o tórax em ratos e camundongos (Papir-Kricheli *et al.*, 1987; Laneuville *et al.*, 1988; Brent *et al.*, 1994). Uma resposta comportamental similar, incluindo aumento da atividade locomotora, foi observada após a injeção i.c.v. de SP em cobaias (Brent *et al.*, 1988; Brent *et al.*, 1994).

Estudos prévios mostraram que a ansiedade experimental pode ser modulada pela manipulação de mecanismos centrais que envolvem os receptores neurocinérgicos NK₁, NK₂ e NK₃. Dados da literatura mostram uma ação ‘ansiolítica’ da SP que, quando administrada centralmente (i.c.v.), produziu uma diminuição dos níveis plasmáticos de ACTH (Larsen *et*

al., 1993a), sendo que a injeção de um antagonista NK₁ aumentou os níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona (Larsen *et al.*, 1993b). Além disso, antagonistas NK₁ aumentaram mRNA para CRH na região parvicelular do núcleo hipotalâmico paraventricular (Faria *et al.*, 1991).

Por outro lado, evidências diretas e indiretas sustentam o papel ansiogênico da SP e uma ação ansiolítica de seus antagonistas (Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2001; Santarelli *et al.*, 2001). A administração intraperitoneal (i.p.) de um antagonista do receptor NK₁, CP 96345, em camundongos, promove um aumento tanto na latência para a entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro como no tempo despendido no compartimento claro, sugerindo uma ação do tipo ansiolítica para esse composto (Zernig *et al.*, 1992; 1993).

Teixeira e colaboradores (1996) mostraram que a estimulação dos receptores NK₁ e NK₂ promove um efeito do tipo ansiogênico, em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). O bloqueio seletivo dos receptores NK₁ pelo FK-888, em contrapartida, produz um efeito contrário, isto é, uma ação do tipo ansiolítica no mesmo modelo experimental (Teixeira *et al.*, 1996). Outro antagonista de receptores NK₁, o CGP 49823, apresentou um efeito do tipo ansiolítico no teste de interação social em ratos (File, 1997), reforçando a hipótese de que a SP desempenha papel modulatório nos estados de ansiedade experimental (Almay *et al.*, 1988; Zernig *et al.*, 1992; Hagan e McLean, 1991; Stratton *et al.*, 1993; 1994). A injeção de L760735, outro antagonista NK₁, na amígdala, apresentou efeito 'ansiogênico' em cobaias (Boyce *et al.*, 2001). A administração de GR73632 e L733060 (0.1 nmol), agonistas NK₁, produziu ativação motora em cobaias (Severini *et al.*, 2002).

Estudos feitos com camundongos *knockout* para NK₁ confirmaram o efeito ansiogênico da SP. Nesse estudo, os camundongos *knockout* mostraram redução de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, ao medo da novidade e no paradigma da

separação materna (Santarelli *et al.*, 2001). Além disso, em ratos, a injeção intraseptal de FK-888, um antagonista NK₁, inibiu a resposta do tipo ansiogênica promovida pela administração central de SP (Gavioli *et al.*, 2002), apontando o septo lateral como um sítio importante na mediação desta resposta da SP (Gavioli *et al.*, 1999).

3. SUBSTÂNCIA P NO ESTRESSE/ANSIEDADE

Um estímulo estressor representa um evento clássico de ameaça, perigo que atua em circuitos neuronais no cérebro para gerar um complexo padrão de resposta cardiovascular, endócrina e comportamental. Embora a questão sobre a especificidade do neurotransmissor envolvido nesses circuitos não tenha sido ainda respondida, vários esforços têm sido feitos para integrar as neurocininas, especificamente a SP, com as reações centrais do estresse (Culman *et al.*, 1997; Rupniak *et al.*, 2000).

Vários autores mostraram rápidas mudanças na quantidade de SP e seus receptores em distintas áreas do cérebro sob vários estímulos estressores (Bannon *et al.*, 1986; Takayama *et al.*, Siegel *et al.*, 1987; Rósen *et al.*, 1992). Após verificarem um aumento dos níveis sanguíneos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos, Fehder e colaboradores (1997), propuseram que a SP serviria como um mediador das reações imunológicas produzidas pelo estresse. Na verdade, várias regiões cerebrais implicadas em reações de defesa e ansiedade, como o hipotálamo, amígdala, hipocampo e a PAG (Cuello e Kanazawa, 1978; Shaikh e Siegel, 1994) expressam densidades significantes de receptores para NKs, além de fibras nervosas e corpos celulares imunorreativos a SP (para revisão, ver Otsuka e Yoshioka, 1993). Estudos neuroquímicos demonstraram mudanças nos níveis de SP em regiões do cérebro em resposta a estímulos estressores. Em ratos imobilizados, por exemplo, houve aumento na SP na PAG (Rosen *et al.*, 1992) e um aumento nos níveis de SP foi

verificado no septo e no hipocampo de animais submetidos ao choque nas patas, por 60 min (Siegel *et al.*, 1987).

A SP, em particular, parece ser um neurotransmissor bastante comum no SNC (Cuello e Kanazawa, 1978) e tem sido envolvida em várias funções neuroendócrinas (Jessop *et al.*, 1992). O hipotálamo de mamíferos contém uma alta concentração de SP (Brownstein *et al.*, 1976; Kanazawa e Jessel, 1976; Cuello e Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978; Tsuruo *et al.*, 1983; Panula *et al.*, 1984; Siegel *et al.*, 1987). O hipotálamo parece mobilizar as alterações endócrinas que acompanham as reações de defesa, como liberação de ACTH, prolactina, endorfinas, entre outros hormônios e peptídeos. Essa função do hipotálamo é realizada através de suas ligações com a hipófise anterior, via sistema porta-hipofisário e, mais diretamente, com a hipófise posterior pelas vias neuro-secretórias (González e Escobar, 2002).

A administração i.c.v. de um antagonista da SP estimula a concentração de ACTH e corticosterona circulante e aumenta o mRNA para CRH no PVN, demonstrando que a SP endógena central inibe tonicamente a síntese e a liberação de CRH (Larsen *et al.*; 1993). Em humanos, a infusão endovenosa de SP aumentou a concentração plasmática de ACTH e de cortisol (Coiro *et al.*, 1992). No entanto, em ratos, não foi demonstrado o efeito da SP na secreção basal de ACTH e corticosterona *in vivo* (Nicholson *et al.*, 1984) e *in vitro* (Chowdrey *et al.*, 1990). Foi, entretanto, observada uma marcada ação inibitória da SP sobre a secreção de ACTH estimulada pelo CRH (Nicholson *et al.*, 1984) e a liberação de CRH pelo hipotálamo de rato (Faria *et al.*, 1991).

Por outro lado, a SP é um peptídeo biologicamente ativo, amplamente distribuído no eixo HPA. Como outros membros da família das NKs, a SP modula a liberação do CRH, de ACTH, aldosterona e corticosterona (Jessop *et al.*, 1992; Malendowicz e Markowska, 1994; Jessop, 1999). Os receptores NK₁ estão localizados no PVN, onde a interação com o CRH e

uma regulação direta do eixo HPA é possível (Carrasco e Van de Kar, 2003).

Como já visto, a resposta ao estresse inclui, entre outros fatores, a liberação de noradrenalina. Os neurônios noradrenérgicos estão distribuídos em várias regiões do tronco encefálico, incluindo o *locus coeruleus* (Jones e Olpe, 1984). O *locus coeruleus* responde a alterações fisiológicas do meio interno (Curtis *et al.*, 1993). A SP e receptores NK₁ são encontrados no *locus coeruleus* (Shults *et al.*, 1984; Mazzone *et al.*, 1999) e neurônios noradrenérgicos podem ser regulados pelas NKs (Chen *et al.*, 2000). Existem evidências anatômicas e farmacológicas da ação da SP como neurotransmissor no *locus coeruleus*, e um importante papel dos receptores NK₁ nas doenças relacionadas ao estresse (Hahn e Bannon, 1999). Chen e colaboradores (2000), verificaram, usando imunofluorescência, a distribuição de neurônios noradrenérgicos expressando receptores NK₁, bem como a evidência morfológica da modulação direta de neurônios noradrenérgicos pela SP através de receptores NK₁. Hahn e Bannon (1999) mostraram que antagonistas seletivos NK₁ atenuaram a expressão de c-fos no *locus coeruleus* induzido pelo estresse de imobilização em ratos. Esses resultados mostram o papel de antagonistas NK₁ na prevenção da resposta ao estresse. Os antagonistas dos receptores NK₁ têm demonstrado potencial terapêutico em transtornos relacionados ao estresse, como ansiedade e depressão.

Assim, as evidências sugerem que a SP é uma parte integrante da via neural central envolvida no estresse (DeVane, 2001; Ebner e Singewald, 2006).

“O pensamento só começa com a dúvida”
(Martin Du Gard)

OBJETIVOS

A maioria das pesquisas sobre mudanças bioquímicas induzidas por agentes estressores tem focado o eixo HPA e sustentado o conceito de inespecificidade para essa resposta. De fato, tanto a ansiedade como o estresse promovem a liberação de substâncias endógenas e um aumento de substratos energéticos no sangue, acompanhado de mudanças comportamentais.

Apesar de importantes diferenças entre espécies com relação à resposta fisiológica e endócrina ao estresse/ansiedade, a resposta das catecolaminas e hormônios do eixo HPA no plasma é consistente. Isso é de grande relevância considerando: a) o envolvimento de uma variável fisiológica particular como consequência adaptativa ou patológica ao estresse e b) a possibilidade de utilizar essas variáveis como marcadores de estresse experienciado por um indivíduo.

Mesmo que uma variável fisiológica consistente modifique após exposição ao estresse/ansiedade, não se conhece, até o momento, um índice quantitativo estável para avaliação desses estados. Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido para investigar:

- os níveis sanguíneos de ácidos graxos livres (AGL) e glicose como marcadores consistentes e confiáveis para diferentes tipos de estresse;
- se o comportamento dos marcadores complementares de estresse pode ser comparado com a resposta de marcadores “convencionais” como a corticosterona;
- os níveis sanguíneos de ácidos graxos livres (AGL) e glicose como marcadores de estresse consistentes, confiáveis e complementares para o estudo da ansiedade experimental induzida pela substância P em animais submetidos ao LCE;
- o possível envolvimento dos receptores neurocinérgicos do tipo NK₁ na regulação destes marcadores alternativos quando de situações de ansiedade/estresse experimentais.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”
(Cora Coralina)

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram usados ratos Wistar machos adultos (*Rattus norvegicus*), pesando 250-300 g, provenientes do Biotério Central da UFSC e da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os ratos foram alojados em número de 6 (seis) por gaiola plástica. Os animais permaneceram em salas com temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de luz 12/12 h (luzes ligadas das 7:00 as 19:00 h) controlados, recebendo água e ração "*ad libitum*", exceto durante a vigência dos experimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (processos - 23080.001156/2001-50/UFSC e 23080.020840/2003-01/UFSC).

2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

2.1 Cirurgia Estereotáxica

Os ratos foram anestesiados com tionembutal (50 mg/Kg; 0,1 ml/100g i.p.) e hidrato de cloral (0,2 ml/100g) e, depois de verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se à tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal. Em seguida, os animais foram colocados em um aparelho esterotáxico (Stoelting, mod.300, USA), sendo feita 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, abrindo o campo cirúrgico. Após esse procedimento, realizou-se a raspagem do perióstio, deixando a calota craniana exposta. A cabeça do animal foi posicionada 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 cânula-guia. A cânula-guia, implantada a fim de possibilitar as micro-injeções intracerebrais, foi confeccionada em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 0,7 mm (calibre 22 interno/28 externo). Com o auxílio de um paquímetro, a cânula foi cortada no comprimento de 16,5 mm. Para o implante intracerebral da cânula foram obedecidas as seguintes coordenadas: -0,8 mm AP.; $\pm 1,5$ mm ML; -3,5 mm DV, segundo o atlas de Paxinos e Watson (1986). Uma vez adaptados a cânula e os parafusos, a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico autopolimerizável. Decorridos alguns minutos para a secagem total do acrílico, foi colocado um mandril dentro da cânula-guia, que aí permaneceu até o momento da infusão da droga.

Após a cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa, aquecido por uma lâmpada de 40 W, para evitar a hipotermia induzida pela anestesia geral. Posteriormente, os animais foram colocados aos pares em gaiolas providas de água e comida, onde permaneceram até serem utilizados experimentalmente.

2.2 Adrenalectomia (adaptado de Naeser, 1973)

Para realizar a adrenalectomia, os animais foram anestesiados com éter. Após assepsia, foram feitas incisões bilaterais na região dorso-lombar, que permitiram a visualização e remoção das glândulas adrenais por pinçamento. Os animais submetidos à falsa operação (SHAM) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico sem a retirada das glândulas adrenais. Durante 15 dias, os animais adrenalectomizados (ADX) foram mantidos no biotério até o dia do experimento com ração e dois bebedouros, um com água e outro com salina (NaCl 1,5%). Os animais do grupo SHAM foram mantidos no biotério até o dia do experimento com ração e água disponíveis livremente. Após esse período, os animais foram submetidos aos diferentes procedimentos experimentais. A confirmação da ADX foi feita

através da dosagem dos níveis de corticosterona no sangue.

2.3 Canulação da Veia Jugular (modificado de Harms e Ojeda, 1974):

A canulação da veia jugular foi feita com antecedência mínima de 30h antes de submeter o animal ao modelo de estresse. Para esse procedimento, os ratos foram anestesiados com Hypnol® (pentobarbital sódico 3%, 30 mg/Kg) i.p. e, depois de verificada a perda total dos reflexos, deu-se início ao procedimento cirúrgico. Após assepsia do local, foi feita uma incisão longitudinal na pele sobre a veia jugular direita. Aproximadamente 5-10 mm da veia dissecada foi exposta, para a transfixação da cânula de polietileno (segundo modelo de Harms e Ojeda, 1974). A cânula foi fixada através de amarraduras com linha de sutura. A extremidade livre da cânula foi transpassada subcutaneamente pela região escapular, sendo exteriorizada dorsalmente próxima ao pescoço do animal. A cânula foi preenchida com solução de heparina (10 UI/ml). Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais, providas de água e comida *ad libitum*, onde permaneceram até serem utilizados experimentalmente. Na noite anterior ao experimento, os animais permaneceram em jejum, com reposição da comida 5 h antes de iniciar o experimento.

As amostras de sangue (0,6 ml) para determinação dos AGL, corticosterona e glicose foram coletadas 90 min antes dos animais serem expostos ao modelo de estresse (basal), 0, 15, 30 e 60 min após os animais retornarem às suas gaiolas-moradia. No intervalo entre as colheitas, os animais foram recolocados em suas gaiolas-moradia. Foram utilizados dois animais para a colheita das amostras no tempo experimental: do **animal x** foram retirados no tempo basal, T0 e T15; do **animal x'** foram coletados no tempo basal, T30 e T60. Este procedimento foi adotado em todos os protocolos experimentais, respeitando o limite máximo de volume de sangue que pode ser coletado do animal (até 10% do volume sanguíneo). O volume de sangue retirado foi repostado com salina 0,9%.

3. DROGAS, SOLUÇÕES E TRATAMENTOS

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

- Substância P (SP = H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) obtida de SIGMA Co., St. Louis, MO, EUA, dissolvida em PBS (*phosphatase-buffered saline*).
- WIN51,708 (17-beta-hidroxi-17-alfa-androstano[3,2-b]pirimido[1,2-a]benzimidazol) obtida de SIGMA Co., St. Louis, MO, EUA, dissolvida em PBS.
- Liquemine® - Heparina Sódica – 5.000 UI, comprada de Lab. Roche, Ampola 0,25 ml.
- Hypnol – Pentobarbital Sódico 3%, comprado do Laboratório Fontoveter/Cristália Ltda.

3.1 Injeção Intracerebroventricular

Após um período de sete dias, os ratos foram imobilizados manualmente e, com um alicate, foi retirado o mandril adaptado à cânula-guia durante o ato cirúrgico. As drogas foram injetadas através de uma agulha-injetora, conectada a um tubo de polietileno PE-10, com uma micro-seringa Hamilton 701 N (10 µl). As agulhas-injetoras utilizadas foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais odontológicas, 1,0 mm mais longas que as cânulas-guia. Em cada animal foi injetado um volume de 5 µl num período de 30s. A agulha injetora permaneceu na cânula-guia por mais um período de 30 s para permitir a difusão das soluções. Os ratos foram tratados com PBS, SP (10 pmol) ou WIN51,708 (100 pmol) em um dos ventrículos laterais (randomicamente, ½ ventrículo direito, ½ ventrículo esquerdo).

4. MODELOS DE ESTRESSE

4.1 Imobilização (IMO), adaptada de Kvetnansky e Mikulaj, 1970:

IMO consistiu na restrição dos movimentos do animal em decúbito ventral, bem como impossibilidade total de mudar de posição. O animal foi colocado dentro de um cilindro plástico (PVC), fechado na extremidade anterior por uma tampa de PVC com orifícios. Na

extremidade posterior do tubo foi colocado uma placa de metal com um orifício para passagem da cauda (com regulagem conforme o tamanho do animal). Após permanecer 5 min no tubo, o animal foi retirado para a colheita de sangue nos tempos determinados no protocolo, permanecendo na gaiola-moradia nos intervalos de colheita.

4.2 Nado Forçado (NADO):

No NADO os ratos foram forçados a nadar por 5 min em um barrilete (40 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade) preenchida com água (23°C) na profundidade de 40 cm. Após a sessão de NADO, os ratos foram secos em papel toalha e recolocados nas suas gaiolas.

4.3 Avaliação Comportamental no Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

O labirinto em cruz elevado (LCE) é utilizado para avaliação emocional induzida por drogas ansiolíticas ou ansiogênicas e por outros tipos de estressores. O LCE consiste de dois braços abertos opostos (50 x 10 x 1 cm) e dois fechados (50 x 10 x 40 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do chão. O LCE está localizado numa sala com luz vermelha (15 W). Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min. As medidas comportamentais clássicas registradas no LCE foram: a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados (Pellow *et al.* 1985; Pellow, 1986; Anseloni *et al.*, 1995).

Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a percentagem de entradas

no braço aberto foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação a somatória do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Esta razão reflete o medo induzido através da inibição das entradas nos braços abertos e pode ser relatado como o nível de ansiedade experimentado por este animal (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.* 1985). Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos revela um efeito ansiolítico (Pellow *et al.*, 1985; Pellow, 1986).

Foram também registrados no LCE parâmetros etológicos, tais como o número de "head-dipping" (HD) e "stretch attend posture" (SAP), protegidos (do braço fechado para o aberto) ou não, como medida do comportamento de "avaliação de risco"; o "rearing" (REA), número de comportamentos de levantar-se; o "grooming" (GRO), a auto-limpeza e o número de bolos fecais (BF).

5. HISTOLOGIA

Ao final dos procedimentos experimentais, todos os ratos com implantação de cânula i.c.v. foram anestesiados com éter e, então, perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl 0,9 %), seguida por solução de formaldeído (10 %). Posteriormente, os animais foram decapitados e receberam uma micro-injeção de solução de Azul de Evans (2%). Os cérebros foram removidos imediatamente e fixados em uma solução de formalina 10 % - sacarose 20 %, sendo então congelados e cortados em fatias de 30 µm no plano frontal. As fatias foram preparadas em lâminas e coradas com tionina. Os locais das injeções foram identificados por microscopia óptica. Todos os animais que não apresentaram a localização correta das cânulas foram descartados do estudo. Menos de 1% dos animais foram

descartados por não satisfazer a condição experimental, isto é, a cânula não estava posicionada no ventrículo lateral.

6. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Todas as amostras de sangue foram colhidas em tubos *Eppendorff* e imediatamente centrifugadas a 4000 rpm por 10 min.

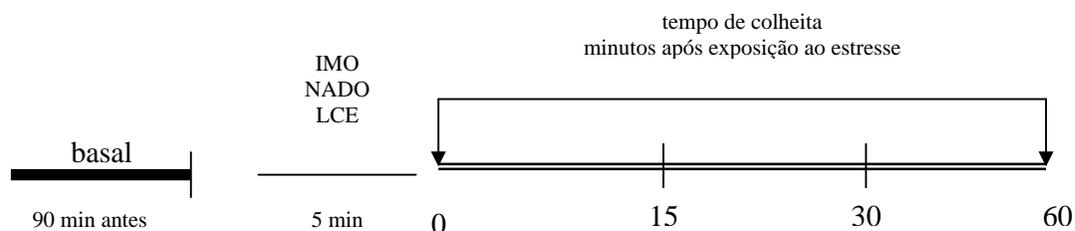
Amostras de soro foram separadas (100µl) e estocadas à -80°C até a dosagem de corticosterona. Para a dosagem de corticosterona foi utilizado o kit (COAT-A-COUNT® RAT CORTICOSTERONE, Los Angeles, EUA), por radioimunoensaio (RIA), e o kit DSL-10-2000 Active® Cortisol Enzima Imunoensaio (EIA), informações técnicas em anexo.

Amostras de plasma foram separadas para dosagem dos níveis de glicose (20µl) A glicose plasmática foi medida pelo método de Glicose Oxidase (kit comercial, Labtest®, São Paulo, Brasil).

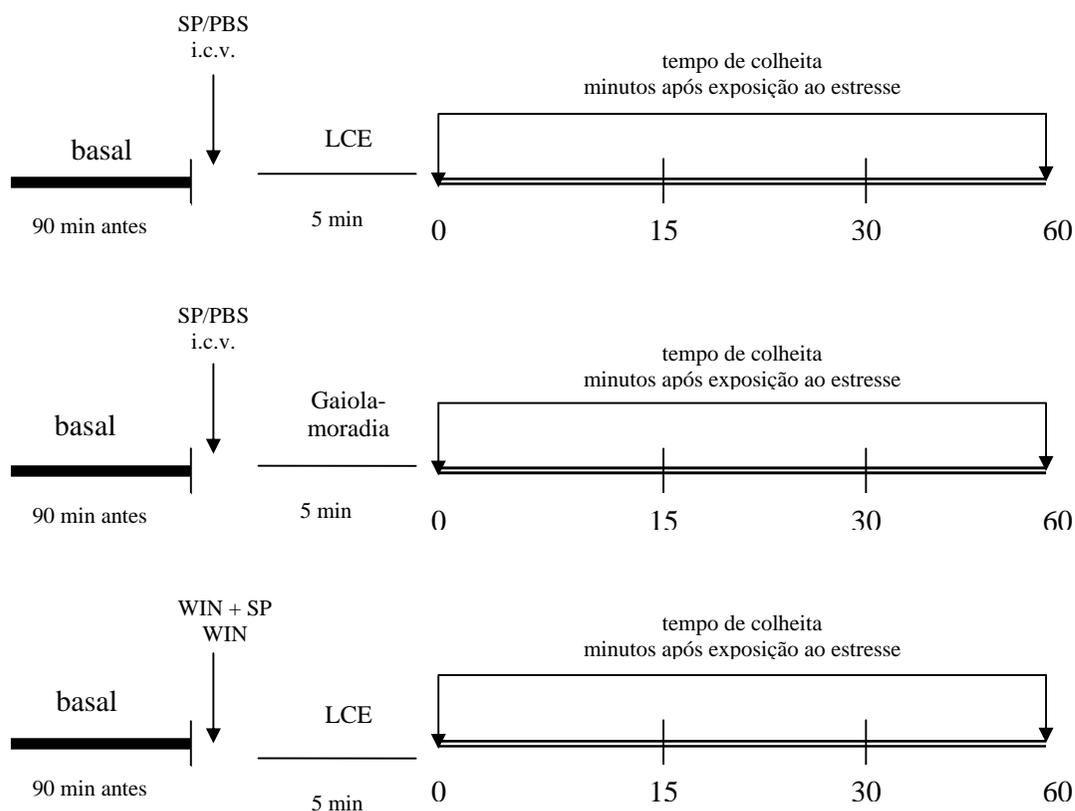
Amostras de plasma foram separadas para dosagem dos níveis de AGL (200µl). Os AGL foram dosados pelo método para pequenas quantidades de ácidos graxos proposto por Dole e Meinertz (1960), descrição da técnica em anexo.

7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

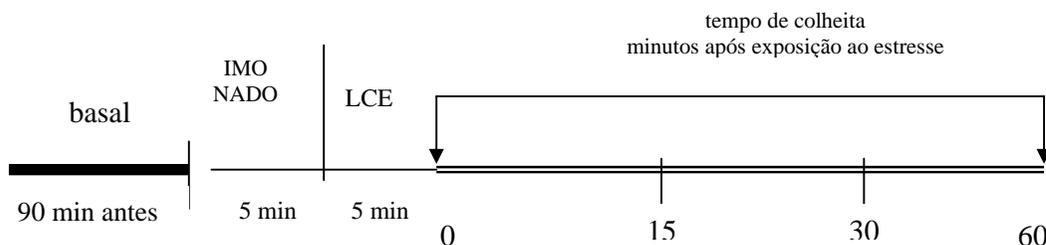
Experimento 1: O objetivo desse experimento foi verificar os níveis plasmáticos de AGL e glicose e séricos de corticosterona em animais submetidos ao estresse de imobilização (IMO), nado forçado (NADO) e ao labirinto em cruz elevado (LCE).



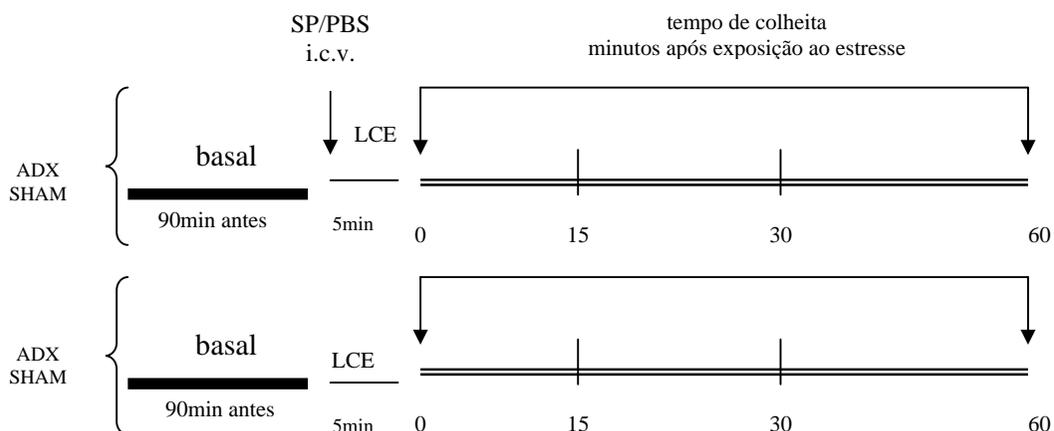
Experimento 2: O objetivo desse experimento foi verificar a influência do efeito ansiogênico da SP (i.c.v.) em animais submetidos ao LCE nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e séricos de corticosterona .



Experimento 3: O objetivo desse experimento foi investigar o efeito da exposição prévia a um estressor seguida da exposição do animal ao modelo de ansiedade – LCE, nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona e nos parâmetros etológicos e medidas de exploração no LCE.



Experimento 4: o objetivo desse experimento foi verificar a participação do eixo HPA no efeito do estresse/ansiedade sobre os níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona em animais submetidos ou não ao LCE.



8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados comportamentais do LCE, as comparações estatísticas foram realizadas pela análise de variância univariada (ANOVA), seguida do teste de Duncan como teste *post hoc*.

Para análise dos resultados da concentração sanguínea de AGL, glicose e corticosterona em animais intactos foi utilizada ANOVA de duas vias e o teste de Duncan como teste *post hoc*, tendo como variáveis independentes o tratamento e o tempo.

Para análise dos resultados da concentração sanguínea de AGL, glicose e corticosterona entre os animais submetidos ao IMO, IMOFRIO, NADO e LCE foi utilizada

ANOVA de duas vias e o teste de Tukey para n diferentes como teste *post hoc*, tendo como variáveis independentes o tratamento e o tempo.

Para análise dos resultados da concentração sanguínea de AGL, glicose e corticosterona em animais submetidos a ADX ou SHAM cirurgia, foi utilizada ANOVA de três vias e o teste de Duncan como teste *post hoc*, tendo como variáveis independentes a cirurgia, o tratamento e o tempo.

Em todos os casos, o nível de significância estatística foi de $P < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), nos diversos testes utilizados. Todos os grupos apresentaram $n=7$.

**"Só os que não fazem nada nunca erram."
(Teilhard de Chardin)**

RESULTADOS

1. CURVAS TEMPO-RESPOSTA DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

1.1 Efeito do estresse de imobilização (IMO) nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando comparados aos animais submetidos ou não (controle) ao estresse de imobilização por 5 min [$F(1,60) = 33,31$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 12,78$; $p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 2,87$; $p = 0,03$].

Os animais submetidos ao estresse de IMO apresentaram os níveis dos AGL significativamente maiores (Fig. 1A), em todo período experimental, quando comparados ao grupo controle (animais não submetidos ao estresse de imobilização). A concentração de AGL no plasma também foi significativamente maior do que a observada antes da sessão de estresse (tempo basal), durante o período observado. O aumento na concentração dos AGL no sangue foi detectado imediatamente (tempo 0), e elevou-se de forma gradativa, até atingir seu valor máximo aos 15 min (80% acima do basal), mantendo-se constante até o final do tempo experimental.

A Fig. 1B ilustra o efeito do estresse de imobilização nos níveis plasmáticos de glicose. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de glicose, quando comparados aos dados obtidos em animais submetidos, ou não (controle), ao estresse de imobilização por 5 min [$F(1,60) = 17,91$; $p = 8 \times 10^{-4}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 3,93$; $p = 0,006$], mas não na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 1,02$; $p = 0,40$].

Na mesma figura pode-se observar que houve aumento significativo na concentração plasmática de glicose imediatamente após os 5 min de imobilização (tempo 0) e aos 15 min. O

aumento da glicemia observado nesse intervalo foi estatisticamente diferente quando comparado com o grupo controle (animais não submetidos ao estresse de imobilização). Além disso, somente nesse intervalo de tempo os valores da glicose foram maiores que o valor basal (50%). A concentração de glicose declinou rapidamente para valores próximos ao basal no intervalo de tempo de 30–60 min.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas nos níveis séricos de corticosterona quando comparados aos dados obtidos de animais submetidos, ou não (controle), ao estresse de imobilização por 5 min [$F(1,60) = 62,18$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 6,58$; $p = 3 \times 10^{-3}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 2,91$; $p = 0,03$].

A Fig. 1C mostra o aumento significativamente diferente nos níveis de corticosterona observado em todo período experimental no grupo submetido à imobilização, quando comparado ao grupo controle. Os valores obtidos nesse intervalo de tempo também foram maiores do que o valor basal, atingindo 34% acima do basal, no tempo 0 (imediatamente após a retirada do animal ao estímulo estressor).

1.2 Efeito do estresse de natação (NADO) nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando comparamos aos animais submetidos ou não (controle) ao estresse de NADO por 5 min [$F(1,60) = 83,08$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 9,17$; $p = 10^{-6}$] e interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 3,99$; $p = 0,006$].

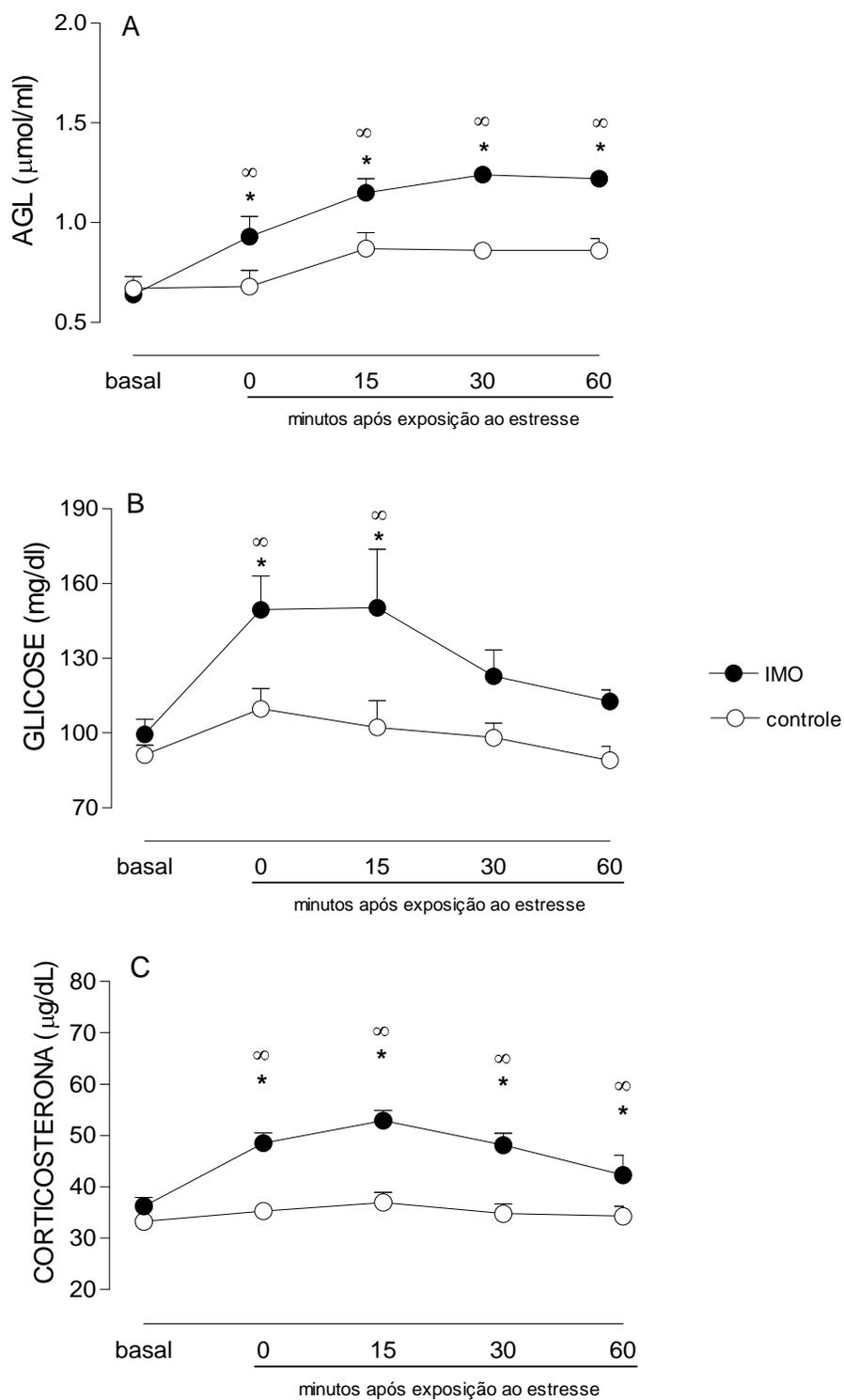


Figura 1. Efeito do estresse de IMO por 5 min nos níveis plasmáticos de AGL (A), glicose (B) e níveis séricos de corticosterona (C) em ratos. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média ($n = 7$). Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle, no mesmo intervalo de tempo e (∞) entre o grupo experimental e o basal correspondente ($P < 0.05$, teste *post hoc* de Duncan).

O grupo submetido ao NADO apresentou valores de AGL plasmáticos significativamente maiores, quando comparados aos animais não submetidos ao NADO (grupo controle), em todo o período do tempo experimental (Fig. 2A). Pode-se ainda observar na Fig. 2A, que a concentração de AGL foi significativamente maior comparada ao tempo basal em todo período experimental. O aumento na concentração plasmática de AGL ocorreu imediatamente após a retirada do animal do NADO, atingindo o valor máximo aos 15 min (100%), mantendo-se elevado até o final do período experimental.

A ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa na concentração plasmática de glicose quando comparados os dados obtidos em animais submetidos, ou não (controle), ao estresse de NADO [$F(1,60) = 6,03$; $p = 0,02$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 3,72$; $p = 0,009$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 3,30$; $p = 0,02$].

A Fig. 2B ilustra o efeito do estresse de natação na concentração plasmática de glicose. Os animais submetidos ao NADO apresentaram um aumento estatisticamente significativo somente aos 15 min quando comparados com o grupo controle (não submetido ao NADO), no mesmo intervalo de tempo. Os valores da glicose plasmática foram significativamente maiores imediatamente após a retirada do animal do NADO (80%) até os 30 min do período experimental, quando comparados com o valor basal (Fig. 2B).

A Fig. 2C mostra o efeito do estresse de natação na concentração sérica de corticosterona. Houve diferença significativa nos níveis séricos de corticosterona quando comparados os dados obtidos de animais submetidos ou não (controle) ao NADO [$F(1,60) = 117,45$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 10,08$; $p = 10^{-4}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 8,64$; $p = 4 \times 10^{-4}$].

O aumento na concentração sanguínea de corticosterona foi significativamente diferente, durante todo período experimental, quando comparado ao grupo controle (animais

não submetidos ao NADO). Pode-se ainda observar na Fig. 2C, que a concentração de corticosterona foi significativamente maior comparado ao tempo basal em todo período experimental. Esse aumento nos níveis de corticosterona foi significativo imediatamente após a retirada do animal do modelo (tempo 0) atingindo 92% (acima do valor basal) aos 15 min do tempo experimental.

1.3 Efeito da exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE) nos níveis plasmáticos de AGL e glicose e níveis séricos de corticosterona em ratos

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando comparados aos animais submetidos ou não (controle) ao LCE por 5 min [$F(1,60) = 234,38$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 29,88$; $p = 10^{-6}$] e interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 22,92$; $p = 10^{-6}$]. O aumento na concentração de AGL provocado pela exposição ao LCE foi diferente estatisticamente da resposta obtida no grupo controle (animais não submetidos ao LCE), em todo período experimental (Fig. 3A). Pode-se ainda observar na Fig. 3A, que a concentração de AGL foi significativamente maior comparado ao tempo basal em todo período experimental. Esse aumento foi gradativo chegando ao valor máximo aos 15 min (162% acima do valor basal).

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de glicose quando comparados os dados obtidos de animais submetidos ou não (controle) ao LCE por 5 min [$F(1,60) = 26,36$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 7,73$; $p = 4 \times 10^{-4}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 9,45$; $p = 10^{-6}$].

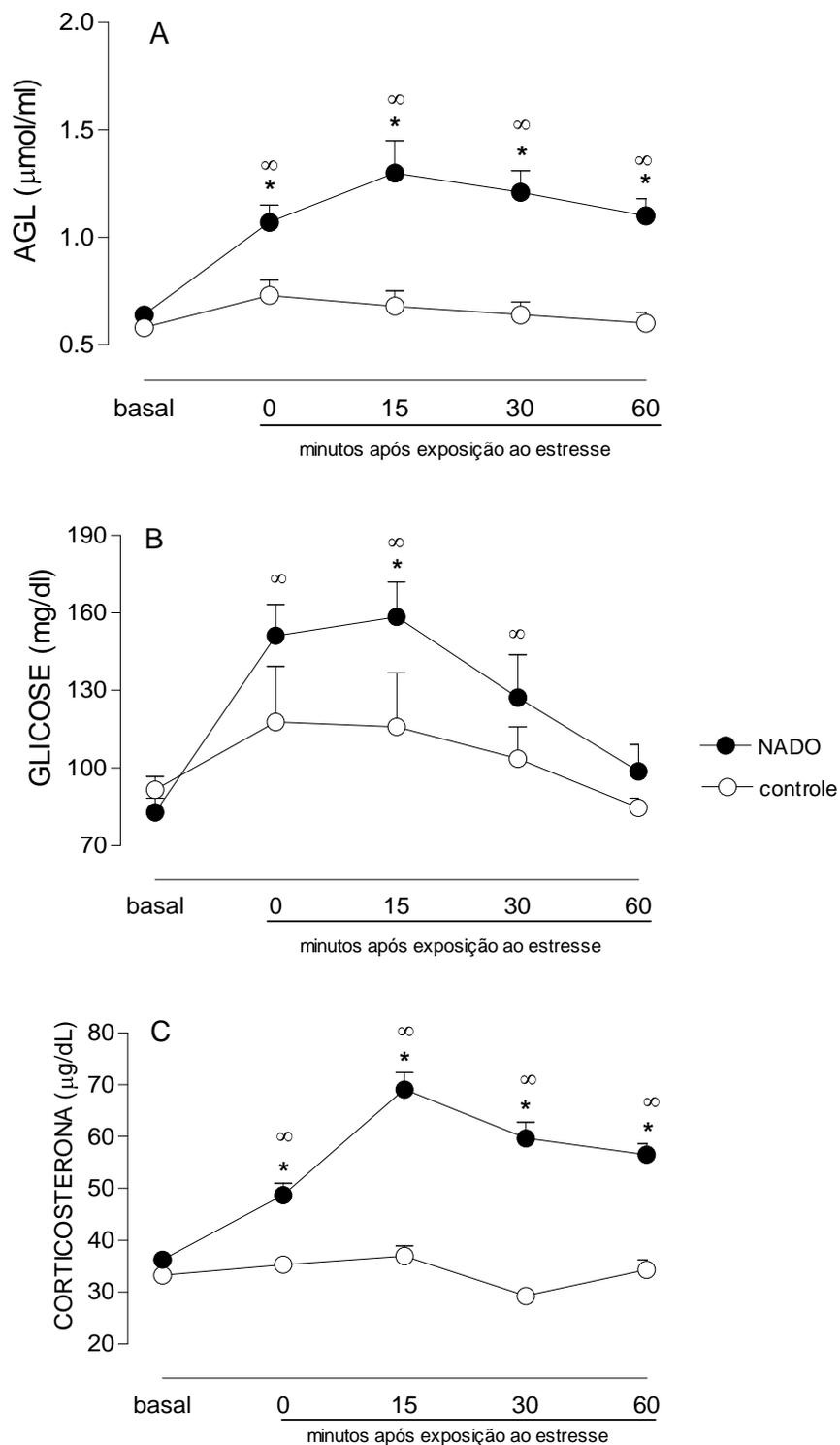


Figura 2. Efeito do NADO nos níveis plasmáticos de AGL (A), glicose (B) e níveis séricos de corticosterona (C) em ratos. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média ($n = 7$). Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle, no mesmo intervalo de tempo e (∞) entre o grupo experimental e o basal correspondente ($P < 0.05$, teste *post hoc* de Duncan).

O aumento nos níveis de glicose, provocado pela exposição ao LCE, foi diferente estatisticamente da resposta obtida no grupo controle (animais não submetidos ao LCE) no intervalo de 0-15 min (Fig. 3B). O valor máximo registrado foi aos 15 min do período experimental, atingindo 71 % acima do valor basal. No entanto, nos minutos subseqüentes houve uma queda da glicemia, atingindo valores próximos ao basal.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração sérica de corticosterona quando comparada aos dados obtidos de animais submetidos ou não (controle) ao LCE por 5 min [$F(1,60) = 104,95$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 7,82$; $p = 9 \times 10^{-4}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 9,18$; $p = 2 \times 10^{-4}$].

O aumento na concentração sanguínea de corticosterona foi significativamente diferente, durante todo período experimental, ao apresentado pelo grupo controle (animais não submetidos ao LCE). Pode-se ainda observar na Fig. 3C, que a concentração de corticosterona foi significativamente maior comparado ao tempo basal em todo período experimental. Esse aumento nos níveis de corticosterona foi significativo imediatamente após a retirada do animal do modelo (tempo 0), atingindo 75% aos 15 min do tempo experimental.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando comparamos aos animais submetidos à imobilização (Fig. 1A), ao NADO (Fig. 2A) e ao LCE (Fig. 3A) [$F(4,220) = 79,03$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,220) = 63,87$; $p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(16,220) = 6,62$; $p = 10^{-6}$].

O aumento na concentração de AGL provocado pela exposição ao IMO, NADO e LCE foi diferente estatisticamente da resposta obtida no grupo controle em todo período experimental (0-60 min). O valor máximo da resposta lipolítica, em todos os modelos de estresse, foi aos 15 min quando comparado ao valor basal de cada grupo. No grupo submetido

ao LCE esse aumento foi de 162% acima do valor basal e foi superior estatisticamente somente do grupo submetido ao IMO, 80% aos 15 min.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de glicose quando comparamos aos animais submetidos à imobilização (Fig. 1B), ao NADO (Fig. 2B) e ao LCE (Fig. 3B) [$F(4,220) = 15,22; p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,220) = 26,16; p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(16,220) = 4,75; p = 10^{-6}$].

O aumento na concentração de glicose provocado pela exposição ao IMO e ao LCE, foi diferente estatisticamente da resposta obtida no grupo controle somente no intervalo de tempo de 0-15 min do período experimental. No grupo submetido ao NADO essa diferença aconteceu somente aos 15 min quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração sérica de corticosterona quando comparamos aos animais submetidos à imobilização (Fig. 1C), ao NADO (Fig. 2C) e ao LCE (Fig. 3C) [$F(4,220) = 81,29; p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,220) = 43,36; p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(16,220) = 6,74; p = 10^{-6}$]. O aumento na concentração de corticosterona provocado pela exposição ao LCE, ao NADO e à IMO foi diferente estatisticamente da resposta obtida no grupo controle em todo período experimental. O aumento nos níveis de corticosterona provocado pela exposição ao LCE e ao NADO foi significativamente maior aos 15 min, quando comparado aos valores obtidos nos animais expostos ao IMO. Entretanto, todos os estressores aumentaram a concentração de corticosterona que se manteve durante todo período experimental.

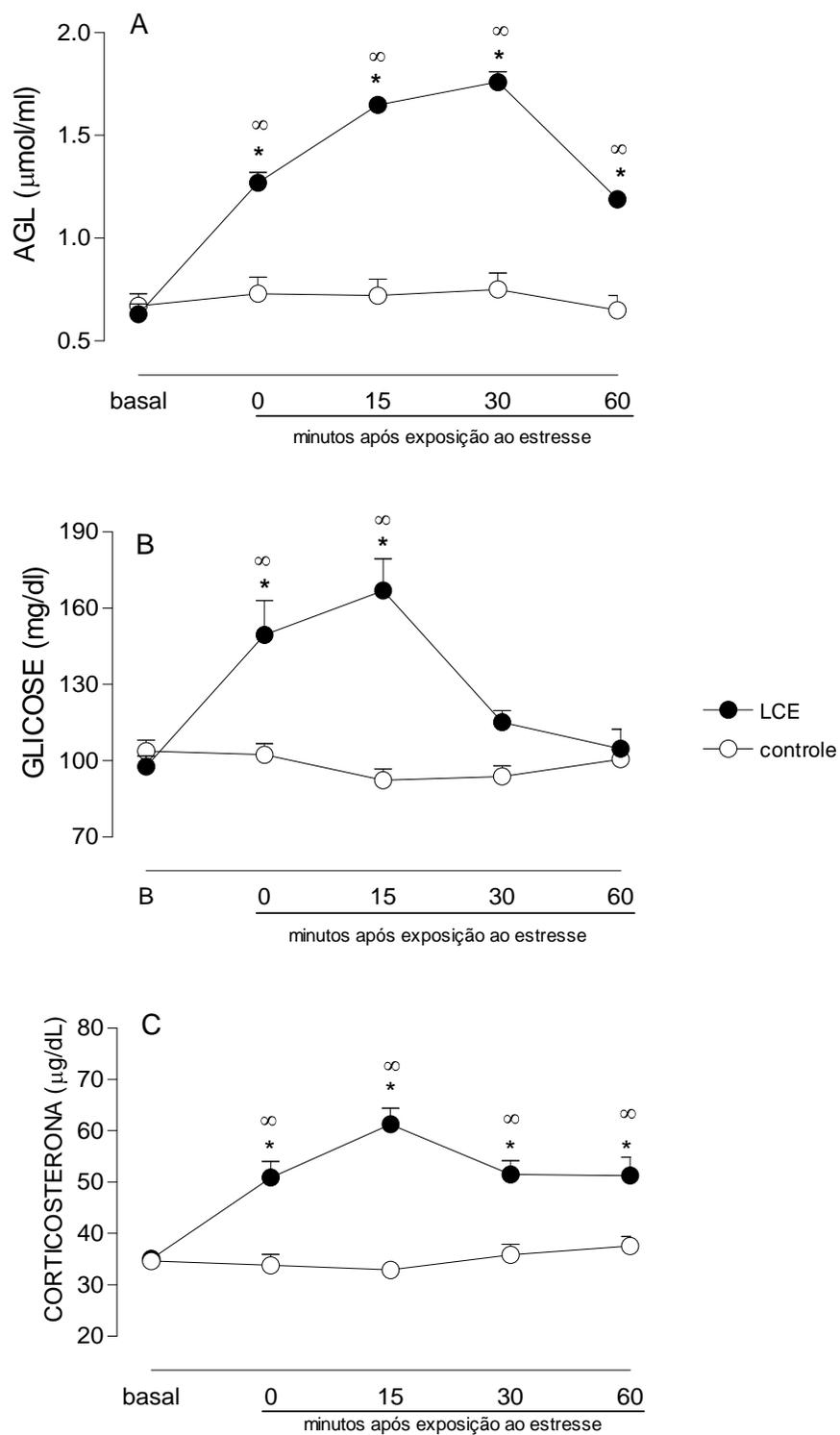


Figura 3. Efeito do LCE nos níveis plasmáticos de AGL (A), glicose (B) e níveis séricos de corticosterona (C) em ratos. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média ($n = 7$). Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle, no mesmo intervalo de tempo e (∞) entre o grupo experimental e o basal correspondente ($P < 0.05$, teste *post hoc* de Duncan).

Observa-se nas Figs. 1, 2, 3 que as variáveis em estudo sofreram alterações diferenciadas, conforme o tipo de estressor a que o animal foi submetido. Percebe-se que os níveis de AGL e corticosterona apresentaram respostas significativamente maiores e mais duradouras que a glicose. Em verdade, a resposta lipolítica foi mesmo melhor que a da corticosterona, quando comparada à intensidade (% acima do valor basal) das respostas aos diferentes estressores (IMO, NADO e LCE). O aumento nos níveis de corticosterona, apesar de apresentar intensidade (% acima do valor basal) muito próxima ao aumento na glicemia nos animais submetidos ao IMO e LCE, mostrou uma resposta mais duradoura, mantida em todo período experimental.

2. INFLUÊNCIA DO EFEITO ANSIOGÊNICO PROVOCADO PELO TRATAMENTO CENTRAL COM SP NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS E O POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NK₁ NESSA RESPOSTA

2.1 Efeito da injeção i.c.v. de SP, PBS ou WIN 51,708 (antagonista seletivo dos receptores NK₁) em ratos submetidos ao LCE nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando comparados os dados obtidos após a injeção i.c.v. de SP ou PBS (controle), em ratos submetidos ao LCE [$F(1,60) = 30,19$; $p = 10^{-5}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 49,69$; $p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 10,06$; $p = 3 \times 10^{-5}$].

A Fig. 4A ilustra o efeito da injeção central de SP ou PBS, seguida da exposição ao LCE, na concentração plasmática dos AGL em ratos. No grupo tratado com SP houve um aumento diferente estatisticamente da resposta obtida no grupo controle (PBS/LCE) nos tempos 30 e 60 min, sendo que aos 30 min foi 78% maior que a do grupo controle no mesmo tempo experimental. Pode-se observar também que durante todo o período experimental a concentração dos AGL no plasma foi maior que o basal (90 min antes de submeter o animal ao protocolo) no grupo tratado com SP, sendo que o valor máximo foi observado aos 30 min (300% acima do valor basal). No grupo controle verifica-se um aumento significativo da concentração de AGL imediatamente após a retirada do animal do LCE, tempo 0 (173% acima do valor basal), quando comparado com o valor basal, mantendo-se em todo período experimental.

A análise estatística dos dados obtidos após as injeções i.c.v. de PBS ou SP em ratos submetidos ao LCE mostrou não haver diferenças significativas na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [$F(1,60) = 0,20$; $p = 0,66$]. Houve diferença estatisticamente

significativa entre os tempos [$F(4,60) = 5,65$; $p = 6 \times 10^{-3}$], mas não na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 1,02$; $p = 0,40$].

Pode-se observar na Fig. 4B que a concentração de glicose plasmática no grupo tratado com SP i.c.v. e submetido ao LCE foi significativamente maior somente aos 15 min, quando comparada com o grupo controle (PBS/LCE). No entanto, imediatamente após a retirada do animal do LCE (tempo 0), e também aos 15 e 30 min, os valores da glicose foram mais elevados que os do tempo basal nos ratos tratados com SP. O aumento na concentração de glicose alcançou seu valor máximo no tempo 15 (80% do valor basal). Observa-se na Fig. 4B que no grupo controle houve um aumento significativo dos níveis de glicose somente no tempo 0 atingindo o valor máximo de 40% acima do valor basal .

A análise estatística dos dados obtidos após as injeções i.c.v. de PBS ou SP em ratos submetidos ao LCE mostrou haver diferenças significativas na concentração sérica de corticosterona entre os tratamentos [$F(1,60) = 128,27$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 16,57$; $p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 10,96$; $p = 2 \times 10^{-5}$].

Nos animais tratados com a injeção i.c.v. de SP/LCE houve um aumento na concentração de corticosterona em todo período experimental e os valores diferiram significativamente dos valores verificados no grupo controle (PBS/LCE; Fig. 4C), no mesmo intervalo de tempo. O aumento nos níveis de corticosterona foi significativo imediatamente após a retirada do animal do LCE (tempo 0), e se manteve assim até os 60 min no grupo SP/LCE, quando comparado aos valores basais. Não houve diferença significativa entre os tempos, sendo que o valor máximo foi obtido imediatamente após o estresse no tempo 0 (62% acima do valor basal). No grupo PBS/LCE os níveis de corticosterona aumentaram significativamente somente no tempo 0 (imediatamente após a retirada do animal do LCE), atingindo 28% acima do valor do basal.

A Fig. 4 (D, E e F) ilustra também os efeitos da injeção i.c.v. de WIN 51,708 (antagonista seletivo dos receptores NK₁), injetado 10 min antes da injeção i.c.v. da SP, e WIN *per se*, em ratos submetidos ao LCE, nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando foram comparados os dados obtidos após a injeção i.c.v. de WIN seguido de SP ou apenas WIN (controle) em ratos submetidos ao LCE [$F(1,60) = 13,46$; $p = 5 \times 10^{-3}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 70,72$; $p = 10^{-6}$], mas não na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 1,88$; $p = 0,13$]. Na Fig. 4D observa-se que no grupo tratado com WIN/SP/LCE a concentração plasmática de AGL foi estatisticamente diferente (menor) quando comparado com o valor obtido no mesmo tempo nos animais tratados com WIN/LCE (controle) no tempo de 15 min. No grupo tratado com WIN/SP/LCE houve um aumento nos AGL imediatamente após a retirada do animal do LCE (tempo 0), chegando a 184% acima do valor basal (90 min antes de submeter o animal ao protocolo experimental). Houve uma queda dos AGL dos 15 aos 60 min do período experimental. Essa resposta lipolítica foi semelhante em início, intensidade e duração àquela observada no grupo tratado somente com WIN/LCE i.c.v.

Com relação à alteração na concentração de glicose sanguínea, a Fig. 4E mostra que houve diferença significativa estatisticamente na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [$F(1,60) = 19,16$; $p = 5 \times 10^{-4}$] e os tempos [$F(4,60) = 32,81$; $p = 10^{-6}$], mas não na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 1,22$; $p = 0,31$].

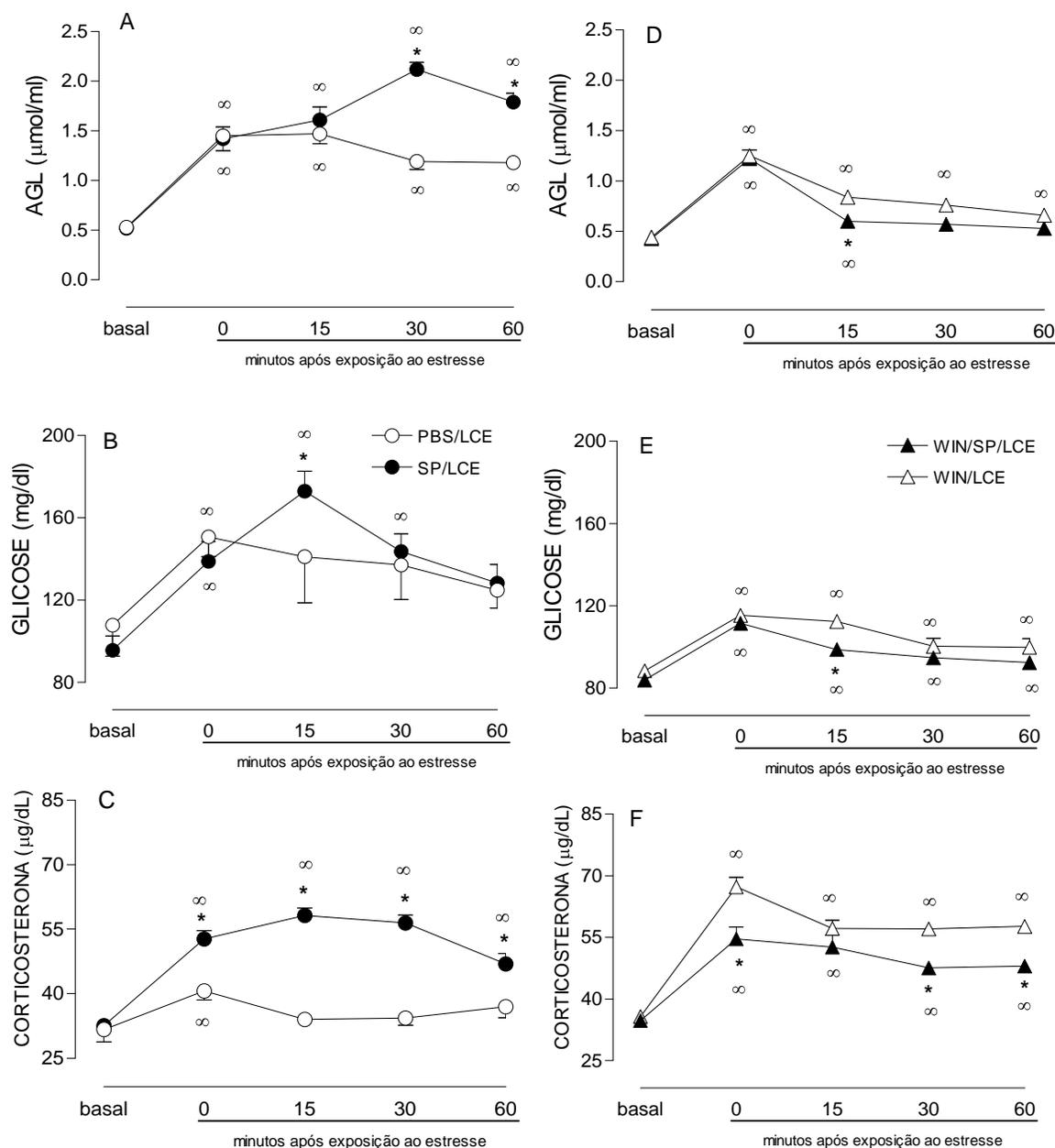


Figure 4. Efeito da injeção i.c.v. de SP e PBS (A, B, e C) e de WIN/SP e WIN (D, E, e F) em ratos submetidos ao LCE por 5 min nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, $n = 7$. Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle, no mesmo intervalo de tempo, (∞) entre o grupo experimental e o valor basal correspondente ($P < 0.05$, teste *post hoc* de Duncan).

A concentração de glicose plasmática no grupo tratado com WIN/LCE (controle) foi maior que no grupo tratado com WIN/SP/LCE no tempo 15 min. Observa-se na Fig. 4E que no grupo tratado com WIN/SP/LCE houve um aumento significativo dos níveis de glicose em todo período experimental, quando comparado ao valor basal, chegando a 33% imediatamente após a retirada do animal do LCE. No grupo WIN/LCE o aumento na concentração de glicose alcançou seu valor máximo no tempo 0 (31% do valor basal).

A análise estatística dos dados obtidos após a injeção i.c.v. de WIN/SP ou WIN, em animais submetidos ao LCE, mostrou que houve diferença significativa na concentração sérica de corticosterona entre os tratamentos [$F(1,60) = 39,69$; $p = 10^{-6}$] e os tempos [$F(4,60) = 52,37$; $p = 10^{-6}$]. Houve interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 3,06$; $p = 0,02$]. Os valores observados na concentração de corticosterona no grupo tratado com WIN/SP/LCE foram estatisticamente menores quando comparados aos dados obtidos dos animais tratados com WIN/LCE nos tempos 0, 30 e 60 min do período experimental (Fig. 4F). No grupo tratado com WIN/SP/LCE os níveis sanguíneos de corticosterona apresentaram um aumento imediatamente após a retirada do animal do LCE (tempo 0). Esse aumento manteve-se durante todo o período experimental, sendo que o valor máximo obtido no tempo 0 foi de 57% acima do valor basal. No grupo tratado com WIN/LCE, o aumento nos níveis de corticosterona foi significativo em todo período experimental quando comparados ao valor basal, sendo que o valor máximo no tempo 0 de 88% acima do valor basal..

A análise estatística dos dados mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, na concentração sanguínea de AGL [$F(3,120) = 121,75$; $p = 10^{-6}$], glicose [$F(3,120) = 24,54$; $p = 10^{-6}$] e corticosterona [$F(3,100) = 94,67$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos nos AGL [$F(4,120) = 73,88$; $p = 10^{-6}$], na glicose [$F(4,120) = 11,18$; $p = 10^{-6}$] e na corticosterona [$F(4,100) = 60,39$; $p = 10^{-6}$]; houve também interação entre tratamentos e tempo nos AGL [$F(12,120) = 15,60$; $p = 10^{-6}$] e na

corticosterona [$F(12,100) = 6,83$; $p = 10^{-6}$], mas não houve interação entre tratamentos e tempo para os níveis de glicose [$F(12,120) = 1,44$; $p = 0,16$].

Os resultados mostram que o tratamento central com SP ou PBS em ratos submetidos ao LCE alteram a concentração sanguínea das variáveis em estudo. Nos animais tratados com SP/LCE percebe-se uma resposta lipolítica e do aumento da corticosterona mais intensa e duradoura que a da glicemia. Comparando-se o grupo tratado i.c.v. com SP, seguido do LCE com o grupo PBS/LCE verifica-se uma resposta mais evidente nas três variáveis no grupo SP/LCE. No entanto, nos animais tratados com PBS/LCE houve também aumento de AGL, glicose e corticosterona, indicando o efeito estressor do LCE, como verificado nas figuras 3A, 3B e 3C. O WIN, antagonista dos receptores NK_1 , reverteu, portanto, a ação do tipo ansiogênica da SP. Pode-se atribuir o pequeno aumento na concentração sanguínea dos AGL, glicose e corticosterona no grupo tratado apenas com WIN/LCE ao efeito estressor do LCE *per se*, verificado nas figuras 3A, 3B e 3C, como já citado.

2.2 Efeito da injeção i.c.v. de SP ou PBS em ratos nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona

Conforme mostrado na Fig. 3, o LCE *per se* promoveu aumento nos níveis de AGL, glicose e corticosterona. Para verificar se as alterações nas variáveis em estudo obtidas nos animais tratados com SP i.c.v. (Fig. 4) foram devido ao efeito ansiogênico da SP no LCE, ou simplesmente da exposição ao novo ambiente (LCE), os níveis plasmáticos de AGL, glicose e corticosterona foram medidos em ratos tratados de forma similar, mas não expostos ao LCE (Fig. 5).

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL quando se comparou os dados obtidos após a injeção i.c.v. de PBS (controle) ou SP em ratos não submetidos ao LCE [$F(1,60) = 201,89$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença

estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 29,70$; $p = 10^{-6}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 20,51$; $p = 10^{-6}$].

A Fig. 5D mostra que houve aumento na concentração plasmática de AGL, significativamente diferente dos valores obtidos no grupo controle (PBS i.c.v.), durante todo o período experimental. No grupo tratado com SP os valores plasmáticos de AGL foram mais elevados que o valor basal e aos 30 min observou-se o valor máximo (165%), acima do valor basal.

A ANOVA de duas vias mostrou não haver diferenças significativas na concentração plasmática de glicose, quando se comparou os dados obtidos após a injeção i.c.v. de PBS (controle) ou SP em ratos não submetidos ao LCE [$F(1,60) = 1,34$; $p = 0,25$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 3,46$; $p = 0,01$], mas não na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 1,83$; $p = 0,13$]. A Fig. 5B mostra que não houve diferença significativa na concentração de glicose dos animais tratados com SP i.c.v., quando comparado ao grupo controle (PBS). No entanto, a partir dos 15 min os valores da glicemia foram maiores que o valor basal (46%) se mantendo até o tempo de 60 min.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração sérica de corticosterona, quando se comparou os dados obtidos após a injeção i.c.v. de PBS (controle) ou SP em ratos não submetidos ao LCE [$F(1,60) = 190,53$; $p = 10^{-6}$]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,60) = 9,19$; $p = 10^{-4}$] e na interação entre tratamento e tempo [$F(4,60) = 7,06$; $p = 10^{-3}$].

Nos ratos tratados com SP, e não submetidos ao LCE, houve aumento na concentração sérica de corticosterona e este aumento foi significativamente maior que o grupo controle (PBS), em todo o período experimental (Fig. 5F). Nos animais tratados com SP i.c.v. a elevação nos níveis de corticosterona atingiu o valor máximo no tempo 0 (5 min após a

injeção i.c.v. de SP), chegando a 40% acima do valor basal, mantendo-se até o final do período experimental.

A análise estatística dos dados mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, na concentração sanguínea de AGL [F(3,120) = 103,77; p = 10⁻⁶] e corticosterona [F(3,120) = 106,83; p = 10⁻⁶], mas não na concentração de glicose [F(3,120) = 2,26; p = 0,08]. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos nos AGL [F(4,120) = 70,57; p = 10⁻⁶], de glicose [F(4,120) = 8,22; p = 10⁻⁶] e da corticosterona [F(4,120) = 25,05; p = 10⁻⁶]; houve também interação entre tratamentos e tempo na concentração de AGL [F(12,120) = 12,89; p = 10⁻⁶] e da corticosterona [F(12,120) = 6,63; p = 10⁻⁶], mas não houve interação entre tratamentos e tempo para os níveis de glicose [F(12,120) = 1,30; p = 0,22].

Os resultados mostram que a SP *per se* eleva os níveis sanguíneos de AGL de maneira crescente ao longo do tempo e mantém a corticosterona elevada durante todo o experimento, não afetando, no entanto, os níveis de glicose. Quando comparamos estes resultados com o grupo que recebeu SP e foi submetido ao LCE, verifica-se uma resposta muito semelhante nas três variáveis. No grupo SP/LCE a lipólise foi estatisticamente maior no intervalo de tempo 0-30 min, quando comparada ao grupo que recebeu somente SP; a glicemia não apresentou diferença em nenhum tempo experimental e a concentração de corticosterona somente aos 15 min após o estresse. Nos animais tratados com PBS/LCE houve aumento dos níveis plasmáticos de AGL diferentemente do grupo tratado somente com PBS i.c.v., onde não houve alteração na concentração sanguínea das variáveis em estudo.

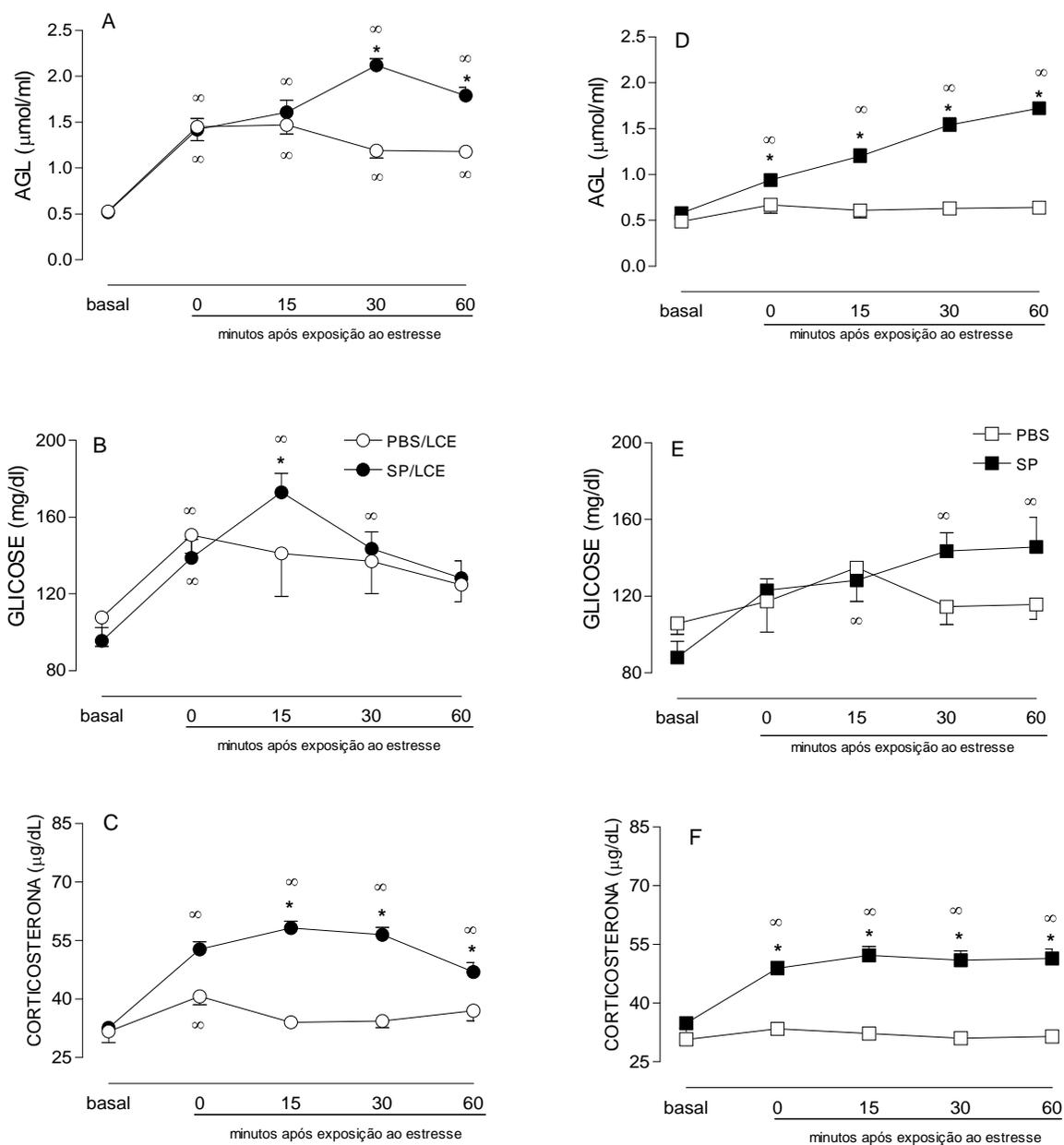


Figure 5. Efeito da injeção i.c.v. de SP e PBS em ratos submetidos (A, B, e C) ou não (D, E, e F) ao LCE nos níveis de AGL, glicose e corticosterona. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, $n = 7$. Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle, no mesmo intervalo de tempo, (∞) entre o valor experimental e o valor basal correspondente ($P < 0.05$, teste *post hoc* de Duncan).

2.3 Efeito da administração i.c.v. de SP, PBS, WIN ou WIN/SP nos parâmetros etológicos e as medidas de exploração do LCE em ratos

A análise estatística dos dados obtidos após as injeções i.c.v. de SP, PBS, WIN ou WIN/SP em ratos submetidos ao LCE mostrou que houve diferenças significativas na percentagem de entradas nos braços abertos [$F(3,38) = 12,48$; $p = 8 \times 10^{-5}$] e de tempo gasto nos braços abertos [$F(3,38) = 10,27$; $p = 4 \times 10^{-4}$]. Os ratos tratados com SP i.c.v. mostraram um número diminuído de percentagem de entradas (A%; Fig. 6) e de tempo gasto nos braços abertos (TA%, Fig. 6), quando comparados aos animais que receberam PBS i.c.v.

O grupo tratado com WIN 51,708 (100 pmol i.c.v.), antagonista seletivo de receptores NK_1 , não alterou os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, mas foi capaz de reverter o efeito do tipo ansiogênico da SP (Fig. 6).

Os parâmetros etológicos mostrados na Tabela 1, número de *head-dipping* (HD) e *stretch attend posture* (SAP), protegidos (do braço fechado para o aberto) ou não, o *rearing* (REA), número de comportamentos de levantar-se, o *grooming* (GRO), a auto-limpeza e o número de *bolos fecais* (BF), não foram significativamente diferentes entre os vários grupos.

Tabela 1- Efeito da administração i.c.v. de SP, PBS, WIN ou WIN/SP nos parâmetros etológicos registrados do LCE em ratos.

GRUPO	REA	GRO	HD	SAP	BF
SP/LCE	6.85±0.74	3.15±0.44	3.46±0.69	3.53±0.71	1.46±0.50
PBS/LCE	3.69±0.63	1.69±0.41	5.38±0.88	3.15±0.61	1.38±0.51
WIN/SP/LCE	3.71±1.02	1.57±0.43	5.86±1.82	1.86±0.94	0.14±0.75
WIN/LCE	3.28±1.11	2.42±1.04	5.00±1.75	1.43±0.75	0

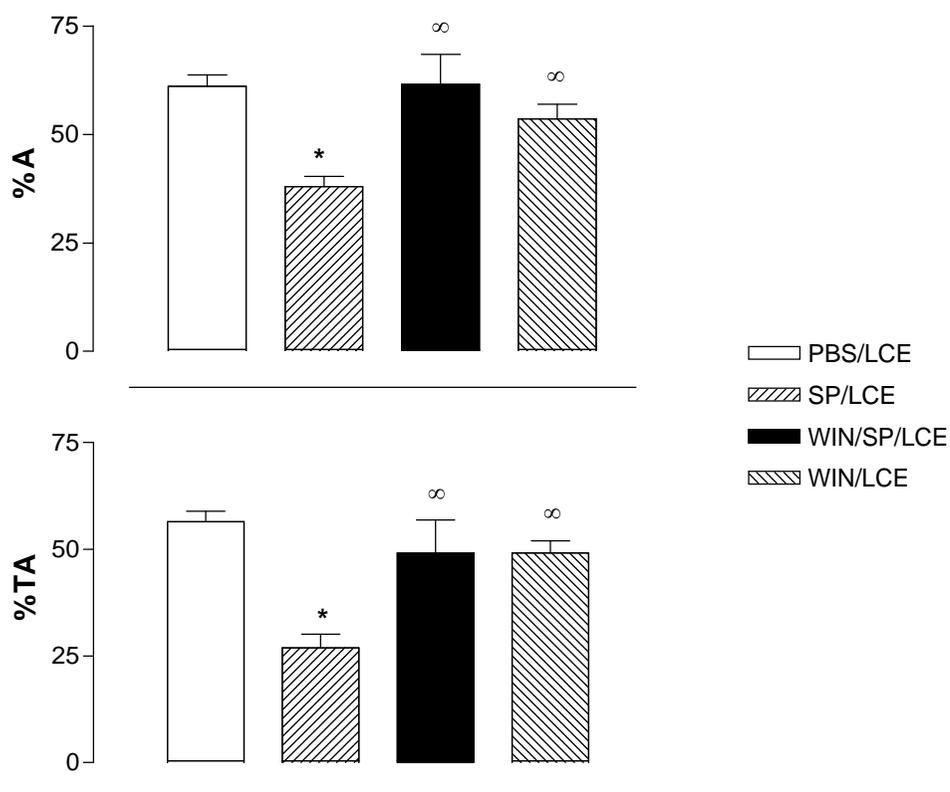


Figura 6 – Exploração do LCE por ratos (n = 7) 5 min após administração i.c.v. SP, PBS (controle) ou WIN, seguido ou não por SP. A% = percentagem de entradas nos braços abertos; TA% = percentagem de tempo gasto nos braços abertos. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (*) = P < 0.05 comparados ao controle (PBS/LCE); (∞) P < 0,05 comparados ao grupo SP/LCE (ANOVA univariada seguida do teste *post hoc* de Duncan).

A injeção central de SP promoveu uma resposta do tipo ansiogênica no LCE que foi revertida pelo antagonista específico dos receptores NK₁, WIN 51,708, confirmando o envolvimento dos receptores NK₁ na modulação deste efeito comportamental da SP.

3. INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO PRÉVIA A UM ESTRESSOR NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS DE ESTRESSE, PARÂMETROS ETOLÓGICOS E MEDIDAS DE EXPLORAÇÃO NO LCE

3.1 Efeito da exposição prévia a um estressor em animais submetidos ao LCE na concentração sanguínea de AGL, glicose e corticosterona

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de AGL [$F(3,120) = 126,17$; $p = 10^{-6}$] quando se compararam os dados obtidos após a retirada do LCE (5 min) em animais previamente estressados por IMO ou NADO, ou não (controle). Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,120) = 75,33$; $p = 10^{-6}$] e interação entre tratamento e tempo [$F(12,120) = 8,57$; $p = 10^{-6}$].

A Fig. 7A mostra que a exposição prévia a um estressor, seguida do LCE, provoca alterações na concentração plasmática de AGL. A resposta lipolítica do grupo submetido ao IMO/LCE foi significativamente menor quando comparada à resposta dos animais submetidos somente ao LCE, em todo o período experimental. No entanto, houve um aumento nos níveis plasmáticos de AGL nos animais expostos a IMO/LCE em todo período experimental, quando comparados com o valor basal (90 min antes de submeter os animais ao protocolo experimental). O valor máximo, imediatamente após a retirada do LCE (tempo 0), foi de 123% acima do valor basal.

Nos animais submetidos ao NADO/LCE o aumento na concentração plasmática dos AGL foi significativamente menor quando comparado à resposta do grupo controle, animais submetidos somente ao LCE, no intervalo de 15-60 min (Fig. 7A). A resposta lipolítica iniciou a partir do tempo 0, mantendo-se este efeito inalterado até o final do período experimental. O valor máximo foi registrado no tempo 0, atingindo 170% acima do valor basal do grupo submetido ao NADO/LCE. Os valores obtidos nesse grupo foram maiores estatisticamente quando comparados aos do grupo IMO/LCE (0-60 min).

No grupo controle (animais submetidos somente ao LCE) obteve-se os maiores valores de resposta lipolítica, sendo que o valor máximo no aumento dos níveis plasmáticos de AGL foi registrado aos 30 min (163% acima do valor basal).

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração plasmática de glicose [$F(3,120) = 32,71$; $p = 10^{-6}$] quando se comparou o dado obtido após a retirada do LCE (5 min) em animais previamente estressados por IMO ou NADO, ou não (controle). Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,120) = 17,74$; $p = 10^{-6}$]. Houve também interação entre tratamentos e tempo [$F(12,120) = 5,91$; $p = 10 \times 10^{-6}$].

Os valores da glicemia do grupo submetido a IMO/LCE foram significativamente diferentes quando comparados à resposta do grupo controle, os animais submetidos somente ao LCE, no período experimental de 0-30 min (Fig. 7B). Não houve alteração nos níveis plasmáticos de glicose nos animais expostos à IMO/LCE em todo período experimental, quando comparados ao valor basal.

Nos animais submetidos ao NADO/LCE houve um rápido aumento na concentração plasmática de glicose no tempo 15, declinando imediatamente a valores próximos ao valor basal. O valor máximo foi registrado no tempo 15, atingindo 46% acima do valor basal. No grupo controle houve um aumento na concentração plasmática de glicose, sendo que o valor máximo foi aos 15 min (140% acima do valor basal). A resposta glicêmica dos animais submetidos à ação prévia de um estressor (IMO ou NADO) seguido pela exposição ao LCE não foi estatisticamente diferente.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas na concentração sérica de corticosterona [$F(3,80) = 95,63$; $p = 10^{-6}$], quando se comparou o dado obtido após a retirada do LCE (5 min) em animais previamente estressados por IMO ou NADO, ou não (controle). Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos [$F(4,80) = 135,24$; $p = 10^{-6}$]. Houve também interação entre tratamento e tempo [$F(12,80) = 5,80$; $p = 10^{-6}$].

O aumento na corticosterona do grupo submetido a IMO/LCE foi significativamente maior quando comparado à resposta do grupo controle (animais submetidos somente ao LCE), em todo o período experimental (Fig. 7C). O aumento nos níveis séricos de corticosterona nos animais expostos a IMO/LCE ocorreu em todo período experimental quando comparados com o valor basal, sendo que o valor máximo foi imediatamente após a retirada do LCE (tempo 0) e foi de 197% acima do valor basal. No grupo controle o valor máximo foi no tempo 0 (64% acima do valor basal).

Nos animais submetidos ao NADO/LCE houve aumento nos níveis sanguíneos de corticosterona significativamente maior quando comparado à resposta do grupo controle, isto é, animais submetidos somente ao LCE, em todo o período experimental (Fig. 7C). Essa resposta foi verificada a partir do tempo 0, e que se manteve elevada até o final do período experimental. O valor máximo foi registrado no tempo 0, atingindo 172% acima do valor basal. O aumento na concentração sérica de corticosterona dos animais submetidos à ação prévia de um estressor (IMO ou NADO), seguido pela exposição ao LCE não foram estatisticamente diferentes.

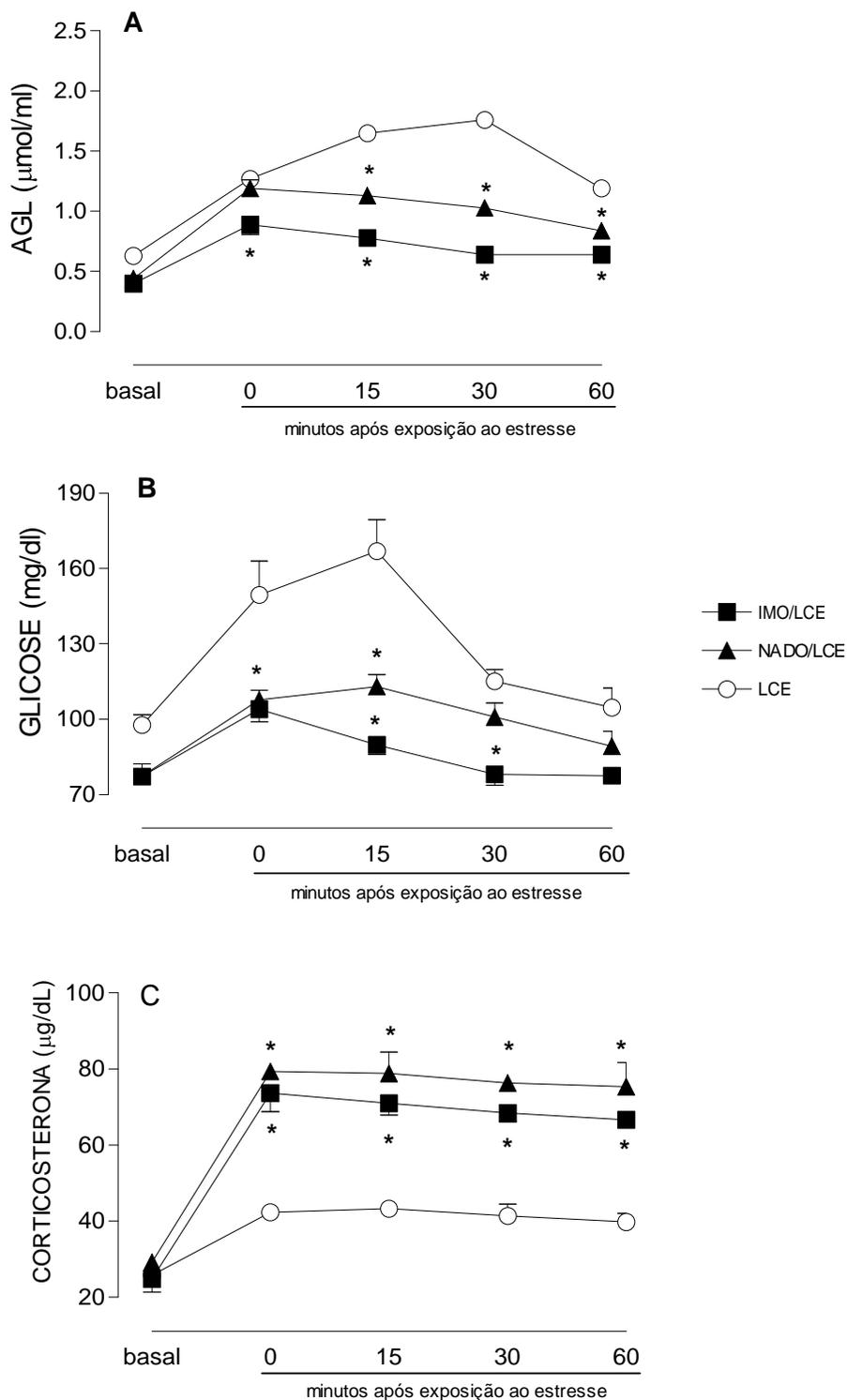


Figura 7. Efeito da combinação de dois estressores nos níveis sanguíneos de A- AGL, B- glicose e C- corticosterona. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, n = 7. Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle, no mesmo intervalo de tempo ($P < 0.05$, ANOVA seguida do teste *post hoc* de Duncan).

Nossos resultados mostram que a exposição a dois estressores diferentes alterou as variáveis bioquímicas em estudo, quando comparados ao grupo controle (LCE). A resposta lipolítica nos grupos IMO/LCE e NADO/LCE foi estatisticamente menor quando comparada a resposta do grupo controle. No entanto, houve aumento na concentração de AGL nos dois grupos experimentais. Não houve alteração na glicemia, nos dois modelos estudados, quando comparados com o grupo controle (LCE), exceto no grupo NADO/LCE onde foi observado um leve aumento aos 15 min com relação ao tempo basal. A concentração de COR foi significativamente maior comparada ao grupo controle nos dois protocolos estudados, em todo período experimental.

3.2 Efeito da exposição prévia a um estressor em animais submetidos ao LCE nos parâmetros etológicos e as medidas de exploração do LCE em ratos

Os resultados dos parâmetros etológicos número de *head-dipping* (HD) e *stretch attend posture* (SAP), protegidos (do braço fechado para o aberto) ou não, *rearing* (REA), número de comportamentos de levantar-se, *grooming* (GRO), a auto-limpeza e número de *bolos fecais* (BF) são mostrados na Tabela 2. A análise estatística dos dados obtidos após a retirada do LCE (5 min) em animais previamente estressados por IMO ou NADO mostrou haver diferenças significativas nos parâmetros etológicos observados [$F(19,120) = 3,38$; $p = 2 \times 10^{-4}$].

Tabela 2- Influência de diferentes tipos de estresse aplicados imediatamente antes do LCE nos parâmetros etológicos registrados em ratos.

GRUPO	REA	GRO	HD	SAP	BF
IMO/LCE	2.71±1.15	3.28±0.94	1.86±0.55	0.57±0.37**	0.86±0.55
NADO/LCE	4.14±1.01	5.57±1.07*	5.43±0.61	5.00±1.23	0.57±0.20
LCE	3.86±1.30	1.57±0.48	4.00±1.29	5.43±1.74	2.00±0.72

* NADO/LCE ≠ LCE ** IMO/LCE ≠ TODOS

O número de GRO no grupo submetido ao NADO/LCE superou o obtido no grupo controle. Os animais expostos a IMO/LCE tiveram o menor valor em SAP quando comparados aos demais grupos. Todas as diferenças registradas foram estatisticamente significativas.

A Fig. 8 mostra que, quando o animal foi submetido a um estressor imediatamente antes do LCE, houve alterações significativas nas medidas de exploração do LCE em comparação aos valores do grupo controle. A análise estatística dos dados obtidos após a retirada do LCE (5 min) em animais previamente estressados por IMO ou NADO mostrou haver diferenças significativas na percentagem de entradas nos braços abertos [$F(3,24) = 3,53$; $p = 0,03$] e na percentagem de tempo gasto nos braços abertos [$F(3,24) = 19,68$; $p = 10^{-5}$].

Os ratos submetidos previamente ao estresse de NADO mostraram um número diminuído na percentagem de entradas nos braços abertos (A%, Fig. 8A), quando comparado aos animais controle (somente submetidos ao LCE). A percentagem de tempo gasto nos braços abertos (TA%, Fig. 8B) foi menor ($p < 0,05$) em todos os grupos experimentais quando comparada ao grupo controle. Observa-se que a submissão aos diferentes estresses reduziu a exploração dos braços abertos, indicando um perfil do tipo ansiogênico para os estressores neste modelo experimental.

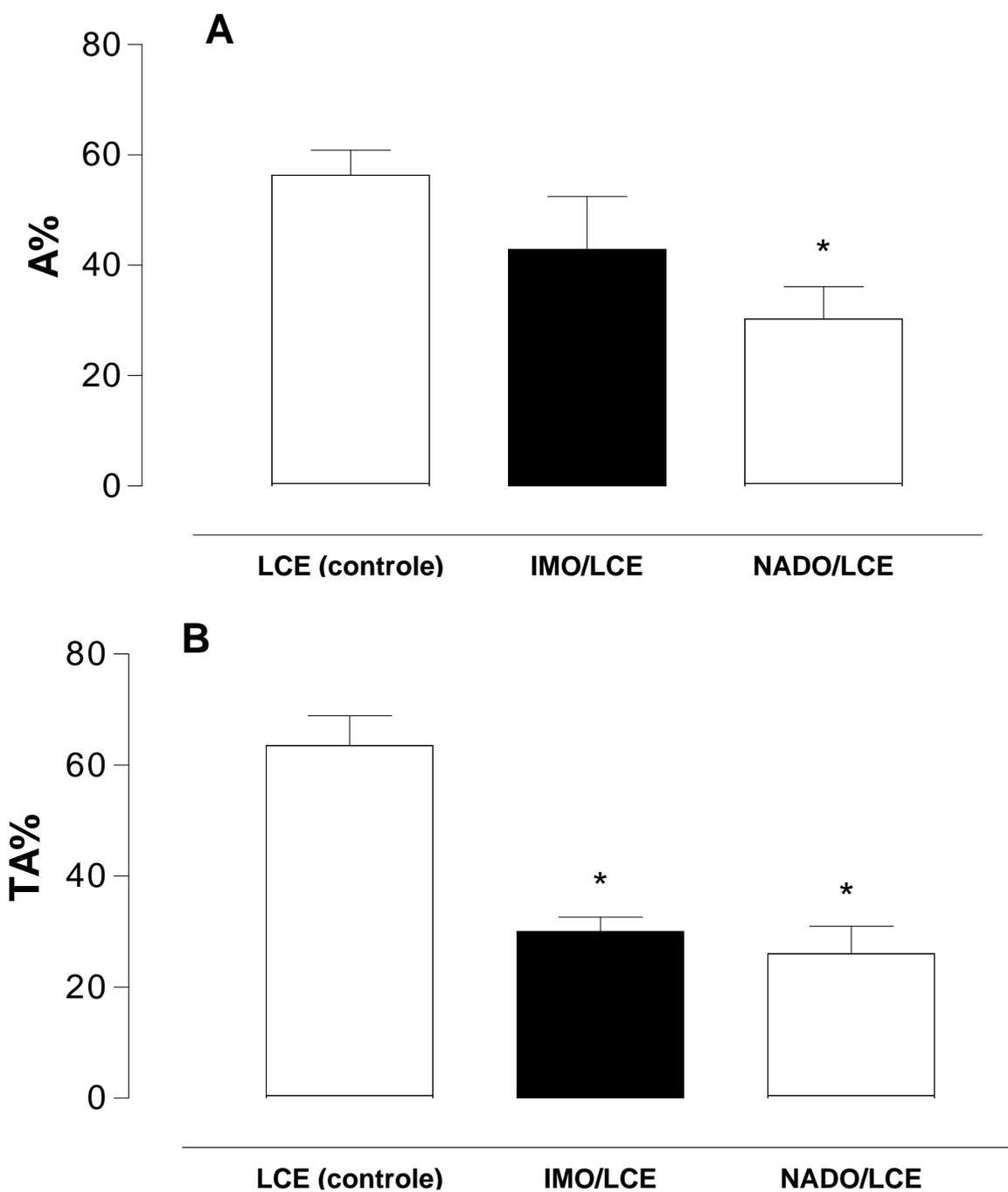


Figura 8. Exploração dos braços abertos do LCE por ratos ($n = 7$) após o estresse de IMO e NADO seguido do LCE por 5 min. A% = percentagem de entradas nos braços abertos; TA% = percentagem de tempo gasto nos braços abertos. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média (*) $P < 0.05$ comparados ao controle (ANOVA univariada seguida teste *post hoc* de Duncan).

4. PARTICIPAÇÃO DO EIXO HPA NO EFEITO DO ESTRESSE NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, PARÂMETROS ETOLÓGICOS E NAS MEDIDAS DE EXPLORAÇÃO DO LCE

4.1 Efeito da ADX nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona em ratos submetidos ou não ao LCE

A ANOVA de três vias mostrou que não houve diferenças significantes na concentração plasmática de AGL quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,120) = 0,67; p = 0,41], mas houve diferença quando foram comparados os animais submetidos ou não ao LCE [F(1,120) = 70,20; p = 10⁻⁶] e entre os tempos [F(4,120) = 24,00; p = 10⁻⁶]. Houve interação somente entre a exposição ou não ao LCE e o tempo [F(4,120) = 6,82; p = 5x10⁻⁴].

A Fig. 9A mostra que não houve diferenças significativas na concentração plasmática de AGL comparando-se os grupos ADX/LCE e SHAM/LCE. No grupo ADX/LCE houve um aumento significativo na concentração plasmática de AGL imediatamente após a retirada do animal do LCE (tempo 0), que se manteve até os 15 min do tempo experimental. O valor máximo foi no tempo 0 chegando a 106% acima do valor basal (90 min antes de submeter o animal ao protocolo experimental). Os valores do grupo SHAM/LCE foram maiores que o valor basal, em todos os tempos de observação, sendo que o valor máximo de 122% acima do valor basal foi registrado no tempo 0. Os níveis de AGL foram significativamente maiores nos animais ADX/LCE e nos animais SHAM/LCE, quando comparados com os grupos ADX e SHAM não submetidos ao LCE (Fig. 9D). Nos animais ADX e SHAM não submetidos ao LCE não houve aumento dos níveis plasmáticos de AGL durante todo o período experimental. A concentração plasmática de AGL no tempo 0 do grupo ADX é diferente do valor basal, sem contudo alcançar diferenças estatisticamente significantes do grupo controle (PBS)

A ANOVA de três vias mostrou que não houve diferenças significantes na concentração plasmática de glicose quando se compararam os dados obtidos de animais ADX

ou SHAM, [F(1,120) = 0,24; p = 0,63], mas houve diferença quando foram comparados os animais submetidos ou não ao LCE [F(1,120) = 10,91; p = 10⁻²] e entre os tempos [F(4,120) = 6,22; p = 10⁻³]. Houve interação entre animais ADX e SHAM e os tempos [F(4,120) = 3,28; p = 0,01] e entre a exposição ou não ao LCE e os tempos [F(4,120) = 3,70; p = 0,007].

Na Fig. 9B e 9E são mostrados os resultados das alterações nos níveis plasmáticos de glicose em animais ADX e SHAM, submetidos ou não ao LCE. Houve diferença significativa na concentração plasmática de glicose, somente no tempo 0, quando comparados os grupos ADX/LCE e SHAM/LCE, sendo que nos animais SHAM/LCE o valor da glicemia foi maior nesse tempo. No grupo ADX/LCE não houve alteração na concentração plasmática de glicose em todo período experimental, quando comparado ao valor basal. O valor da glicemia no grupo SHAM/LCE foi maior que o valor basal (53%) somente no tempo 0. Nos animais ADX/LCE não houve diferença significativa na concentração de glicose em todo intervalo experimental, quando comparados ao grupo ADX (não submetidos ao LCE). Os níveis de glicose foram significativamente maiores nos animais SHAM/LCE somente no tempo 0 quando comparados com o grupo SHAM não submetidos ao LCE.

A ANOVA de três vias mostrou que houve diferenças significantes na concentração sérica de corticosterona quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,100) = 2.739,16; p = 10⁻⁶], animais submetidos ou não ao LCE [F(1,100) = 26,12; p = 2 x 10⁻⁵] e entre os tempos [F(4,100) = 7,32; p = 3x10⁻⁴]. Houve interação entre animais ADX e SHAM e exposição ou não ao LCE [F(4,100) = 26,12; p = 2x10⁻⁵]; entre animais ADX e SHAM e os tempos [F(4,100) = 7,51; p = 2x10⁻⁴]; entre exposição ou não ao LCE e os tempos [F(4,100) = 10,04; p = 10⁻⁵] e entre animais ADX e SHAM, exposição ou não ao LCE e os tempos [F(4,100) = 9,50; p = 10⁻⁵].

Na Fig. 9C e 9F são mostrados os resultados das alterações nos níveis sanguíneos de corticosterona em animais ADX e SHAM, submetidos ou não ao LCE. A Fig. 9C confirma a

condição ADX pelos valores mínimos de corticosterona obtidos. Os níveis de corticosterona foram significativamente maiores nos animais SHAM/LCE, em todo período experimental, quando comparado com o grupo SHAM. Os níveis séricos de corticosterona no grupo SHAM/LCE foram maiores que o valor basal em todo período experimental, sendo que o valor máximo (85%) foi registrado no tempo 0.

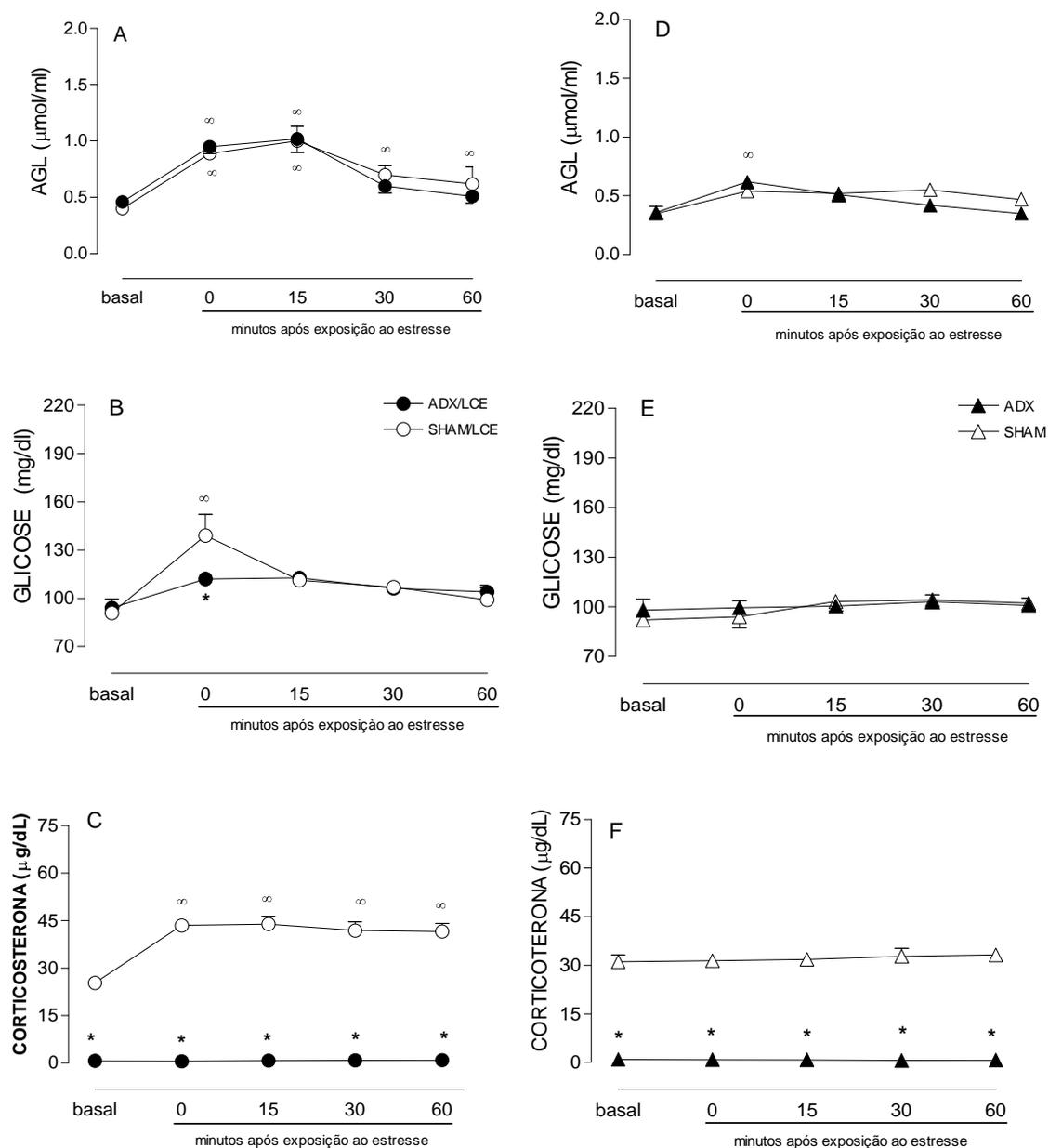


Figure 9. Alterações nos níveis sanguíneos de AGL (A, D), glicose (B, E) e corticosterona (C, F) em animais ADX ou SHAM, submetidos ou não ao LCE. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, $n = 7$. Diferenças estatisticamente significativas (*) entre o grupo experimental e o controle (SHAM), no mesmo intervalo de tempo e (∞) entre o grupo experimental e o valor basal correspondente ($P < 0.05$, ANOVA seguida do teste *post hoc* de Duncan).

Os animais submetidos ao LCE (ADX e SHAM) apresentam um aumento de AGL no intervalo de 0-15 min após o LCE, assim como de GLI. No entanto, apenas os animais SHAM apresentam aumento da corticosterona (0-60 min).

4.2 Efeito da ADX nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona em ratos submetidos ao LCE tratados com SP i.c.v.

A ANOVA de três vias mostrou que houve diferenças significantes na concentração plasmática de AGL quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,120) = 23,91; $p = 3 \times 10^{-5}$], animais tratados i.c.v. com SP ou PBS [F(1,120) = 11,64; $p = 8 \times 10^{-3}$] e entre os tempos [F(4,120) = 16,89; $p = 10^{-6}$]. Houve interação entre animais ADX e SHAM e tratados com SP ou PBS i.c.v [F(1,120) = 39,80; $p = 10^{-6}$]; entre o tratamento com SP ou PBS i.c.v. e os tempos [F(4,120) = 4,48; $p = 0,002$]; e entre animais ADX e SHAM, tratados com SP ou PBS i.c.v. e os tempos [F(4,120) = 3,87; $p = 0,005$].

A Fig. 10A mostra que houve aumento nos níveis plasmáticos de AGL nos grupos ADX/SP e SHAM/SP, sendo que nos animais SHAM/SP a resposta lipolítica foi maior que nos animais ADX/SP em todo período experimental. Os animais ADX/SP apresentaram um aumento na concentração plasmática dos AGL a partir do tempo de 15 min, quando comparados com o valor basal (90 min antes de submeter o animal ao protocolo experimental). O valor máximo foi de 181% (acima do valor basal), aos 30 min. Os animais SHAM/SP apresentaram um aumento na concentração plasmática dos AGL a partir do tempo de 0 min que se manteve até os 60 min do tempo experimental (valor máximo foi de 189% acima do valor basal aos 30 min).

A Fig. 10D mostra que houve aumento nos níveis plasmáticos de AGL nos grupos ADX/PBS e SHAM/PBS. Os animais ADX/PBS apresentaram um ligeiro aumento nos níveis de AGL dos 30-60 min, atingindo 94% acima do valor basal aos 30 min. Nos animais SHAM

tratados com PBS i.c.v., o aumento máximo foi percebido somente no tempo 0 (37% acima do valor basal), que se manteve até aos 30 min.. A resposta lipolítica foi diferente entre os grupos SHAM/SP e SHAM/PBS no intervalo de 30-60 min, mas não houve diferença significativa na concentração plasmática de AGL entre o grupo ADX/SP e ADX/PBS (Fig. 10A e 10D).

A ANOVA de três vias mostrou que houve diferenças significantes na concentração plasmática de glicose quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,120) = 4,38; p = 0,04], animais tratados i.c.v. com SP ou PBS [F(1,120) = 9,95; p = 0,002] e entre os tempos [F(4,120) = 3,95; p = 0,004]. Houve interação somente entre animais ADX e SHAM e tratados com SP ou PBS i.c.v [F(1,120) = 6,65; p = 0,01].

As Fig. 10B e 10E mostram as alterações na glicemia nos grupos ADX/SP, SHAM/SP, ADX/PBS e SHAM/PBS. Nos animais ADX tratados centralmente com SP pode-se observar uma discreta elevação na concentração de glicose plasmática aos 15 min (64% acima do valor basal), mas não houve diferença comparada ao grupo controle (SHAM/SP). A Fig. 10E mostra que no grupo ADX/PBS não houve alteração dos níveis sanguíneos de glicose, mas houve aumento significativo na glicemia nos animais SHAM/PBS. A administração i.c.v. de SP em animais SHAM provocou um aumento na concentração da glicose a partir do tempo 15 até os 60 min, atingindo o valor máximo aos 15 min (65% acima do valor basal). Houve diferença significativa na concentração plasmática de glicose entre o grupo SHAM/SP e SHAM/PBS, no intervalo de tempo de 30-60 min. Não houve diferença significativa na concentração plasmática de glicose entre o grupo ADX/SP e ADX/PBS .

A ANOVA de três vias mostrou que houve diferenças significantes na concentração sérica de corticosterona quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,100) = 3.699,38; p = 10⁻⁶], animais tratados i.c.v. com SP ou PBS [F(1,100) = 113,30; p = 10⁻⁶] e entre os tempos [F(4,100) = 11,58; p = 10⁻⁶]. Houve interação entre animais ADX e SHAM e tratados i.c.v. com SP ou PBS [F(1,100) = 109,71; p = 10⁻⁶]; entre animais ADX e

SHAM e os tempos [$F(4,100) = 12,72$; $p = 10^{-6}$]; entre os tempos e os animais tratados i.c.v. com SP ou PBS [$F(4,100) = 9,84$; $p = 10^{-5}$] e entre animais ADX e SHAM, tratados i.c.v. com SP ou PBS e os tempos [$F(4,100) = 10,26$; $p = 10^{-5}$].

As Fig. 10C e 10F confirmam a condição ADX com os valores de corticosterona obtidos nos grupos tratados i.c.v. com SP ou PBS. O nível de corticosterona foi significativamente menor nos animais SHAM/SP, somente aos 60 min, quando comparados aos animais SHAM/PBS. Os níveis séricos de corticosterona no grupo SHAM/SP, foi maior que o valor basal em todo período experimental, sendo que o valor máximo de 71%, foi registrado no tempo 15 min. Os animais SHAM/PBS apresentaram aumento na concentração de corticosterona em todo período experimental, atingindo o valor máximo aos 15 min (61% acima do valor basal).

Nos animais ADX somente a resposta lipolítica foi significativa. Os animais SHAM apresentaram aumento nas três variáveis em estudo. Observa-se que essa resposta foi melhor nos animais SHAM/SP. Percebe-se, portanto, que o LCE e a SP são fatores indutores da mobilização de substratos energéticos *per se*.

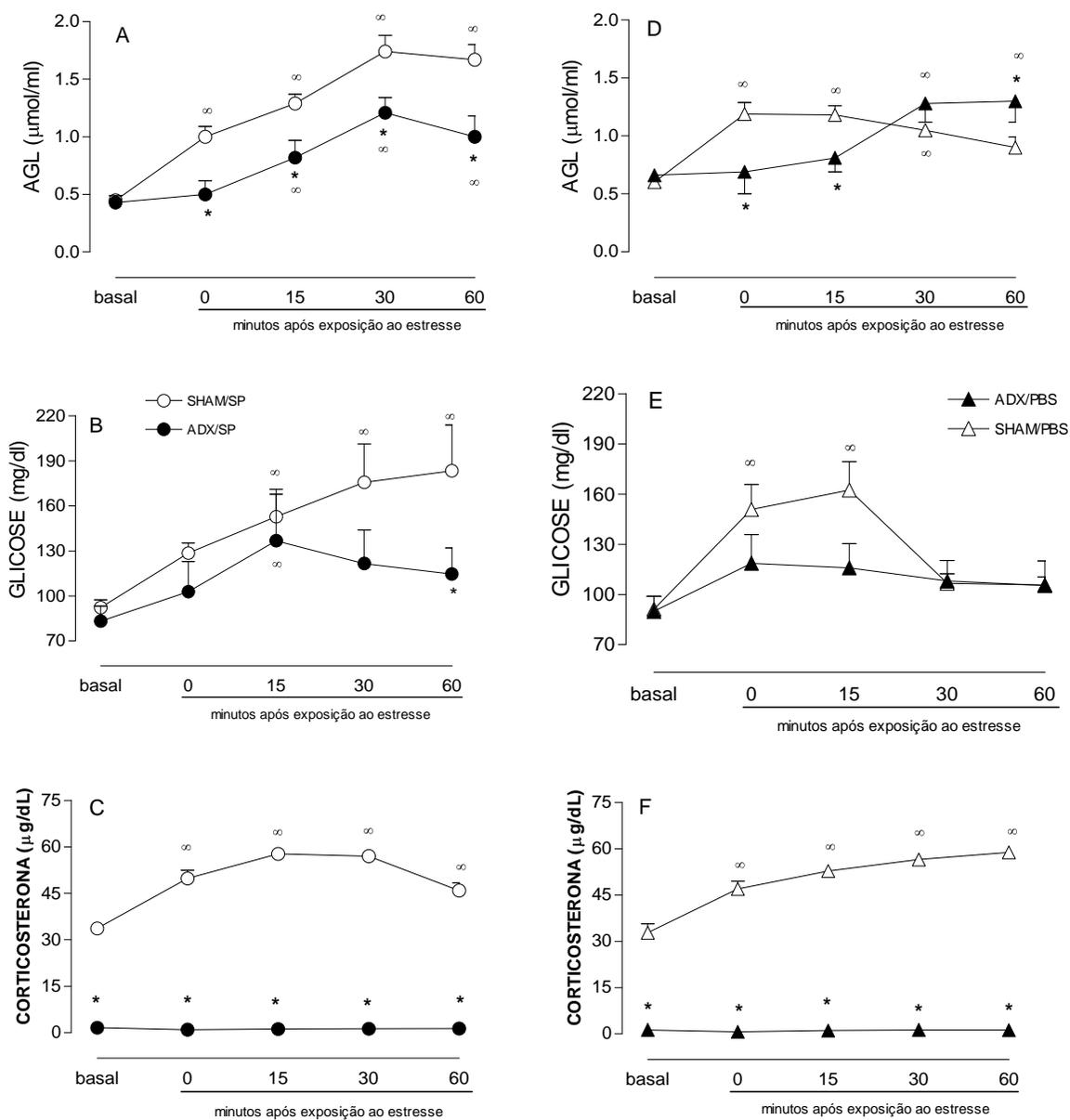


Figura 10. Alterações nos níveis plasmáticos de AGL (A, D), glicose (B, E) e corticosterona (C, F) em animais ADX ou SHAM, com injeção i.c.v. de SP ou PBS, submetidos ao LCE. Dados representados como média ± erro padrão da média, n = 7. Diferenças estatisticamente significantes (*) entre o grupo experimental e o controle (SHAM), no mesmo intervalo de tempo e (∞) entre o grupo experimental e o valor basal correspondente (P < 0.05, ANOVA seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.3 Efeito da ADX sobre os parâmetros etológicos e as medidas de exploração do LCE em ratos

A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significantes na percentagem de entradas nos braços abertos, quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,52) = 2,93; p = 0,09], mas houve diferença entre animais tratados i.c.v. com SP ou PBS [F(1,52) = 31,91; p = 10⁻⁵]. Houve interação entre animais ADX e SHAM tratados com SP ou PBS i.c.v. [F(1,52) = 5,61; p = 0,02] (Fig.11).

Os dados estatísticos mostraram que houve diferenças significantes na percentagem de tempo gasto nos braços abertos, quando se compararam os dados obtidos de animais ADX ou SHAM, [F(1,52) = 43,45; p = 10⁻⁶], e entre animais tratados i.c.v. com SP ou PBS [F(1,52) = 197,25; p = 10⁻⁶]. Houve ainda interação entre animais ADX e SHAM tratados com SP ou PBS i.c.v. [F(1,52) = 19,59; p = 5x10⁻⁵].

A Fig. 11 mostra que os animais SHAM e ADX tratados com SP i.c.v. apresentaram os valores mais baixos para os parâmetros de exploração dos braços abertos em estudo. Todas as diferenças registradas foram estatisticamente significantes (P<0,05).

Os parâmetros etológicos mostrados na Tabela 3, número de *head-dipping* (HD) e *stretch attend posture* (SAP), protegidos (do braço fechado para o aberto) ou não, *rearing* (REA), número de comportamentos de levantar-se, *grooming* (GRO), auto-limpeza e número de *bolos fecais* (BF) não foram significativamente diferentes entre os vários grupos experimentais.

Tabela 3 - Efeito da adrenalectomia nos parâmetros etológicos registrados no LCE em ratos.

GRUPO	REA	GRO	HD	SAP	BF
ADX/SP	7.64±0.84	4.64±0.61	5.57±0.84	3.57±0.66	1.35±0.48
SHAM/SP	4.36±0.69	3.07±0.41	2.14±0.37	2.00±0.39	1.14±0.37
ADX/PBS	6.50±0.80	2.14±0.60	3.43±0.61	2.21±0.45	1.07±0.34
SHAM/PBS	3.86±0.83	1.43±0.46	1.93±0.24	1.57±0.33	0.71±0.24

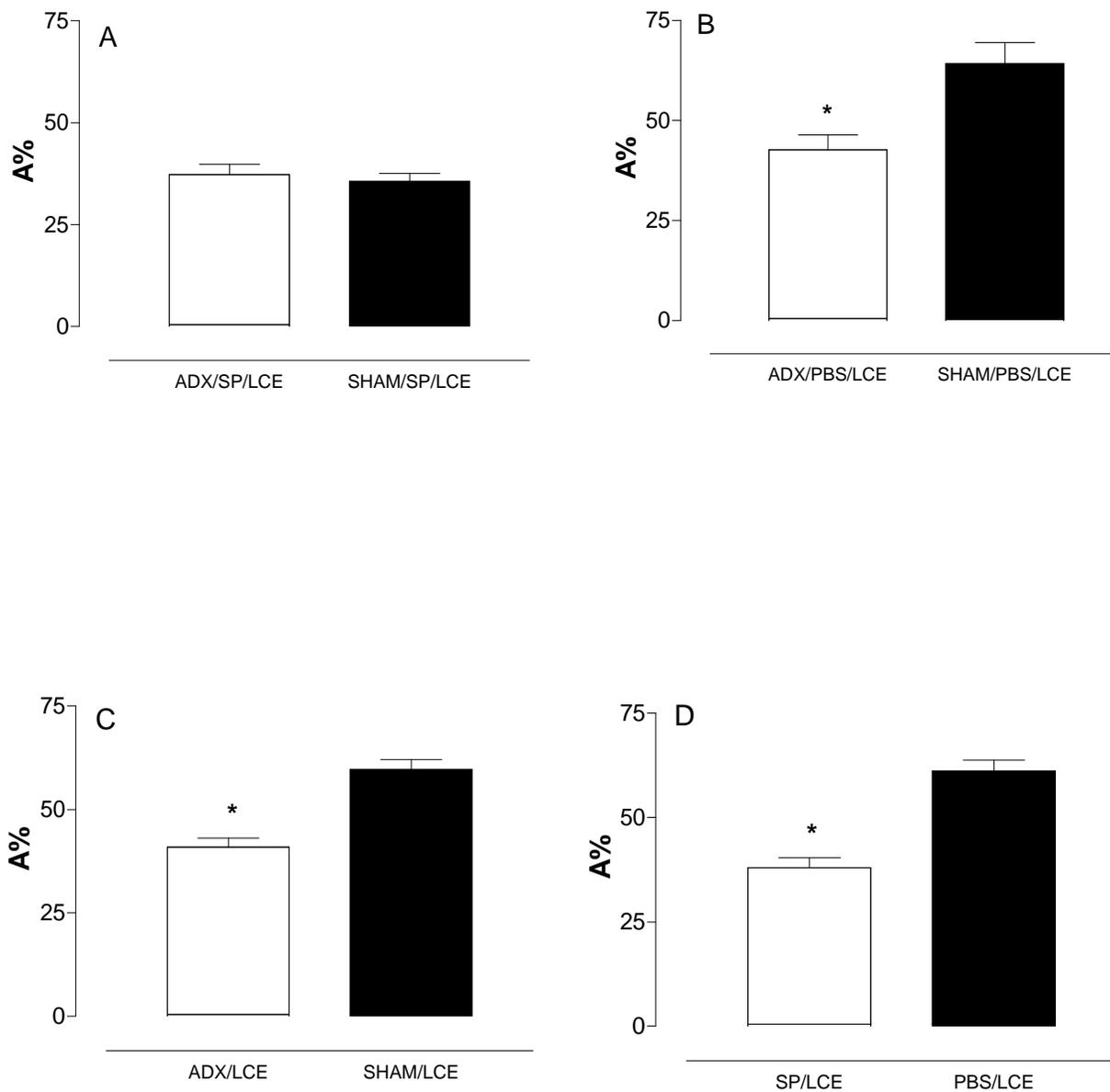


Figura 11 – Efeito da adrenalectomia (n = 7) 5 min após a administração i.c.v. SP ou PBS na percentagem de entradas nos braços abertos (A%). Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média. (*) entre o grupo experimental e o controle (SHAM), (P < 0.05, ANOVA seguida do teste *post hoc* de Duncan).

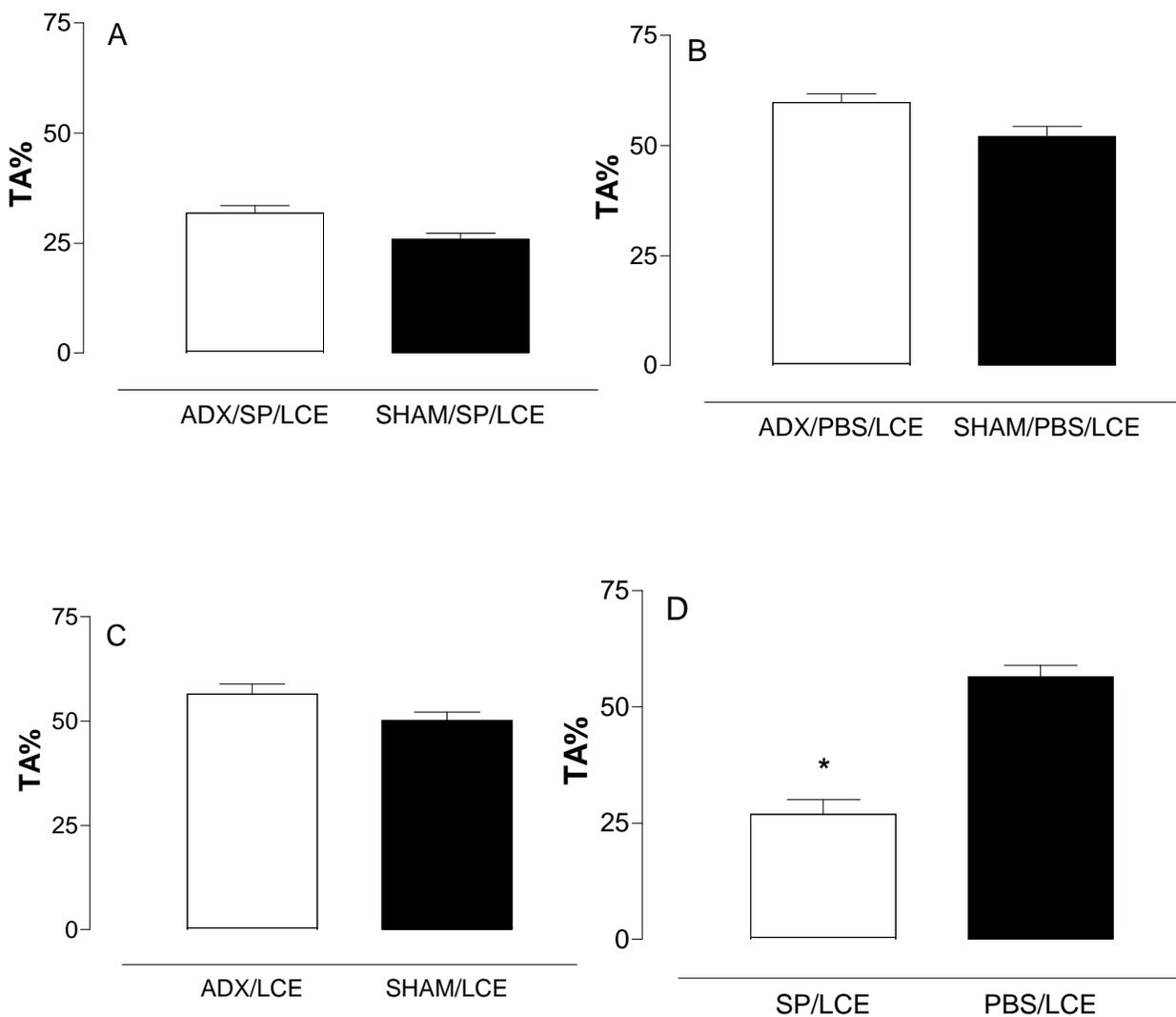


Figura 12 – Efeito da adrenalectomia (n = 7) 5 min após a administração i.c.v. SP ou PBS sobre a percentagem de tempo gasto nos braços abertos (TA%). Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. (*) entre o grupo experimental e o controle (SHAM), (P < 0.05, ANOVA seguida do teste *post hoc* de Duncan).

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”
(Friedrich Nietzsche)

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO

As respostas comportamentais e fisiológicas decorrentes da exposição ao estresse têm sido extensivamente estudadas. Embora uma grande quantidade de variáveis fisiológicas seja responsiva aos estressores, muita atenção tem sido dada àquelas que direta ou indiretamente ativam o SNS e o eixo HPA (Natelson *et al.*, 1987; Verago *et al.*, 2001). Os glicocorticóides, por sua vez, são os produtos finais da ativação do eixo HPA e da resposta central ao estresse. A este respeito, a corticosterona, da mesma forma que o cortisol em humanos (De Kloet *et al.*, 2005; Charmandari, *et al.*, 2005), tem sido intensamente usada como marcador de estresse em ratos e camundongos (Armario *et al.*, 1986; Armario e Jolin, 1989; De Boer *et al.*, 1990; Van Der Kar *et al.*, 1991; Verago *et al.*, 2001; González e Escobar, 2002). Os resultados aqui apresentados mostram que outros marcadores bioquímicos podem ser usados como índices fisiológicos fidedignos de estados de estresse/ansiedade.

Dentre as respostas compensatórias que fazem parte da SGA estão as alterações metabólicas. A fim de que o organismo tenha o aporte energético necessário para a reação de “*luta ou fuga*”, os hormônios liberados durante a reação de estresse agem sobre os tecidos de reserva como o adiposo, o muscular e o hepático, modificando o metabolismo de lipídios e de carboidratos (Lafontan, 2001; Radzuik e Pye, 2001). Os mecanismos pelos quais os agentes estressores afetam o metabolismo da glicose e dos lipídios são de grande interesse para o entendimento da SGA, sendo consenso que o SNC desempenha um importante papel na regulação do metabolismo hepático de glicose e lipídios, via SNS e hormônios metabólicos (Nonogaki, 2000).

Os experimentos aqui relatados buscaram verificar o comportamento dos níveis plasmáticos de AGL e glicose como possíveis marcadores de estresse e do estado de ansiedade. Inicialmente, caracterizamos essas variáveis bioquímicas como marcadores de

estresse, submetendo os animais a diferentes tipos de estressores emocional e/ou físico (Van de Kar e Blair, 1999; Pácak e Palkovits, 2001): imobilização (IMO), nado forçado (NADO) e exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE). Em seguida, verificamos o uso dessas variáveis bioquímicas como marcadores alternativos/complementares na indicação do estado de ansiedade experimental em ratos, utilizando o mesmo paradigma experimental usado anteriormente em nosso laboratório, isto é, a manipulação farmacológica com um agonista e um antagonista neurocinérgico NK₁ em ratos submetidos ou não ao LCE. No presente trabalho, a dosagem sanguínea de corticosterona foi usada como marcador convencional e os níveis plasmáticos de AGL e glicose, eleitos como possíveis marcadores alternativos de estresse. Os resultados, neste estudo, mostram inequivocamente que os níveis plasmáticos de AGL e glicose podem ser usados como índices de estresse/ansiedade agudos.

A exposição aguda a estressores estimula uma resposta neuroendócrina, mas o perfil desta resposta depende do tipo de estressor, sua intensidade e duração (Wennlund *et al.*, 1994; Pácak *et al.*, 1998; Sampaio-Barros *et al.*, 2003). Vários estudos mostram respostas neuroendócrinas diferentes durante a exposição a diferentes tipos de estressores (Pácak, *et al.*, 1998). Por exemplo, a glicopenia provoca uma estimulação seletiva do eixo HPA e adrenomedular (Goldstein *et al.*, 1993), a ortostase, a hipertermia, e a exposição ao frio e a ambientes novos ativam o SNS (Romero *et al.*, 1993; Van Den Bruse *et al.*, 2001) e a privação de água, ativa seletivamente a liberação de vasopressina (Schadt e Ludbrook, 1991).

O estresse por choque nas patas é acompanhado de aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose e TAG, mas não de glicerol (Verago, *et al.*, 2001), enquanto a natação causa aumento na concentração de glicose, lactato e AGL no sangue assim como na lipólise basal analisada em adipócitos isolados (Sampaio-Barros *et al.*, 2003). A concentração plasmática de ACTH, noradrenalina e adrenalina em ratos, após exposição à hemorragia, à hipoglicemia por injeção de insulina, ao frio, à imobilização ou à dor

(formalina) foi medida por Pácak e colaboradores (1998). A exposição ao frio provocou um aumento nas três variáveis em estudo; a melhor resposta de aumento na concentração plasmática de noradrenalina foi em animais expostos ao frio e a da adrenalina, à hipoglicemia induzida pela insulina; a hemorragia, por sua vez, provocou uma pequena resposta da noradrenalina e da adrenalina. Esses dados são consistentes com o conceito de que cada estressor desencadeia sua própria resposta neuroquímica e neuroendócrina ao estresse. Os dados do presente estudo estão de acordo com esses achados, pois os resultados obtidos mostram que as variáveis estudadas sofreram alterações diferenciadas, conforme o tipo de estressor a que o animal foi submetido.

Todas as variáveis bioquímicas avaliadas foram aumentadas pela exposição aos diferentes tipos de estresse, e a intensidade e a duração destes aumentos dependeu do estressor usado. Os níveis de corticosterona e AGL apresentaram respostas significativamente maiores que a glicose, quando comparadas a intensidade e duração dessas respostas aos diferentes estressores (IMO e LCE). O aumento nos níveis de corticosterona, apesar de apresentar intensidade muito próxima ao aumento da glicemia nos animais submetidos ao IMO e ao LCE, foi mais duradouro, mantendo-se em todo o período experimental. Os níveis de glicose, embora mais elevados que os valores do grupo controle, apresentaram aumento menos evidente e mais fugaz.

Os glicocorticóides, principalmente a corticosterona no rato e o cortisol em humanos, são os efetores do eixo HPA e participam no controle da homeostase e da resposta do organismo aos estressores (Peeters e Broekkamp, 1994; Habib *et al.*, 2001). A ativação do eixo HPA é considerada um dos principais indicadores de estresse (Martí *et al.*, 1999; Márquez *et al.*, 2005). Em concordância com nossos resultados, foi observado um aumento significativo do CRH e de corticosterona em ratos submetidos à laparotomia e craniotomia, demonstrando que o estresse cirúrgico ativa o eixo HPA (Dekeyser *et al.*, 2000), assim como

ocorre em ratos submetidos ao estresse crônico por imobilização (Gómez *et al.*, 1996; Jezova *et al.*, 1999). Em ratos jovens, foi demonstrado um aumento marcante na resposta adrenocortical ao estresse induzido pela privação materna (Rosenfeld *et al.*, 1992; Pihoker *et al.* 1993). De modo similar, foram também observados aumentos da concentração plasmática de ACTH e corticosterona, em todos os grupos, em ratos expostos a vários agentes estressores – imobilização, frio, hemorragia, hipoglicemia causada pela injeção de insulina, dor e lesão tecidual causada pela injeção de formalina (Pácak *et al.*, 1995)

A lipólise, por sua vez, tem sido estudada em situações de estresse em humanos (Yamaguchi, 1992; Coppack *et al.*, 1994; Wennlund *et al.*, 1994; Large e Arner, 1998; Jeukendrup *et al.*, 1998), ratos (Coimbra e Migliorini, 1983; Migliorini *et al.*, 1997; Zaia, *et al.*, 1997) e aves (Freeman, 1970; Davison, 1973; McKeown *et al.*, 1974; John *et al.*, 1988; De Mello, 1996). Muitas evidências sugerem que o SNS desempenha um importante papel na lipólise. Estudos nos quais houve abolição da atividade simpática por bloqueio de neurônios ganglionares ou de fibras pós-ganglionares (Havel e Golfien, 1959b), ou ainda pela simpatectomia cirúrgica, mostraram uma inibição do rápido aumento dos AGL em resposta ao exercício, mudança de postura, exposição ao frio ou estresse fisiológico (Hales *et al.*, 1978). A noradrenalina, originada principalmente de terminações nervosas simpáticas existentes na parede vascular do tecido adiposo branco, é o neurotransmissor responsável pela lipólise nessas situações fisiológicas (Scheureick *et al.*, 1989). Aumentos da concentração plasmática de AGL e de glicerol foram observados em cães e em humanos após infusão endovenosa de catecolaminas (Connolly *et al.*, 1991). Foi ainda observada, por Galitzky e colaboradores (1993), a elevação de AGL no plasma de cães, durante a infusão de noradrenalina, adrenalina, isoproterenol, BRL37344 e outros agonistas beta-adrenérgicos. Darimont e colaboradores (1996) demonstraram *in situ* uma maior liberação de glicerol pelo tecido adiposo de ratos, após infusão de isoproterenol.

Os níveis de glicose sanguínea podem ser alterados diretamente ou através do controle da secreção hormonal (Pilkis *et al.*, 1988; Niiijima, 1989; Watt *et al.*, 2001). A glicemia é mantida a um nível relativamente constante sendo que os glicocorticóides influenciam o metabolismo de carboidratos por meio de sua ação permissiva aos efeitos glicogenolíticos e gliconeogênicos das catecolaminas e do glucagon (Exton *et al.*, 1972). Como resultado destes efeitos, ocorre aumento da glicemia (Niiijima, 1986). Relatos da literatura mostram que a regulação autonômica e hormonal da glicemia está subordinada ao controle exercido pelo SNC, possibilitando com isso a elevação rápida e preventiva da glicemia em situações de demanda energética elevada (exercício físico e exposição ao frio) e também durante alterações metabólicas que acompanham diferentes comportamentos emitidos. Portanto, sob condições experimentais apropriadas, os níveis de glicose circulante podem ser usados como um marcador de estresse bastante confiável em ratos (Armario *et al.*, 1986; Armario *et al.*, 1990; De Boer *et al.*, 1990; Márquez *et al.*, 2004). Em ratos alimentados Yamada e colaboradores (1993) demonstraram que o glucagon, a corticosterona e a adrenalina atuam como fatores sinérgicos na hiperglicemia induzida pelo estresse de imobilização. Verago e colaboradores (2001) demonstraram *in vivo* que as concentrações plasmáticas de corticosterona em ratos aumentaram significativamente após cada sessão de choque nas patas, enquanto as concentrações plasmáticas de glicose aumentaram após a 2ª e a 3ª sessão de choque nas patas. Além disso, ratos submetidos ao estresse de imobilização e choque nas patas tiveram o ACTH, a corticosterona e a glicose medidos, e todos os parâmetros bioquímicos aumentaram imediatamente após a exposição ao estressor, mas somente a glicose se manteve elevada até os 90 min do período experimental (Márquez *et al.*, 2002). Assim, considerando as ações do “sistema de estresse” no metabolismo e com base nos resultados aqui apresentados, ficou caracterizada, no presente trabalho, a mobilização de variáveis

bioquímicas – ácidos graxos livres e glicose - como marcadores de diferentes tipos de estresse.

Além disso, os experimentos realizados, dando continuidade aos estudos anteriores do laboratório (Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 1999), buscaram também verificar se as variáveis bioquímicas, AGL e glicose, serviriam como indicadores do estado de ansiedade induzido pela administração i.c.v. de SP em ratos submetidos ao LCE e qual o envolvimento do receptor NK₁ neste caso.

Os resultados mostraram que o tratamento central com SP ou PBS em ratos submetidos ao LCE altera a concentração sanguínea das variáveis bioquímicas em estudo. Nos animais tratados com SP/LCE a resposta lipolítica foi mais intensa e duradoura e o aumento da corticosterona mais duradouro que a resposta glicêmica. Ainda no grupo SP/LCE verifica-se uma resposta mais intensa no aumento das três variáveis, quando comparada às do grupo controle PBS/LCE, confirmando mais uma vez o efeito ansiogênico da SP administrada centralmente.

O aumento de AGL, glicose e corticosterona, nos animais tratados com PBS/LCE, podem ser explicados pelo efeito estressor da própria exposição ao LCE, o qual é um modelo comportamental baseado no medo natural de ambientes (braços) abertos e elevados (Montgomery, 1955; Treit *et al.*, 1993), sendo, portanto, considerado um estressor emocional (novidade/novo ambiente). Assim, quando confinados nos braços abertos, os ratos demonstram manifestações comportamentais e fisiológicas do medo, tais como *freezing*, defecação e aumento da corticosterona plasmática (Pellow *et al.*, 1985), como observado no presente estudo.

A resposta fisiológica aos estressores inclui mudanças metabólicas nas quais as catecolaminas e peptídeos co-liberados do sistema simpático-adrenal (SSA) atuam como mediadores cruciais. O hipotálamo, o qual representa o sítio central de integração do processo

neuroendócrino e autonômico, é rico em terminações nervosas e receptores taquicinérgicos (Sthal, 1999; De Vane, 2001). Os receptores NK₁ estão amplamente expressos no hipotálamo, na adenohipófise e na amígdala, regiões do cérebro críticas para a regulação do comportamento afetivo e da resposta neuroquímica ao estresse (Kramer *et al.*, 1998; Ebner *et al.*, 2004). A este respeito, a estimulação da amígdala, em resposta ao medo ou à ansiedade, dispara uma resposta autonômica e comportamentos adaptativos, estando associada com a liberação endógena de SP (Rupniak e Kramer, 1999; Ebner *et al.*, 2004).

Vários estudos têm mostrado mudanças rápidas nos níveis de SP e seus receptores em áreas distintas do cérebro após a exposição ao estresse agudo (Culman e Unger, 1995; Nussdorfer e Malendowicz, 1998). Em ratos, estudos neuroquímicos mostram um aumento dos níveis plasmáticos de SP hipocampais e septais, após aplicação de choques inevitáveis nas patas (Bannon *et al.*, 1986; Siegel *et al.*, 1987). Microinjeções de SP (fragmento C-terminal) na PAG dorsal, área envolvida com a reação de defesa, causam uma resposta ansiogênica em ratos submetidos ao LCE, suportando a hipótese do envolvimento da SP na resposta central ao estresse (De Araújo *et al.*, 1999). O efeito da estimulação ou inibição central de receptores NK₁ no comportamento de vocalização induzido pelo estresse (como, por exemplo, separação da mãe), em cobaias, foi investigado por Rupniak e colaboradores (2000). Eles verificaram pronunciada vocalização em resposta à infusão i.c.v. do agonista NK₁ (GR73632) e bloqueio da resposta pelos antagonistas NK₁ CP-99,994 e L-733,060. Além disso, outros estudos mostraram a internalização de receptores NK₁ (um marcador da liberação de SP) no núcleo basolateral da amígdala, através de técnicas imunocitoquímicas, em cobaias jovens submetidas ao estresse de separação materna (Kramer *et al.*, 1998).

Assim, também foi investigado o envolvimento do receptor NK₁ usando o antagonista seletivo deste receptor, o composto neurocinérgico com atividade ansiolítica WIN 51,708, no efeito ansiogênico da SP e nos níveis sanguíneos de AGL, glicose e corticosterona. Os

resultados mostraram que o antagonista dos receptores NK₁ WIN51,708, reverteu a ação do tipo ansiogênica da SP no LCE, em concordância com nossos resultados anteriores, e nos parâmetros bioquímicos, denotada pelos valores obtidos nas variáveis em estudo. Um dado que chama a atenção é que o pré-tratamento com WIN afeta mais a resposta de mobilização dos substratos energéticos (AGL e glicose) que a resposta da corticosterona, o que merece uma investigação mais aprofundada. O pequeno aumento da concentração dos AGL, da glicose e da corticosterona no sangue, no grupo tratado apenas com WIN/LCE, por outro lado, pode ser atribuído, como já anteriormente citado, ao efeito estressor do LCE *per se*.

Na literatura existem vários estudos com antagonistas da SP que confirmam a participação desta neurocinina na via neuronal envolvida na resposta ao estímulo estressor, incluindo dor, dano ou estresse psicológico (Carrasco e Van de Car, 2003). Antagonistas NK₁ causam efeitos antidepressivos e ansiolíticos em roedores possivelmente envolvendo a liberação de monoaminas de algumas regiões do cérebro. Em ratos submetidos a 20 min de estresse de imobilização, e tratados com o antagonista NK₁ GR-205171, foi verificada a redução do metabólito de dopamina, o ácido 3,4 – dihidroxifenilacético (Bannon *et al.*,1983), e a inibição da liberação extracelular de noradrenalina e dopamina no córtex pré-frontal (Renoldi e Invernizzi, 2006). A administração central de SP ainda ativa a via noradrenérgica ascendente do *locus coeruleus*. Rupniak e Kramer (1999) observaram, em ratos submetidos ao estresse de imobilização tratados com os antagonistas NK₁ RP-67580 e L-760,735, uma inibição da atividade do sistema catecolaminérgico. Culman e colaboradores (1997), testando a hipótese de que as neurocininas, especialmente a SP, estão envolvidas na via neuronal de ativação da resposta cardiovascular e comportamental induzidas pelo estresse, usaram os antagonistas NK₁ (CP-96,345 e RP 67580), por via i.c.v., em ratos submetidos à injeção subcutânea de formalina, e verificaram a inibição da resposta cardiovascular e comportamental induzida pelo estímulo nocivo.

Mais evidências de que o sistema SP-NK₁ está envolvido na regulação das respostas de medo e ansiedade vêm de estudos com antagonistas e animais *knockout* do receptor NK₁ (NK1 -/-) ou do gene que codifica SP (PPTA -/-; Santarelli e Saxe, 2003). Diferentes antagonistas dos receptores NK₁ inibem as vocalizações em cobaias separadas da mãe (Boyce *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2000) e em gerbilos e outros roedores apresentam um aumento do contato social no teste de interação social (Vassout *et al.*, 2000; Cheeta *et al.*, 2001; Gentsch *et al.*, 2002). Os resultados obtidos com animais *knockout* demonstraram que as supressões do gene PPTA e/ou do receptor NK₁ resultaram em comportamentos do tipo antidepressivo em camundongos avaliados nos testes da natação forçada e da suspensão pela cauda, e do tipo ansiolítico nos testes de interação social, vocalização induzida pela separação maternal e LCE (Rupniak *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2001; Bilkei-Gorzo *et al.*, 2002). Desta forma, a manipulação farmacológica e genética da neurotransmissão SP/NK₁ fornece evidências substanciais de que esta via neuropeptidérgica está envolvida na mediação de comportamentos animais relacionados ao medo e à ansiedade.

O efeito ansiogênico da SP administrada centralmente foi confirmado pelos valores obtidos nas medidas de exploração do LCE. Os ratos tratados com SP i.c.v. mostraram uma diminuição na exploração dos braços abertos, nas entradas e no tempo gasto nestes braços, quando comparados aos animais que receberam solução controle (PBS). O grupo tratado com WIN 51,708, antagonista seletivo de receptores NK₁, não alterou *per se* os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, mas foi capaz de reverter o efeito do tipo ansiogênico da SP. A exploração dos braços abertos (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985) tem sido o índice de “ansiedade” experimental mais usado. Cruz e colaboradores (1994) validaram, além das medidas tradicionais, parâmetros etológicos como *rearing*, *grooming*, *head-dipping*, *risk-assessment* em ratos submetidos ao LCE, como indicadores complementares do estado de ansiedade experimental. No entanto, no presente estudo, não foi

observada qualquer modificação nos demais parâmetros etológicos nos vários grupos. Nossos dados mostraram também que a resposta do tipo ansiogênica da SP no LCE foi revertida pelo antagonista específico dos receptores NK₁, WIN 51,708, confirmando o envolvimento dos receptores NK₁ na modulação deste efeito comportamental da SP (Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 2002).

No entanto, para caracterizar a participação da SP *per se* na resposta bioquímica ao estresse, sem influência de outro estímulo estressor (LCE), no presente estudo os animais foram tratados centralmente com SP sem submetê-los ao LCE. Os resultados mostram que a SP *per se* eleva os níveis sanguíneos de AGL de maneira crescente ao longo do tempo, aumentando e mantendo também elevada a corticosterona, durante todo o experimento, não afetando, no entanto, os níveis de glicose. Quando comparados estes resultados com os do grupo que recebeu SP e foi submetido ao LCE, verifica-se uma resposta muito semelhante nas três variáveis. No grupo SP/LCE a lipólise foi maior estatisticamente no intervalo de tempo 0-30 min quando comparado ao grupo que recebeu somente SP sem submissão ao LCE; a glicemia não apresentou diferença em nenhum tempo experimental e a concentração de corticosterona foi diferente somente aos 15 min após o estresse. No grupo tratado somente com PBS i.c.v. não houve alteração, na concentração sanguínea, das variáveis em estudo, diferentemente dos animais tratados com PBS/LCE, que apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de AGL, o que pode ser atribuído, como comentado anteriormente, ao estresse induzido pelo novo ambiente (LCE).

A SP *per se* foi, portanto, capaz de alterar as respostas de todos os marcadores estudados e, adicionalmente, nos animais expostos ao LCE observou-se uma somatória dos efeitos ansiogênicos/estressores com aumento correspondente dos marcadores bioquímicos.

A este respeito, pode-se dizer que a relação entre o estresse e a ansiedade é um ponto muito interessante para se explorar e buscar entender, pois a exposição a múltiplos tipos de

estressores resulta em comportamento ansiogênico em testes de ansiedade em animais (Hata *et al.*, 2001; Margis *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2003; Kalueff e Tuohimaa, 2004).

Assim, em animais previamente estressados por IMO ou NADO, e, em seguida, pela exposição ao LCE, verificou-se uma redução de cerca de 50% na exploração dos braços abertos do LCE, evidenciando um efeito ansiogênico dos diferentes estressores. Esses dados corroboram os achados de Hata e colaboradores (2001) que submeteram camundongos a ambientes com alta (24°C) e baixa (4°C) temperatura, alternadamente, e depois ao LCE, e verificaram uma diminuição do tempo de permanência nos braços abertos. Em animais expostos ao choque nas patas (Steenbergen *et al.*, 1990), ao odor do gato (Zangrossi e File, 1992), ao estresse social (Rodgers e Cole, 1993), ao nado forçado (Britton *et al.*, 1992; Andreatini e Bacellar, 1999), à imobilização (Padovan e Guimarães, 2000) e a temperaturas elevadas (Sinhá e Ray, 2004) houve uma diminuição na exploração dos braços abertos no LCE. Martijena e colaboradores (1997) mostraram que 15 min de imobilização ou nado forçado foram capazes de diminuir a exploração dos braços abertos do LCE, e levou a um aumento na postura defensiva em um teste social (Albonetti e Farabollini, 1995).

Os resultados do presente trabalho mostraram também que a exposição a dois estressores diferentes alterou as variáveis bioquímicas em estudo, quando comparados ao grupo controle (só exposto ao LCE). A concentração de corticosterona foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle nos três protocolos (IMO/LCE e NADO/LCE) estudados, em todo o período experimental. No entanto, a resposta lipolítica, que estava aumentada nos diferentes grupos, foi estatisticamente menor que a resposta do grupo controle, sem qualquer mudança na glicemia dos animais.

Os resultados encontrados durante este estudo estão em concordância com os de Marti e colaboradores (1999) os quais demonstraram que a exposição prévia a um estressor, ou a sua repetição, é capaz de reduzir a resposta do eixo HPA para um segundo estressor. Eles

submeteram ratos a duas sessões de IMO (1 h) com intervalo de 2 h, o que levou a uma redução na resposta do ACTH. Em ratos, submetidos repetidamente a sessões de IMO (1h/dia/13 dias), as concentrações de ACTH, corticosterona e glicose diminuíram progressivamente, concluindo-se que a resposta ao estresse tende a ser reduzida por repetição da exposição ao estressor (Márquez *et al.*, 2004), refletindo talvez uma adaptação ao estresse. Gadek-Michalska e Bugajski (2003) observaram uma diminuição nos níveis séricos de corticosterona em ratos submetidos a repetidas sessões de estresse de manipulação (3-7 dias), imobilização (3-7dias) e superlotação da gaiola (24 animais por 7 dias) seguidas de 10 min de IMO, fortalecendo a idéia de uma resposta adaptativa ao estímulo estressor. Hajós- Korcsok e colaboradores (2003) submeteram ratos a duas sessões de choque nas patas (com intervalo de 60 min) e verificaram um aumento nos níveis extracelulares de serotonina e noradrenalina no hipocampo após a primeira sessão de choque. A resposta do eixo HPA manteve-se após a segunda sessão, verificada pelo aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona. No teste de interação social, os animais apresentaram aumento do *freezing* e diminuição no *rearing* após a primeira exposição ao estressor. Na segunda exposição, o *freezing* foi completamente bloqueado. Esses dados reforçam a teoria de que a exposição prévia a um estressor altera a resposta ao estímulo subsequente e mostram ainda que a possibilidade de adaptação nas respostas, neuroquímicas e neuroendócrinas, a estressores contribui para a expressão de diferentes comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade em ratos.

Diferentes tipos de estressores, entre os quais pode-se incluir a SP e o LCE, são conhecidos por alterarem a atividade neuroendócrina do cérebro (Van der Kar e Blair, 1999; Pácak e Palkovits, 2001; Márquez *et al.*, 2005). O eixo HPA é visto como um complexo sistema fisiológico que pode mediar uma grande variação de respostas fisiológicas e comportamentais do animal aos estressores (Salpolsky *et al.*, 2000). A maior função do eixo HPA, e, em particular, da resposta adrenocortical ao estresse, é eliminar fisiologicamente ou

reduzir o impacto da ação do estressor sobre o indivíduo e, assim, promover a sua sobrevivência (González e Escobar, 2002). Os glicocorticóides são os produtos finais do eixo HPA e da resposta central ao estresse. A este respeito, existem fortes evidências que durante o período de estresse agudo, os glicocorticóides promovem a sobrevivência mobilizando reservas energéticas (Salpolsky *et al.*, 2000). Os resultados do presente trabalho sugerem que, pelo menos, o mesmo mecanismo básico que envolve o controle endócrino da resposta ao estresse pode ser similar ao mecanismo de modulação da ansiedade pela SP (Ebner e Singewald, 2006). No presente trabalho, as alterações na concentração plasmática dos AGL e da glicose, à semelhança do que ocorre com a corticosterona, sugerem que estas variáveis, especialmente a primeira, podem ser usadas como marcadores fidedignos do estado de estresse/ansiedade. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam ainda que o efeito ansiogênico da SP é mediado por receptores NK_1 , receptores estes que estão localizados em várias áreas cerebrais e, especialmente, no núcleo paraventricular do hipotálamo, onde pode haver uma interação com o CRF e uma regulação direta do eixo HPA pela SP, que, por sua vez, poderia ser responsável pela ação lipolítica desta neurocinina.

No entanto, é bem conhecido que um dos caminhos da regulação da lipomobilização é a ação dos hormônios adrenais – corticosterona e adrenalina. Desta forma, o controle da lipólise induzido pela injeção central de SP em ratos submetidos ao LCE poderia ser mediado por essa via hormonal. Na tentativa de verificar esta possibilidade, foram utilizados animais com remoção cirúrgica das adrenais e submetidos ao mesmo protocolo experimental. Os animais foram submetidos à falsa-cirurgia (SHAM) e à ADX e expostos ou não ao LCE. Nos animais SHAM e ADX, expostos ou não ao LCE e tratados centralmente com SP ou PBS, os ADX apresentaram somente um aumento significativo da resposta lipolítica, enquanto os animais SHAM apresentaram aumento nas três variáveis em estudo e os animais SHAM/SP mostraram uma resposta ainda mais evidente que os SHAM. Como esperado, apenas os

animais SHAM apresentam aumento da corticosterona durante todo o período experimental. Os animais submetidos ao LCE (ADX e SHAM) apresentaram também um aumento de AGL no intervalo de 0-15 min após o LCE, assim como um aumento da glicose. Portanto, o LCE e a SP são fatores indutores da mobilização de substratos energéticos *per se*.

Como já exposto anteriormente, no TAB, o glucagon e os agonistas beta-adrenérgicos estimulam a atividade lipolítica causando liberação de AGL e glicerol para o plasma (Slavin *et al.*, 1994; Lafontan *et al.*, 1995; 2001;2002), enquanto os glicocorticóides desempenham um papel permissivo na manutenção da resposta lipolítica às catecolaminas (Fain e García-Sáinz, 1983). Os resultados obtidos no presente estudo levam, portanto, a pensar numa atividade predominante da via SNS, já que nos animais ADX continuou havendo uma resposta lipolítica significativa. O TAB é o principal local de armazenamento de ácidos graxos, sendo a inervação simpática o maior regulador da lipomobilização para manter a homeostasia do suprimento energético (Hales *et al.*, 1978; Rayner, 2001; Tsuda *et al.*, 2002). A este respeito, estudos envolvendo a medida direta do *turnover* de noradrenalina no TAB mostraram marcada ativação simpática em situações de aumento da lipólise, como o jejum e a exposição ao frio, sendo que esta resposta não foi bloqueada pela adrenomectomia (Garafolo *et al.*, 1996; Migliorini *et al.*, 1997). Esses dados e outros (Migliorini *et al.*, 1997; Bartness e Bamshad, 1998) sugerem que a noradrenalina das terminações nervosas simpáticas, e não as catecolaminas circulantes da adrenal, chegam ao TAB estimulando a lipólise.

De uma maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os elevados níveis de corticosterona na corrente sanguínea são confirmados como indicador clássico/convencional de estresse, corroborando os dados da literatura (Martí *et al.*, 1999; Dubrovsky, 2000; González e Escobar, 2002). Além disso, observamos que os níveis plasmáticos de AGL podem ser usados como um marcador fidedigno, sensível e

confiável das situações de estresse agudo, incluindo o efeito ansiogênico da SP. A resposta lipolítica foi a mais evidente e duradoura em todos os modelos de estresse usados neste trabalho, quando comparada à resposta da glicose. Com relação à corticosterona, o aumento da concentração plasmática de AGL foi superior em intensidade na maioria dos experimentos, excetuando os grupos submetidos a dois estressores sucessivos.

A resposta glicêmica, por sua vez, apresentou uma variação muito grande nos diferentes protocolos experimentais. Como já citado, o padrão de resposta glicêmica também depende da intensidade e duração do estressor (Wennlund *et al.*, 1994; Pácak *et al.*, 1998; Sampaio-Barros *et al.*, 2003). A glicose, entretanto, parece ser um bom indicador para estressores com um componente físico (IMO, NADO/LCE). Está bem estabelecido na literatura que o exercício físico agudo promove aumento da glicose circulante. Em ratos submetidos ao nado forçado foi verificado aumento significativo da glicemia quando comparados ao grupo mantido em repouso (Rogatto, 2001; Afonso *et al.*, 2003). Esse aumento deve-se provavelmente à liberação de catecolaminas, glucagon, cortisol e GH, que são hormônios que promovem uma maior disponibilidade de glicose à musculatura ativa (Vissing, 2000).

O padrão de mobilização de substratos energéticos no exercício pode ser caracterizado como uma seqüência de três fases, cujos substratos energéticos predominantes são: glicogênio muscular, a glicose e os AGL (Kang *et al.*, 1999). O comportamento das variáveis bioquímicas usadas neste trabalho está positivamente relacionado à intensidade do estressor e pode ser usado para estimá-lo. Esta relação é amplamente discutida e descrita na literatura (Pácak *et al.*, 1995; Marti e Armário, 1998; Pácak e Palkovits, 2001; Marti *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2002; 2004). De acordo com Peeters e Broekkamp (1994), a severidade de um estressor tem um importante papel na determinação da resposta ao estresse. Márquez e colaboradores (2002) afirmam que “*sem ignorar a relevância do aspecto qualitativo do*

estressor, é necessário medir a intensidade da situação estressora para saber se as conseqüências fisiológicas ou patológicas estão relacionadas ou não a sua intensidade (...)”.

No presente estudo, a elevação na concentração de corticosterona confirma a situação aversiva induzida pela injeção i.c.v. de SP (medidas comportamentais verificadas no LCE neste e em outros estudos), sugerindo que a SP age como um estressor químico, confirmando também o envolvimento dos receptores NK₁ no mecanismo básico dos efeitos comportamentais e metabólicos da SP (Bannon et al, 1983; 1986; Teixeira *et al.*, 1996; Jessop *et al.*, 1998; Aguiar e Brandão, 1996; Gavioli *et al.*, 1999; Santarelli *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2001). Existem evidências de que a SP está envolvida na resposta central ao estresse, e que os receptores NK₁ podem mediar os efeitos terapêuticos das alterações induzidas pelo estresse na ansiedade e depressão (Hahn e Bannon, 1999). Estados emocionais alterados, como o medo, a ansiedade ou a depressão, apresentam uma resposta neuroendócrina similar àquela ativada por outros estressores físicos e psicológicos (Páca e Palkovits, 2001). Assim, a mobilização de substratos energéticos induzidos pelo estresse – AGL e glicose - confirmou o efeito estressor/ansio gênico da SP, mostrando que estes marcadores, em especial os AGL, podem ser usados como indicadores complementares do estado de ansiedade em modelos experimentais.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, os resultados:

- confirmam os elevados níveis de corticosterona na corrente sanguínea como indicador clássico/convencional de estresse.
- mostram inequivocamente que os níveis plasmáticos de AGL e glicose podem ser usados como bons índices de estresse/ansiedade agudos.
- mostram que as alterações na concentração plasmática dos AGL e da glicose, à semelhança do que ocorre com a corticosterona, sugerem que estas variáveis, especialmente a primeira, podem ser usadas como marcadores fidedignos do estado de estresse/ansiedade.
- são consistentes com o conceito de que cada estressor desencadeia sua própria resposta neuroquímica e neuroendócrina ao estresse, pois as variáveis estudadas sofreram alterações diferenciadas, conforme o tipo de estressor a que o animal foi submetido.
- que a SP *per se* foi capaz de alterar as respostas comportamentais e bioquímicas aqui estudadas e, adicionalmente, nos animais expostos ao LCE observou-se uma somatória dos efeitos ansiogênicos/estressores com aumento correspondente dos marcadores bioquímicos.
- o envolvimento dos receptores taquicinérgicos do tipo NK₁ na modulação dos parâmetros comportamentais e bioquímicos após as diferentes situações de estresse.

“Mas as coisas findas
muito mais que lindas, essas ficarão”
(Carlos Drummond de Andrade)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afonso, M.; de Souza, C.N.; Zagatto, A.M.; Luciano, E. (2003) Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. *Motriz*. 9(2):87-92.
2. Aguiar, M.S.; Brandão, M.L. (1996) 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(4):1183-6.
3. Aguilera, G.; Rabadan-Diehl, C.; Nikodemova, M. (2001) Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides*. 22: 769-774.
4. Albonetti, M.E.; Farabollini, F. (1995) Effects of single restraint on the defensive behavior of male and female rats. *Physiology and Behavior*. 57: 431-437.
5. Almay, B. G.; Johansson, F.; Von Knoring, L.; Le Greves, P.Terenius, L. (1988) Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. *Pain*, 33: 3-9.
6. Andreatini, R. ; Bacellar, L. (1999) The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 32(9):1121-1126.
7. Anisman, H.; Zacharko, R.M. (1982) Depression: the predisposing influence of stress. *Behav. Brain Sci*. 5:89-137.
8. Anseloni, V. Z. ; Messias, G. ; Motta, V. ; Brandão, M. L. (1995) Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze with clear walls. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 28:597-601.
9. Arai, H.; Emson, P.C. (1986) 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.
10. Armario, A.; Jolín, T. (1989) Influence of intensity and duration of exposure to various stressors on serum TSH and GH levels in adult male rats. *Life Sci*. 215-221.
11. Armario, A.; López-Calderón, A.; Jolín, T.; Castellanos, J.M. (1986) Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci*. 471-475.
12. Armario, A.; Martí, J.; Gil, M. (1990) The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*. 341-347.
13. Armario, A.; Montero, J.L.; Balasch, J. (1986) Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol. Behav*. 559-561.
14. Balthazar, C.H. ; Oliveira Junior, A.R. ; Marubayashi, U. ; Reis, A.M. ; Coimbra, C.C. (2007) Chronic treatment with bromocriptine modifies metabolic adjustments in response to restraint stress in rats. *Auton. Autac. Pharmacol*. 27: 123-129.
15. Bamshad, M.; Aoki, V.T.; Adkison, G.; Warren, W.S.; Bartness, T.J. (1998) Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am. J. Physiol*. 44:R291-R299.
16. Bannon, M. J.; Elliott, P. J.; Alpert, J. E.; Goedert, M.; Iversen, S. D.; Iversen, L. L. (1983) Role of endogenous substance P in stress-induced activation of mesocortical dopamine neurones. *Nature*. 306:791-792 .
17. Bannon, M.J.; Elliott, P.J.; Alpert, J.E.; Goedert, M.; Iversen, S.D.; Iversen, L.L. (1984) Role of endogenous substance P in stress-induced activation of mesocortical dopamine neurons. *Nature*. 306:791-2.
18. Bannon, M.J.; Deutch, A .Y.; Tam, S.Y.; Zamir, N.; Eskay, R.L.; Lee, J.M.; Maggio, J.E.; Roth, R.H. (1986) Mild footshock stress dissociates substance P from substance K and dynorphin from Met- and Leu-enkephalin. *Brain. Research*. 381:393-396.

19. Barbosa, M.C.; Migliorini, R.H. (1982) Free fatty acid mobilization in rats following intracerebroventricular norepinephrine. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 242: 248-252.
20. Barkai, A. ; Allweis, C. (1972a) Effect of electrical stimulation of the hypothalamus on plasma free fatty acid concentration in cats. *J. Lipid. Res.*13:725-732.
21. Barkai, A. ; Alweis, C. (1972b) Effect of electrical stimulation of the hypothalamus on plasma levels of free fatty acids and glucose in rats. *Metabolism.* 21:921-927.
22. Bartness, T.J.; Bamshad, M. (1998) Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am. J. Physiol.* 275:R1399-R1411.
23. Basu, A.; Passmore, R.; Strong, J.A. (1960) The effect of exercise in the level of nonesterified fatty acids in the blood. *Quart. J. Exp. Physiol.* 45:312-317.
24. Beach,T.G.; Mcgeer, E.G. (1984) The distribution of substance P in the primate basal ganglia: an immunohistochemical study of baboon and human brain. *Neuroscience.* 13: 29-52.
25. Behan, D.P.; Grigoriadis, D.E.; Lovenberg, T.; Chalmers, D.; Heinrichs, S.; Liaw, C.; De Souza, E.B. (1996a) Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol. Psychiatry.* 1(4):265-277.
26. Behan, D.P.; Khongsaly, O.; Ling, N.; De Souza, E.B. (1996b) Urocortin interaction with corticotropin-releasing factor (CRF) binding protein (CRF-BP): a novel mechanism for elevating "free" CRF levels in human brain. *Brain Res.* 725:263-267.
27. Benzo, C.A. (1982) The hypothalamus and blood glucose regulation. *Life Science.* 32: 2509-2525.
28. Bilkei-Gorzo, A.; Racz, I; Michel, K.; Zimmer, A. (2002) Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. *J. Neurosci.* 22:10046-10052.
29. Boyce, S.; Smith, D.; Carlson, E.; Hewson, L.; Rigby, M.; O'Donnell, R.; Harrison, T.; Rupniak, M.N. (2001) Intra-amygdala injection of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalization in guinea-pigs. *Neuropharmacology* 41:130-137.
30. Brandão, M.L.; Vianna, D.M.; Masson, S.; Santos, J. (2003) Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25(2):33-41.
31. Bremner, J.D. (1999) Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry.* 45(7):797-805.
32. Brent, P.J.; Johnston, P.A.; Chahl, L.A. (1988) Increased plasma catecholamines and locomotor activity induced by centrally administered substance P in guinea-pigs. *Neuropharmacology.* 27:743-748.
33. Brent, P.J.; Chahl, L.A.; Loris, A. ; Cantarella, P. A. (1994) Effect of intracerebroventricular injection of substance P on biogenic amine concentrations in guinea-pig brain. *Biogenic. Amines.* 10: 319-327.
34. Brito, N.A. (1996) Hiperglicemia provocada pela injeção de agentes colinérgicos no hipotálamo. Tese de doutoramento apresentada à FMRP-USP, p. 1-54.
35. Britton, K.T.; McLeod, S.; Koob, G.F.; Hauger, R. (1992) Pregnane steroid alphaxalone attenuates anxiogenic behavioral effects of corticotropin releasing factor and stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41:399-403.
36. Brownstein, M.J.; Mroz, E.A; Kizer, J.S.; Palkovits, M.; Leeman, S.E. (1976) Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res.* 116:229-305.
37. Carey, G.B. (1998) Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol.* 441: 157-70.

38. Carrasco, G.A.; Van de Kar, L.D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* 463:235-272.
39. Charmandari, E.; Tsigos, C.; Chrousos, G. (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev. Physiol.* 67:259-284.
40. Chen, L-W.; Wei, L-C.; Liu, H-L.; Rao, Z-R. (2000) Noradrenergic neurons expressing substance P receptor (NK1) in the locus coeruleus complex: a double immunofluorescence study in the rat. *Brain Research.* 155-159.
41. Cheeta, S.; Tucci, S.; Sandhu, J.; Williams, A.R.; Rupniak, N.M.J.; File, S.E. (2001) Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in social interaction test in gerbils. *Brain Res.* 915:170-175.
42. Chowdrey, H.S.; Jessop, D.S.; Lightman, S.L. (1990) Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat. *Neuroendocrinology.* 52:90-93.
43. Chrousos, G.P.; Gold, P.W. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.* 267:1244-1252.
44. Coimbra, C.C.; Migliorini, R.H. (1983) Evidence for a longitudinal pathway in rat hypothalamus that controls FFA mobilization. *Am.J. Physiol.* 245:E332-337.
45. Coimbra, C.C.; Migliorini, R.H. (1986) Insulin-sensitive glucoreceptors in rat preoptic area that regulate FFA mobilization. *Am.J. Physiol.* 251(Pt.1):E703-E706.
46. Coimbra, C.C.; Migliorini, R.H. (1988) Cold-induced free fatty acid mobilization is impaired in rats with lesions in preoptic area. *Neurosci. Lett.* 88:1-5.
47. Coiro, V., Capretti, L.; Volpi, R.; Davoli, C.; Marcato, A.; Cavazzini, U.; Caffarri, G.; Rossi, G.; Chiodera, P. (1992) Stimulation of ACTH/cortisol by intravenously infused substance P in normal men: inhibition by sodium valproate. *Neuroendocrinology.* 56:459-463.
48. Connolly, C.C.; Steiner, K.E.; Stevenson, R.W.; Neal, D.W.; Williams, P.E.; Alberti, K.G.; Cherrington, A.D. (1991) Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 261(4):E466-E472.
49. Cooper, P.E.; Fernstrom, M.H.; Rorstad, O. P.; Leeman, S.E.; Martin, J.B. (1981) The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res.* 218:219-232.
50. Coppack, S.W.; Jensen, M.D.; Miles, J.M. (1994) In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lip. Res.* 35:177-193.
51. Correll, J.W. (1961) Mobilization of unesterified fatty acids (UFA) from isolated rat adipose tissue by nerve stimulation in vitro. *Fed. Proc.* 20:275.
52. Correll, J.W. (1963a) Adipose tissue: ability to respond to nerve stimulation in vitro. *Science.* 140:387-388.
53. Correll, J.W. (1963b) Central neural structures and pathways important for free fatty acid (FFA) mobilization demonstrated in chronic animals. *Fed. Proc.* 22:574 .
54. Cruz, A. P. M.; Frei, F. ; Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 171–176.
55. Cuello, A. C.; Kanazawa, I. (1978) The distribution of substance P immunoreactive fibres in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 178:129-155.
56. Culman, J.; Unger, T. (1995). Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. *J.*

- Physiol. *Pharmacol.* 73:885-891.
57. Culman, J.; Klee, S.; Ohlendorf, C.; Unger, T. (1997) Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 238–246.
 58. Curtis, A.L.; Drolet, G.; Valentino, R.J. (1993) Hemodynamic stress activates locus coeruleus neurons of unanesthetized rats. *Brain Res. Bull.* 31:737-744.
 59. Darimont, C.; Saint-Marc, P.; Ailhaud, G.; Negrel, R. (1996) Modulation of vascular tone and glycerol levels measured by in situ microdialysis in rat adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 271(4):E631-635.
 60. Davis, M.; Rainnie, D.; Cassell, M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *TINS.* 7:208-214.
 61. Davison, T.F. (1973). Metabolic changes in the neonate fowl in response to cold stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A:979-989.
 62. De Araújo, J.E.; Huston, J.P.; Brandão, M.L. (1998) Aversive effects of the C-fragment of Substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. *Exp Brain Res.* 123(1-2):84-9.
 63. De Araújo, J.E.; Silva, R.C.B.; Huston, J.P.; Brandão, M.L. (1999) Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. *Peptides.* 20:1437-1443.
 64. De Boer, S.F.; Koopmans, S.J.; Slanger, J.L.; Van Der Gugten, J. (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiology and Behavior.* 47:1117-1124.
 65. Dekeyser, F.G.; Leker, R.R.; Weidenfeld, J. (2000) Activation of the adrenocortical axis by surgical stress: involvement of central norepinephrine and interleukin-1. *Neuroimmunomodulation.* 7:4:182-8.
 66. De Kloet, E.R.; Joëls, M.; Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews.* 6:463-475.
 67. Delbende, C.; Delarue, C.; Lefebvre, H.; Bunel, D.T.; Szafarczyk, A.; Mocaër, E.; Kamoun, A.; Jégou, S.; Vaudry, H. (1992) Glucocorticoids, transmitters and stress. *Br J Psychiatry Suppl.* 15:24-35.
 68. Demas, G.E.; Bartness, T.J. (2001) Direct innervation of white fat and adrenal medullary catecholamines mediate photoperiodic changes in body fat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R1499-R1505.
 69. De Mello, D.M.S.; Freitas, C.G.; Marino-Neto, J.; Paschoalini, M.A. (1996) Participation of the autonomic nervous system in lipolysis induced by intraventricular injection of carbachol in the pigeon. *J. Auton. Nerv. Syst.* 59:83-86.
 70. de Souza, E.B. (1995) Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 20:789-819.
 71. De Souza, M.M.; Schenberg, L.C.; Carobrez, A.P. (1998) NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxio-selective drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res.* 90(2):157-165.
 72. De Vane, C.L. (2001) Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy.* 21(9):1061-1069.
 73. Dole, P. , Meinertz, H. (1960) Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235:2595-2599.

74. Douglas, F.L.; Palkovits, M.; Brownstein, M.J. (1982) Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brain stem of the rat. *Brain Res.* 245:376-378.
75. Dubrovsky, B. (2000) The specificity of stress responses to different nocuous stimuli: neurosteroids and depression. *Brain Res. Bull.* 51(6):443-455.
76. Dunn, A.J.; Berridge, C.W. (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Ver.* 15:71-100.
77. Ebner, K.; Rupniak, N.M.; Saria, A.; Singewald, N.; Hokfelt, T. (2004) Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proc Nat. Acad. Sci. USA.* 101(12):4280-4285.
78. Ebner, K.; Singewald, N. (2006) The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids.* 31(3):251-272.
79. Euker, J.S.; Meites, J.; Riegler, G.D. (1975) Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology.* 96(1):85-92.
80. Exton, J.H.; Friedmann, N.; Wong, E.H.; Brineaux, J.P.; Corbin, J.D.; Park, C.R. (1972) Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and lipolysis in adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 247(11):3579-3588.
81. Fain, J.N.; Garcíja-Sáinz, J.A. (1983) Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid.Res.* 24(8):945-966.
82. Faria, M.; Navarro, P.; Tsagarakis, S.; Besser, G.M.; Grossman, A. B. (1991) Inhibition of CRH-41 release by substance P, but not substance K, from the rat hypothalamus in chronic inflammatory stress. *Life Sci.* 57:2021-2029.
83. Fehder, W. P.; Sachs, J.; Uvaydova, M.; Douglas, S.D. (1997) Substance P as immune modulator of anxiety. *Neuroimmunomodulation.* 4: 4248.
84. Ferreira, M. L. ; Marubayashi, U. ; Coimbra, C. C. (1999) The medial preoptic area modulates plasma glucose and free fatty acid mobilization induced by cold exposure. *Brain Res. Bull.* 49:189-193.
85. File, S. E. (1997) Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58: 747-752.
86. Freeman, B.M. (1970) Some aspects of thermoregulation in the adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 871:881.
87. Friedberg, S.J.; Sher, P.B.; Bogdonoff, M.D.; Estes, E.H.Jr. (1963). Changes in emotional state and in plasma free fatty acid metabolism during exercise. *J. Lipid Res.* 4:34-41.
88. Fukuhara, K.; Kvetnansky, R.; Cizza, G.; Pacak, K.; Ohara, H.; Goldstein, D.S.; Kopin, I.J. (1996) Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J Neuroendocrinol.* 8:533-541.
89. Gadek-Michalska, A.; Bugajski, J. (2003) Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J. Physiol.* 54(3):449-459.
90. Gale, J.S.; Bird, E.D.; Spoke, E.G.; Iversen, L.L.; Jessell, T. (1978) Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. *J Neurochem.* 30: 633-634.
91. Galitzky, J. Reverte, M.; Carpené, C.; Lafontan, M.; Berlan, M. (1993) Beta 3-adrenoceptors in dog adipose tissue: studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines. *J.*

- Pharmacol. Exp. Ther.* 266(1):358-366.
92. Garafolo, M.A. R.; Kettelhut, I.C.; Roselino, J.E.S.; Migliorini, R.H. (1996) Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Autonomic System.* 60:206-208.
 93. Gavioli, E.C.; Canteras, N.S.; De Lima, T.C.M. (1999) Anxiogenic-like effects induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. *Neuroreport.* 10:3399-3403.
 94. Gavioli, E.C.; Canteras, N.S.; De Lima, T.C.M. (2002) The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P. *Behavioural Brain Research.* 134:411-415.
 95. Gentsch, C.; Cutler, M.; Vassout, A.; Veenstra, S.; Brugger, F. (2002) Anxiolytic effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in the social investigation test in gerbils. *Behavioural Brain Research.* 133 (2):363 - 368.
 96. Gilgen, A.; Maickel, R.P.; Nikodijevic, O.; Brodie, B.B. (1962) Essential role of catecholamines in the mobilization of free fatty acids and glucose after exposure to cold. *Life Sci.* 1:709-715.
 97. Goldstein, D. S.; Garty, M.; Bagdy, G.; Szemeredi, K.; Sternberg, E.M.; Listwak, S.; Pacak, K.; Deka Starosta, A.; Hoffman, A.; Chang, P.C.; Stull, R.; Gold, P.W.; Kopin, I.J. (1993) Role of CRH in glucopenia-induced adrenomedullary activation in rats. *J.Neuroendocrinol.* 5(5): 475-486.
 98. Gómez, F.; Lahmame, A.; De Kloet, E.R.; Armario, A. (1996) Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology.* 63(4):327-337.
 99. González, B.G.; Escobar, A. (2002) Neuroanatomía del estrés. *Rev. Mex. Neuroci.* 3(5):273-282.
 100. Goodman, H.M. ; Knobil, E. (1959) The effects of adrenergic blocking agents of fatty acid mobilization during fasting. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102:493-495.
 101. Gorwood, P. (1999) From stressful life events to anxiety disorders. *Ver. Prat.* 49:(14):S11-13.
 102. Graeff, F.G. (1983) Psicobiologia da ansiedade. *J. Bras. Psiq.* 36:345-350.
 103. Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27:811-829.
 104. Gross, J.L.; Migliorini, R.H. (1977) Further evidence for a central regulation of free fatty acid mobilization in the rat. *Am. J. Physiol.* 232(2):E165-E171.
 105. Guard, S.; Watson, S. P. (1991) Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.* 18:149-165.
 106. Habib, K. E.; Gold, P. W.; Chrousos, G. P. (2001) Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30:695-728.
 107. Hagan, R.M.; Mclean, S. (1993) Stafford Vineyard Peptide Conference bears fruit. *TIPS.* 14:315-318.
 108. Hahn, M.K.; Bannon, M.J. (1999) Stress-induced c-fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation. *Neuroscience.* 94(4):1183-1188.
 109. Hajos-Korcsok, E.; Robinson, D.D.; Yu, J.H.; Fitch, C.S.; Walker, E.; Merchant, K.M.(2003) Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(3):609-16.

110. Hales, C.N.; Luzio, J.P.; Siddle, K. (1978) Hormonal control of adipose-tissue lipolysis. *Biochem. Soc. Symp.* 43:97-135.
111. Handley, S.L.; Mithani, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 327:1-5.
112. Harms, P.G.; Ojeda, S.R. (1974) A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *Journal of Applied Physiology.* 36: 391-392.
113. Harro, J.; Vasar, E.; Bradwyn, C. (1993) CCK in animal and human research of anxiety. *TIPS.*14: 244-249.
114. Hasenöhrl, R.U.; Souza-Silva, MA.; Nikolaus S.; Tomaz, C.; Brandao, M.L.; Schwarting, R.K.; Huston, J.P. (2000) Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides.* 34(5):272-80.
115. Hata, T.; Nishikawa, H.; Itoh, E.; Funakami, Y. (2001) Anxiety-like in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 85:189-196.
116. Havel, R.G. ; Goldfien, A. (1959a). The role of the sympathetic nervous system in the metabolism of free fatty acids. *J. Lipid. Res.* 1:102-108.
117. Havel, R.G. ; Goldfien, A. (1959b). Evidence for control of unesterified fatty acids metabolism by sympathetic nervous system. *Clin.Res.* 7:116-123.
118. Havel, R.J. ; Naimark, A. ; Borchgrevink, C.F. (1963) Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-I-C14. *J. Clin. Invest.* 42:1054-1063.
119. Hayashi, M.; Oshima, K. (1986) Neuropeptides in cerebral cortex of macaque monkey (Macaca fuscata): regional distribution and ontogeny. *Brain Res.* 364: 360-368.
120. Herman, J. P.; Cullinan, W. E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20:78-84.
121. Hofmann, M.; Kleemann, P.P. (1991) Free fatty acids as na indicator of preoperative stress and effects of premedication with flunitrazepam, morphine and promethazne on blood fatty acid level. *Infusionstherapie.* 18:(5):227-230.
122. Hökfelt, T.; Broberger, C.; Xu, Z-Q.D.; Sergeev, R.U.; Diez, M. (2000) Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacology.* 39:1337-1356.
123. Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Bloom, F. (2003) Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurology.* 2:463-472.
124. Holsboer, F.; Spengler, D.; Heuser, I. (1992) The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementia. *Prog. Brain Res.* 93:385-417.
125. Holsboer, F.; Barden, N. (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Rev.* 17:187-205.
126. Holsboer, F. (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J. Psych. Res.* 33(3):181-214.
127. Huether G, Doering S, Ruger U, Ruther E, Schussler G. (1999) The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. *Psychiat Res.* 87:83-95.
128. Ionescu, E.; Coimbra, C.C.; Walker, C.D.; Jeanrenaud, B. (1989) Paraventricular nucleus

- modulation of glycaemia and insulinemia in freely moving lean rats. *Am. J. Physiol.* 257: R1370-R1376.
129. Itoi, K.; Tschöpe, C.; Jost, N.; Culman, J.; Lebrun, C.; Stauss, B.; Unger, T. (1992) Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. *European J. Pharmacol.* 219: 435-444.
 130. Jain, S.K.; Pandey, S.N.; Srivastava, R.K.; Ghosh, S.K. (2000) Stress and serum cholesterol levels-an experimental study. *J. Ant. Soc.* 49(2):165-167.
 131. Jessop, D.S.; Chowdrey, H.S.; Lightman, S.L. (1990) Substance P and substance K in the median eminence and paraventricular nucleus of the rat. *Neuropeptides.* 17: 135-140.
 132. Jessop, D.S.; Chowdrey, H.S.; Larsen, P.J.; Lightman, S.L. (1992) Substance P: multifunctional peptide in the hypothalamo-pituitary system? *J Endocrinol.* 132:333-337.
 133. Jessop, D.S.; Renshaw, D.; Larsen, P.J.; Chowdrey, H.S. (1998) Endogenous substance P acts centrally to terminate the HPA axis response to acute stress. Abstract P1 410, 80th Annual Meeting. Endocrine Society, New Orleans, USA.
 134. Jessop, D.S. (1999) Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Endocr.* 160:169-180.
 135. Jeukendrup, A .E.; Saris, W.H.; Wagenmakers, A .J. (1998) Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int. J. Sports. Med.* 19:(4):231-244.
 136. Jezova, D.; Ochedalski, T.; Glickman, M.; Kiss, A.; Aguilera, G. (1999) Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience.* 94:(3): 797-802.
 137. Jones, R.S.; Olpe, H.R. (1984) Activation of noradrenergic projection from locus coeruleus reduces the excitatory responses of anterior cingulate cortical neurons to substance P. *Neuroscience.* 13:819-825.
 138. John, T.M.; Viswanathan, M.; George, J.C.; Scanes, C.G. (1988) Flight effects on plasma levels of free fatty acids, growth hormone in homing pigeons. *Horm. Metabol. Res.* 20:271-273.
 139. Kalueff, A.V.; Tuohimaa, P. (2004) Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiol. Exp.* 64:439-448.
 140. Kanazawa, I.; Jessel, T. (1976) Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res.* 117: 362-367.
 141. Kang, J.; Kelley, D.E.; Robertson, R.J.; Goss, F.L.; Suminski, R.R.; Utter, A.L.; Dasilva, S.G. (1999) Substrate utilization and glucose turnover during exercise of varying intensities in individuals with NIDDM. *Med. Sci.Spt. Exec.* 31:82-89.
 142. Kopchik, K.L.; Altman, H.J.; Commissaris, R.L. (1992) Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:453-461.
 143. Kramer, M.S.; Cutler, N.; Feighner, J. (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science.* 281:1640-1645.
 144. Kumon, A.; Takahashi, A.; Kóri-Hara, T. (1977) Epinephrine: a mediator of plasma glycerol elevation by hypothalamic stimulation. *Am. J. Physiol.* 233:E369-E373.
 145. Kumon, A. ; Takahashi, A. ; Kóri-Hara, T. ; Shimazy, T. (1976) Mechanism of lipolysis induced by electrical stimulation of hypothalamus in the rabbit. *J. Lipid. Res.* 17:551-558.
 146. Kurtz, M. M.; Wang, M. K. Clements, M. A. Cascieri, C. P. Austin, B. R. Cunningham, G. G.

- Chicchi, Q. Liu. (2002) Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*. 296:205-212.
147. Kvetnanský, R.; Mikulaj, L. (1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 87: 738-743.
 148. Kvetnanský, R.; Pacák, K.; Fukuhara, K.; Viskupic, E.; Hiremagalur, B.; Nankova, B.; Goldstein, D.S.; Sabban, E.L.; Kopin, I.J. (1995) Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann NY Acad Sci*. 771:131-58.
 149. Lacerda, A.C.R.; Marubayashi, U.; Balthazar, C.H.; Coimbra, C.C. (2006) Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise reducing running performance in rats. *Neurosci. Lett*. 393:260-263.
 150. Lafontan, M.; Bousquet-Melou, A.; Galitzky, J.; Barbe, P.; Carpené, C.; Langin, D.; Berlan, M.; Valet, P.; Bolouminé, A. (1995) Adrenergic adrenoceptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. *Obes. Res*. 3(4):507s-514s.
 151. Lafontan, M. (2001) Lipid metabolism in adipose tissue: adrenergic control of the adipocyte and mobilization on the lipids. *Am.Endocrinol*. 62(4):S7-S17.
 152. Lafontan, M.; Berlan, M.; Stich, V.; Crampes, F.; Riviere, D.; De Glisezinski, I.; Sengenés, C.; Galitsky, J. (2002) Recent data on the regulation of lipolysis by catecholamines and natriuretic peptides. *Ann. Endocrinol*. 63(2):86-90.
 153. Laneuville, O.; Dorais, J.; Couture, R. (1988) 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.
 154. Lang, P.J.; Davis, M.; Öhman, A. (2000) Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J. Affec. Disor*. 61(3):137-159.
 155. Large, V.; Arner, P. (1998) Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diab.Metab*. 24:409-418.
 156. Larsen, P.J.; Jessop, D.; Patel, H.; Lightman, S.L.; Chowdrey, H.S. (1993a). Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotrophin via a central mechanism involving corticotrophin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol*. 5:99-105.
 157. Larsen, P.J.; Mikkelsen, J.D.; Jessop, D.S.; Lightman, S.L.; Chowdrey, H.S. (1993b) Neuropeptide Y mRNA and immunoreactivity in hypothalamic neuroendocrine neurons: effects of adrenalectomy and chronic osmotic stimulation. *J. Neurosci*. 13:1138-1147.
 158. Leibowitz, S.F.; Sladek, C.; Spencer, L.; Tempel, D. (1988). Neuropeptide Y, epinephrine and norepinephrine in the paraventricular nucleus: stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose. *Brain Res Bull*. 21(6):905-912.
 159. Lennquist, S. (1975) Urinary excretion of hydroxyprolines in man under the influence of cold. *Scand J Clin Lab Invest*. 35(2):103-107.
 160. Lima, N.V.; Coimbra, C.C.; Marubayashi, U. (1998) Effect of intracerebroventricular injection of atropin on metabolic responses during exercise in untrained rats. *Physiol. Behv*. 64:69-74.
 161. Ljungdahl, A.; Höekfelt, T.; Nilsson, G. (1978) Distribution of substance p-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminalis. *Neuroscience*. 3:861-943.
 162. Loopuijt, L.D.; Van Der Kooy, D. (1985) Organization of the striatum: collateralization of its efferent axons. *Brain Res*. 348:86-99.

163. Maggi, C. A.; Patacchini, R.; Rovero, P.; Giachetti, A. (1993) Tachykinin receptors and tachykinin antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 13: 23-93.
164. Maggio, J. E. (1988) Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosci.* 11:13-28.
165. Malendowicz, L. K.; Markowska, A. (1994) Neuromedins and their involvement in the regulation of growth, structure and function of the adrenal cortex. *Histol. Histopathol.* 9:591-601.
166. Margis, R.; Picon, P.; Cosner, A.F.; Silveira, R.O. (2003) Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Ver. Psiquiatr.* 25(1):65-74.
167. Márquez, C.; Belda, X.; Armário, A. (2002) Pos-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Research.* 926:181-185.
168. Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2004) The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience.* 123(3):601-612.
169. Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2005) Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology.* 30:179-187.
170. Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2006) Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult rats. *Behav. Brain Res.* 168:13-22.
171. Martí, O.; Armario, A. (1998). Anterior pituitary response to stress : time-related changes and adaptation. *J. Develop. Neurosc.* 7: 241-260 .
172. Martí, O.; Harbuzb, M.S.; Andrésa, R.; Lightmanb, S.L.; Armário, A. (1999) Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. *Brain Research.* 821(1):1-7.
173. Marti, O.; García, A.; Vallés, A.; Harbuz, M.S.; Armario, A. (2001) Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *Eur. J. Neurosci.* 13:129-136.
174. Martijena, I.D.; Calvo, N.; Volosin, M.; Molina, V.A. (1997) Prior exposure to a brief session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Research.* 752: 136-142.
175. Mazzone, S.B.; Geraghty, D.P. (1999) Altered respiratory response to substance P and reduced NK1 receptor binding in the nucleus of the solitary tract of aged rats. *Brain Res.* 826:139-142.
176. McEwen, B.S. (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 33:171-179.
177. McEwen, B. S. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research.* 886:172-189.
178. McEwen, B. S. (2005) Stressed or stressed out: what is the difference? *Rev. Psychiatr. Neurosci.* 30(5):315-318.
179. McKeown, B.A.; John, T.M.; George, J.C. (1974) Effect of exercise on levels of plasma growth hormone, free fatty acids and glucose in the pigeon. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 82:55-62.
180. McLean, S.; Ganong, A.; Seeger, T.F.; Bryce, D.K.; Pratt, K.G.; Reynolds, L.S.; Siok, C.J.; Lowe, J.A.; Heym, J. (1991) Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK1) receptor antagonist. *Science.* 251:437-439.

181. McLean, S. (1996) Nonpeptide antagonists of the NK1 tachykinin receptor. *Med. Res. Rev.* 16: 297-317.
182. Mello, A.A.F.; de Mello, M.F.; Carpenter, L.L.; Lawrence, H.P. (2003) Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25(4):231-238.
183. Migliorini, R.H.; Garofalo, M.A .R.; Kettelhut, I.C. (1997) Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am. J. Physiol.* 272: 656-661.
184. Millan, M.J. (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology.* 70:83-244.
185. Montgomery, K.C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. C. Physiol. Psychology*, 48: 254-260.
186. Mussap, C. J.; Geraghty, D. P.; Burcher, E. (1993) Tachykinin receptors: a radioligand binding prespective. *J. Neurochem.* 60:1987-2009.
187. Naeser P. (1973) Effects of adrenalectomy on the obese-hyperglycemic syndrome in mice (gene symbol ob). *Diabetologia.* 9(5):376–379.
188. Nagashima, A.; Takano, Y.; Tateishi, Y.; Matsuoka, T.; Hamaoka, T.; Kamuya, H. (1989) Cardiovascular roles of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitari of rats. *Brain Res.* 487:392-396.
189. Nakanishi, S. (1991) Mammalian tachykinin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 14:123-136.
190. Natelson, B.H.; Creighton, D.; McCarty, R.; Tapp, W.N.; Pitman, D.; Ottenweller, J.E. (1987) Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol. Behav.* 39:117-125.
191. Nicholson, S.A.; Adrian, T.E.; Gillham, B.; Jones, M.T.; Bloom, S.R. (1984) Effect of hypothalamic neuropeptides on corticotrophin release from quarters of rat anterior pituitary gland *in vitro*. *Journal of Endocrinology.* 100(2):219-226.
192. Nijima, A. (1986) Neural mechanisms in the control of blood glucose concentration. *J. Nutr.* 119:833-840.
193. Nijima, A. (1989) Neural control of blood glucose level. *J.Physiol.* 36:827-841.
194. Nonogaki, K. (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia.* 43: 533-549.
195. Nussdorfer, G.G.; Malendowicz, L.K. (1998) Role of tachykinins in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides.* 19(5):949-68.
196. Öro, L.; Wallenberg, L.R.; Bolme, P. (1965) Influence of electrical supramedullary stimulation on the plasma level of free fatty acids, blood pressure and heart rate in the dog. *Acta Med. Scand.* 178:697-711.
197. Otsuka, M.; Yoshioka, L. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 73: 229-308.
198. Ottosson, M.; Lönnroth, P.; Björntorp, P.; Edén, S. (2000) Effects of cortisol and growth hormone on lipolysis in human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:(2):799-803.
199. Owens, M.J. Nemeroff, C.B. (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 43:425-473.

200. Pacák, K.; Palkovits, M.; Kvetnanský, R.; Yadid, G.; Kopin, I.J.; Goldstein, D.S. (1995) Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci.* 771:115-30.
201. Pacak, K.; Miklos Palkovits, M.; Yadid,G.; Kvetnansky, R.; Irwin J. Kopin,I.J.; Goldstein, D.S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* . 275: R1247-R1255.
202. Pacák, K.; Palkovits, M. (2001) Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders . *Endocrine Reviews.* 22 (4): 502-548.
203. Page, N.M.; Bell, N.J.; Gardiner, S.M.; Manyonda, I.T.; Brayley, K.J.; Strange, P.G.; Lowry P. J. (2003) Characterization of the endokinins: Human tachykinins with cardiovascular activity . *PNAS.* 13(100):6245-6250 .
204. Padovan, C.M.; Guimarães, F.S. (2000) Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(1):79-83.
205. Panula, P.; Yang, Y.T.; Costa, E. (1984) Comparative distribution of bombesin/GRP- and substance P-like immunoreactivities in rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 224:606-617.
206. Papir-Kricheli, D.; Frey, J.R.; Laufer, C.; Gilon, M.; Chorev, Z.; Selinger, Devor, M. (1987) Behavioural effects of receptors specific substance P agonists. *Pain.* 31:263.
207. Paschoalini, M.A.; Migliorini, R.H. (1990) participation of the CNS in the control of FFA Mobilization during fasting in rabbits. *J. Physiol. Beh.* 47:461-465.
208. Patacchini, R.; Maggi, C. A. (1995) Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 329: 161-184.
209. Paxinos, G.; Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, Sydney), 3rd Ed.
210. Peeters, B.W.; Broekkamp, C.L. (1994) Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. *Steroid Biochem Mol Biol.* 49(4-6):417-27.
211. Pellow, S. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodentes valid? *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 8:557-565.
212. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods.* 14: 149-167.
213. Pennefather, J.N.; Lecci, A.; Candenas, ML.; Patak, E.; Pinto, F.M.; Maggi, C.A. (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences.* 74:1445-1463.
214. Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35: 85-141.
215. Pickel, V.M.; Joh, T.H.; Reis, D.J.; Leeman, S.E.; Miller, R.J. (1979) Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res.;* 160:387-400.
216. Piedimonte, G. (1995) Neurokinin peptides, receptors, and peptidases in airway disease. *Exp. Lung Res.* 21:809-834.
217. Pihoker, C.; Owens, M.J.; Kuhn, C.M.; Schanberg, S.M.; Nemeroff, C.B. (1993) Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology.* 18:(7):485-93.

218. Pilkis, S.J.; El-Magharibi, M.R.; Claus, T.H. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57:755-783.
219. Radziuk, J.; Pye, S. (2001) Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Met. Res. Ver.* 17:250-272.
220. Rayner, D.V. (2001) The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc. Nut. Soc.* 60:357-364.
221. Regoli, D.; Drapeau, G.; Dion, S.; D'orle'ans-Juste, P. (1989) Receptors for substance P and related tachykinins. *Pharmacology.* 38:1-15.
222. Reis, F. M.; Oliveira Junior, A.R.; Machado, L.J.C.; Guerra, R.M.; Reis, A.M.; Coimbra, C. C. (1998) Plasma prolactin and glucose alterations induced by surgical stress: a single or dual response?. *Experimental Physiology.* 83:1-10.
223. Renoldi, G.; Invernizzi, R.W. (2006) Blockade of tachykinin NK1 receptors attenuates stress-induced rise of extracellular noradrenaline and dopamine in the rat and gerbil medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Research* . 84(5): 961 – 968.
224. Ribeiro, S. J. (1998) Envolvimento do receptor neurocinérgico NK₃ na ansiedade experimental em camundongos avaliada no labirinto em cruz elevado. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Florianópolis, SC.
225. Rodgers, R.J.; Cole, J.C. (1993) Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.* 54:729-736.
226. Rodgers, R.J.; Cao, B.J.; Dalvi, A.; Holmes, A. (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Res.* 30(3):289-304.
227. Rogatto, G.P. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar. Dissertação de Mestrado em Ciências da Motricidade – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
228. Romero, L.M.; Plotsky, P. M.; Sapolsky, R.M. (1993) Patterns of adrenocorticotropin secretagog release with hypoglycemia, novelty, and restraint after colchicine blockade of axonal transport. *Endocrinology.* 132:199-204.
229. Rósen, A.; Brodin, K.; Eneroth, P.; Brodin, E. (1992). Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 146:341-348.
230. Rosenfeld, P.; Wetmore, J.B.; Levine, S. (1992) Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav.* 52: 787-791.
231. Ruffin, M.; Nicolaidis, S. (1999) Electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus enhances both fat utilization and metabolic rate that precede and parallel the inhibition of feeding behavior. *Brain Res.* 846:(1):23-9.
232. Rupniak NM and Kramer MS (1999) Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 20: 485-490.
233. Rupniak, N.M.J.; Carlson, E.C.; Harrison, T.; Oates, B.; Seward, E.; Owen, S.; De Felipe, C.; Hunt, S.; Wheeldon, A. (2000) Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology.* 39:1413-1421.
234. Salpolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress response? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*

- 21:55-89.
235. Sampaio-Barros, M.M.; Farias-Silva, E.; Grassi-Kassisse, D. M.; Spadari-Bratfisch, R.C. (2003) Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. *Stress*. 6(2):127-132.
 236. Sanders, S.K.; Shekhar, A. (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmac. Biochem. Behav.* 52:701-706.
 237. Sandford, J.J.; Argyropoulos, S.V.; Nutt, D.J. (2000) The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. *Pharm. Therap.* 88:197-212.
 238. Santarelli, L.; Gobbi, G.; Debs, P.C.; Sibille, E.T.; Blier, P.; Hen, R.; Heath, M.J. (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1912-1917.
 239. Santarelli, L.; Saxe, M.; Gross, C.; Surget, A.; Battaglia, F.; Dulawa, S.; Weisstaub, N.; Lee, J.; Duman, R.; Arancio, O.; Belzung, C.; Hen, R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301:805-809.
 240. Santos, I.N. Spadari-Bratfisch, R.C. (2006) Stress and cardiac beta adrenoceptors. *Stress*. 9(2):1-16.
 241. Saria, A. (1999) The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 51-60.
 242. Schadt, J.C.; Ludbrook, J. (1991) Hemodynamic and neurohormonal responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am. J. Physiol.* 260 (29): H305-H318.
 243. Scheurink, A.J.W.; Steffens, A.B.; Bouritius, H.; Dreteler, G.H.; Bruntink, R.; Remie, R.; Zaagsma, J. (1989). Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *Am. J. Physiol.* 256:R155-R160.
 244. Seabrook, G.R.; Bowery, B.J.; Hill, R.G. (1995). Pharmacology of tachykinin receptors on neurons in the ventral tegmental area of rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 273:113-119.
 245. Selye, H. (1936) A syndrome produce by diverse nocuous agents. *Nature*. 138:32.
 246. Severini, C.; Improya, G.; Falconieri-Erspamer, G.; Salvadori, S.; Erspamer, V. (2002) The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Rev.* 54(2):285-322.
 247. Shaik, M.B.; Siegel, A. (1994) Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defense rage behavior in the cat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27:2759-2779.
 248. Shimazu, T.;Fukuda, A.; Ban, T. (1966) Reciprocal influence of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose levels and liver glycogen content. *Nature*. 210: 1178-1179.
 249. Shultz, C.W.; Quirion, R.; Chonwall, B.; Chase, T.N.; O'Donohue, T.L. (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides*. 5:1097-1128.
 250. Siegel, R.A.; Duker, E.M.; Pahnke, U.; Wuttke, W. (1987) Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 46(1):75-81.
 251. Silveira, S.A.; Haibara, A.S.; Lima, N.V.; Coimbra, C.C. (2003) The hypothalamic paraventricular nucleus and carotid receptors modulate hyperglycemia induced by hemorrhage. *Brain Research*. 993:183-191.
 252. Silveira, S.A.; Haibara, A.S.; Coimbra, C.C. (2005) The carotid baroreceptors modulates the hyperglycemia induced by hemorrhage. *Autonomic Neuroscience*. 123:36-43.

253. Sinha, R.K.; Ray, A.K. (2004) An assessment of changes in open-field and elevated plus-maze behavior following heat stress in rats. *Iran. Biomed. J.* 8(3):127-133.
254. Skutella, T.; Probst, J. C.; Renner, U.; Holsboer, F. ; Beh, C. (1998) Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience.* 85(3):795-805.
255. Slavin, B.G.; Ong, J.M.; Kern, P.A. (1994) Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J.Lipid Res.* 35(9):1535-1541.
256. Southwick, S.M.; Paige S.; Morgan, C.A.; Bremner, J.D.; Krystal, J.H.; Charney, D.S. (1999) Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. *Semin. Clin. Neuropsychiatry.* 4(4):242-8.
257. Stables, J. M.; Beresford, I. J. M.; Arkinstall, S.; Ireland, S. J.; Walsh, D. M.; Seale, P. W.; Ward, P.; Hagan, R. M. (1994) GR 138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK3 receptors. *Neuropeptides.* 27: 333-341.
258. Stahl, S.M. (1999). Substance P and the neurokinins: novel peptide neurotransmitters in psychopharmacology. *J Clin Psychiatry.* 60(2):77-78.
259. Steckler, T.; Holsboer, F. (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol. Psychiatry.* 46(11):1480-508.
260. Steenbergen, H.L.; Heinsbroek, R.P, Van Hest, A.; Van de Poll, N.E. (1990) Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav.* 48(4):571-576.
261. Steffens, A .B.; Damsma, G.; van der Gugten, J.; Luiten, P.G. (1984) Circulating free fatty acids, insulin, and glucose during chemical stimulation of hypothalamus in rats. *Am J Physiol.* 247:E765-71.
262. Steinberg, R.; Alonso, R.; Griebel, G.; Bert, L.; Jung, M.; Oury-Donat, F.; Poncelet, M.; Gueudet, C.; Desvignes, C.; Le Fur.; G. Soubrie, P. (2001) Selective blockade of neurokinin-2 receptors produces antidepressant-like effects associated with reduced corticotropin-releasing factor function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299:449-458.
263. Sterling, P.; Eyer, J. (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher, S., Reason, J., editors. *Handbook of life stress, cognition and health.* 629-649.
264. Strand, F.L.(1999) Tachykinins: substance P, neurokinin A, and neurokinin B. In: Steven, C.F. (Ed.), *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes.* *The Mit Press*, Cambridge, MA, pp. 365-382.
265. Stratakis, C.A.; Chrousos, G.P. (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Am. N.Y. Acad. Sci.* 771:1-18.
266. Stratton, S.C.; Beresford, I. J. M.; Hagan, R. M. (1994). GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK2 receptor antagonist, release suppressed behaviours in a novel aversive environment. *British J. Pharmacol.* 112:49P.
267. Stratton, S.C.; Beresford, I.J.M.; Harvey, F.J.; Turpin, M.P.; Hagan, R.M.; Tyers, M.B. (1993) Anxiolytic activity of tachykinin NK₂ receptor antagonists in the mouse light-dark box. *Eur. J. Pharmacol.* 250:11-12.
268. Strohle, A.; Jahn, H.; Montkowski, A.; Liebsch, G.; Boll, E.; Landgraf, R.; Holsboer, F.; Wiedemann, K. (1997) Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. *Neuroendocrinology.* 65:210-215.
269. Sutoo, D.; Akiyama, K. (2002) Neurochemical changes in mice following physical or psychological stress exposures. *Behav-Brain-Res.* 134(1-2): 347-54.

270. Takayama, H.; Ota, Z.; Ogawa, N. (1986) Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. *Regul. Pept.* 15:239-248.
271. Teixeira, R.M.; Santos, A .R.S.; Calixto, J.B.; Era, G.A.; De Lima, T.C.M. (1996) Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 311:7-14.
272. Timo-Iaria, C. (1990) Glucoreceptor Systems: From Control of Glycemia to Feeding Behavior . *News Physiol Sci.* 5: 46-49.
273. Trayhurn, P.; Beattie, J.H. (2001) Physiologicl role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nut. Soc.* 60:329-339.
274. Treit, D. (1985) Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 203-223.
275. Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:463-469.
276. Tsigos, C.; Chrousos, G.P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychos. Res.* 53:865-871.
277. Tsuda, K.; Yoshimatsu, H.; Nijjima, A. Chiba, S. Okeda, T.; Sakata, T. (2002) Hypotlamic histamine neurons activate lipolysis in rat adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* 227:208-213.
278. Tsuruo, Y.; Kawano, H.; Nishiyama, T.; Misano, S.; Daikoku, S. (1983) Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hipothalamus light and electron microscopy. *Brain Res.* 289:1-9.
279. Unger, T.; Carolus, S.; Demmert, G. Ganten, D.; Lang, R.E.; Maser-Gluth, C. (1988) Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res.* 63: 812-820.
280. Van Den Bruse, M.; Van Acker, S.A.B.E.; Fluttert, M.; De Kloet, E.R. (2001) Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological “novelty” stress freely moving rats. *Psychophysiology.* 38:490-499.
281. Van de Kar, L.D. (1991) neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:289-320.
282. Van de Kar, L.D.; Blair, M.L. (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 20(1):1-48.
283. Vassout, A.; Veenstra, S.; Hauser, K.; Ofner, S.; Brugger, F.; Schilling, W.; Gentsch, C.; Saria, A.; Geppetti, P.; Urban, L. (2000) NKP608 : a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats. *Neuropeptides.* 96:7-16.
284. Vedhara, K.; Hyde, J.; Gilchrist, I.D.; Tytherleigh, M.; Plummer, S. (2000) Acute stress, memory, attention and cortisol. *Psychoneuroendocrinology.* 25(6):535-49.
285. Verago, J.L.; Grassi-Kassisse, D.M.; Spadari-Bratfisch, R.C. (2001) Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. *Braz J Med Biol Res.* 34(9)1197-1207.
286. Vissing, J. (2000) Muscle reflex and central motor control of neuroendocrine activity, glucose homeostasis and circulation during exercise. *Acta Physiol. Scand.* 170:5-26.
287. Von Euler, V.; Gaddum, J. (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* 72:74-87.
288. Watt, M.J.; Howlett, K.F.; Febbraio, M.A.; Spriet, L.L.; Hargreaves, M. (2001) Adrenaline increases

- skeletal muscle glycogenolysis pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J. Physiol.* 534(1):269-278.
289. Wennlund, A.; Wahrenberg, H.; Hagstrom-Toft, E.; Bolinder, J.; Arner, P. (1994). Lipolytic and cardiac responses to various forms of stress in humans. *Int. J. Sports. Med.* 15(7):408-13.
290. Wettstein, J.G.; Earley, B.; Junierns, J.L. (1995). Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol. Ther.* 65:397-414.
291. Widmaier, E.P.; Rosen, K.; Abbott, B. (1992). Free fatty acids activate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rats. *Endocrinology.* 131:2313-2318.
292. Yadin, E.; Thomas, E.; Vaughan, M.P. (1993) The role of the lateral septum in anxiety. *Physiol. Behav.* 53:1077-1083.
293. Yamada, F.; Inoue, S.; Saitoh, T.; Tanaka, K.; Satoh, S.; Takamura, Y. (1993) Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology.* 132: 2199-2205.
294. Yamaguchi, N. (1992) Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70(2):167-206.
295. Zaia, C.T.B.V.; Gaziri, L. C. J.; Zaia, D. A. M.; Delatre, E.; Dolnikoff, M. S.; Iaria, C. T. (1997) Effect of chemical stimulation of dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acid. *Brain Res. Bull.* 42(3):195-198.
296. Zangrossi, H.Jr.; File, S.E. (1992) Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull.* 29:381-388.
297. Zernig, G.; Dietrich, M.; Maggi, C. A.; Saria, A. (1992) The substance P (NK₁) receptor antagonists (±)-CP-96,345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. *Neurosci Lett.* 143:169-172.
298. Zernig, G.; Troger, J.; Saria, A. (1993) Different behavioral profile of the nonpeptide substance P (NK₁) antagonists CP-96,345 and RP 67580 in Swiss albino mice in the black-and-white box. *Neurosci Lett.* 151: 64-66.
299. Zhang, Y.; Lu, C.; Furlonger, G. E. Wu, C. J. Paige. (2000) Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat. Immunol.* 1:392.

“Mas as coisas findas
muito mais que lindas, essas ficarão”
(Carlos Drummond de Andrade)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afonso, M.; de Souza, C.N.; Zagatto, A.M.; Luciano, E. (2003) Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. *Motriz*. 9(2):87-92.
2. Aguiar, M.S.; Brandão, M.L. (1996) 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(4):1183-6.
3. Aguilera, G.; Rabadan-Diehl, C.; Nikodemova, M. (2001) Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides*. 22: 769-774.
4. Albonetti, M.E.; Farabollini, F. (1995) Effects of single restraint on the defensive behavior of male and female rats. *Physiology and Behavior*. 57: 431-437.
5. Almay, B. G.; Johansson, F.; Von Knoring, L.; Le Greves, P.Terenius, L. (1988) Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. *Pain*, 33: 3-9.
6. Andreatini, R. ; Bacellar, L. (1999) The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 32(9):1121-1126.
7. Anisman, H.; Zacharko, R.M. (1982) Depression: the predisposing influence of stress. *Behav. Brain Sci*. 5:89-137.
8. Anseloni, V. Z. ; Messias, G. ; Motta, V. ; Brandão, M. L. (1995) Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze with clear walls. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 28:597-601.
9. Arai, H.; Emson, P.C. (1986) 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.
10. Armario, A.; Jolín, T. (1989) Influence of intensity and duration of exposure to various stressors on serum TSH and GH levels in adult male rats. *Life Sci*. 215-221.
11. Armario, A.; López-Calderón, A.; Jolín, T.; Castellanos, J.M. (1986) Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci*. 471-475.
12. Armario, A.; Martí, J.; Gil, M. (1990) The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*. 341-347.
13. Armario, A.; Montero, J.L.; Balasch, J. (1986) Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol. Behav*. 559-561.
14. Balthazar, C.H. ; Oliveira Junior, A.R. ; Marubayashi, U. ; Reis, A.M. ; Coimbra, C.C. (2007) Chronic treatment with bromocriptine modifies metabolic adjustments in response to restraint stress in rats. *Auton. Autac. Pharmacol*. 27: 123-129.
15. Bamshad, M.; Aoki, V.T.; Adkison, G.; Warren, W.S.; Bartness, T.J. (1998) Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am. J. Physiol*. 44:R291-R299.
16. Bannon, M. J.; Elliott, P. J.; Alpert, J. E.; Goedert, M.; Iversen, S. D.; Iversen, L. L. (1983) Role of endogenous substance P in stress-induced activation of mesocortical dopamine neurones. *Nature*. 306:791-792 .
17. Bannon, M.J.; Elliott, P.J.; Alpert, J.E.; Goedert, M.; Iversen, S.D.; Iversen, L.L. (1984) Role of endogenous substance P in stress-induced activation of mesocortical dopamine neurons. *Nature*. 306:791-2.
18. Bannon, M.J.; Deutch, A .Y.; Tam, S.Y.; Zamir, N.; Eskay, R.L.; Lee, J.M.; Maggio, J.E.; Roth, R.H. (1986) Mild footshock stress dissociates substance P from substance K and dynorphin from Met- and Leu-enkephalin. *Brain. Research*. 381:393-396.

19. Barbosa, M.C.; Migliorini, R.H. (1982) Free fatty acid mobilization in rats following intracerebroventricular norepinephrine. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 242: 248-252.
20. Barkai, A. ; Allweis, C. (1972a) Effect of electrical stimulation of the hypothalamus on plasma free fatty acid concentration in cats. *J. Lipid. Res.*13:725-732.
21. Barkai, A. ; Alweis, C. (1972b) Effect of electrical stimulation of the hypothalamus on plasma levels of free fatty acids and glucose in rats. *Metabolism.* 21:921-927.
22. Bartness, T.J.; Bamshad, M. (1998) Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am. J. Physiol.* 275:R1399-R1411.
23. Basu, A.; Passmore, R.; Strong, J.A. (1960) The effect of exercise in the level of nonesterified fatty acids in the blood. *Quart. J. Exp. Physiol.* 45:312-317.
24. Beach,T.G.; Mcgeer, E.G. (1984) The distribution of substance P in the primate basal ganglia: an immunohistochemical study of baboon and human brain. *Neuroscience.* 13: 29-52.
25. Behan, D.P.; Grigoriadis, D.E.; Lovenberg, T.; Chalmers, D.; Heinrichs, S.; Liaw, C.; De Souza, E.B. (1996a) Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol. Psychiatry.* 1(4):265-277.
26. Behan, D.P.; Khongsaly, O.; Ling, N.; De Souza, E.B. (1996b) Urocortin interaction with corticotropin-releasing factor (CRF) binding protein (CRF-BP): a novel mechanism for elevating "free" CRF levels in human brain. *Brain Res.* 725:263-267.
27. Benzo, C.A. (1982) The hypothalamus and blood glucose regulation. *Life Science.* 32: 2509-2525.
28. Bilkei-Gorzo, A.; Racz, I; Michel, K.; Zimmer, A. (2002) Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. *J. Neurosci.* 22:10046-10052.
29. Boyce, S.; Smith, D.; Carlson, E.; Hewson, L.; Rigby, M.; O'Donnell, R.; Harrison, T.; Rupniak, M.N. (2001) Intra-amygdala injection of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalization in guinea-pigs. *Neuropharmacology* 41:130-137.
30. Brandão, M.L.; Vianna, D.M.; Masson, S.; Santos, J. (2003) Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25(2):33-41.
31. Bremner, J.D. (1999) Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry.* 45(7):797-805.
32. Brent, P.J.; Johnston, P.A.; Chahl, L.A. (1988) Increased plasma catecholamines and locomotor activity induced by centrally administered substance P in guinea-pigs. *Neuropharmacology.* 27:743-748.
33. Brent, P.J.; Chahl, L.A.; Loris, A. ; Cantarella, P. A. (1994) Effect of intracerebroventricular injection of substance P on biogenic amine concentrations in guinea-pig brain. *Biogenic. Amines.* 10: 319-327.
34. Brito, N.A. (1996) Hiperglicemia provocada pela injeção de agentes colinérgicos no hipotálamo. Tese de doutoramento apresentada à FMRP-USP, p. 1-54.
35. Britton, K.T.; McLeod, S.; Koob, G.F.; Hauger, R. (1992) Pregnane steroid alphaxalone attenuates anxiogenic behavioral effects of corticotropin releasing factor and stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41:399-403.
36. Brownstein, M.J.; Mroz, E.A; Kizer, J.S.; Palkovits, M.; Leeman, S.E. (1976) Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res.* 116:229-305.
37. Carey, G.B. (1998) Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol.* 441: 157-70.

38. Carrasco, G.A.; Van de Kar, L.D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* 463:235-272.
39. Charmandari, E.; Tsigos, C.; Chrousos, G. (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev. Physiol.* 67:259-284.
40. Chen, L-W.; Wei, L-C.; Liu, H-L.; Rao, Z-R. (2000) Noradrenergic neurons expressing substance P receptor (NK1) in the locus coeruleus complex: a double immunofluorescence study in the rat. *Brain Research.* 155-159.
41. Cheeta, S.; Tucci, S.; Sandhu, J.; Williams, A.R.; Rupniak, N.M.J.; File, S.E. (2001) Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in social interaction test in gerbils. *Brain Res.* 915:170-175.
42. Chowdrey, H.S.; Jessop, D.S.; Lightman, S.L. (1990) Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat. *Neuroendocrinology.* 52:90-93.
43. Chrousos, G.P.; Gold, P.W. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.* 267:1244-1252.
44. Coimbra, C.C.; Migliorini, R.H. (1983) Evidence for a longitudinal pathway in rat hypothalamus that controls FFA mobilization. *Am.J. Physiol.* 245:E332-337.
45. Coimbra, C.C.; Migliorini, R.H. (1986) Insulin-sensitive glucoreceptors in rat preoptic area that regulate FFA mobilization. *Am.J. Physiol.* 251(Pt.1):E703-E706.
46. Coimbra, C.C.; Migliorini, R.H. (1988) Cold-induced free fatty acid mobilization is impaired in rats with lesions in preoptic area. *Neurosci. Lett.* 88:1-5.
47. Coiro, V., Capretti, L.; Volpi, R.; Davoli, C.; Marcato, A.; Cavazzini, U.; Caffarri, G.; Rossi, G.; Chiodera, P. (1992) Stimulation of ACTH/cortisol by intravenously infused substance P in normal men: inhibition by sodium valproate. *Neuroendocrinology.* 56:459-463.
48. Connolly, C.C.; Steiner, K.E.; Stevenson, R.W.; Neal, D.W.; Williams, P.E.; Alberti, K.G.; Cherrington, A.D. (1991) Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 261(4):E466-E472.
49. Cooper, P.E.; Fernstrom, M.H.; Rorstad, O. P.; Leeman, S.E.; Martin, J.B. (1981) The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res.* 218:219-232.
50. Coppack, S.W.; Jensen, M.D.; Miles, J.M. (1994) In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lip. Res.* 35:177-193.
51. Correll, J.W. (1961) Mobilization of unesterified fatty acids (UFA) from isolated rat adipose tissue by nerve stimulation in vitro. *Fed. Proc.* 20:275.
52. Correll, J.W. (1963a) Adipose tissue: ability to respond to nerve stimulation in vitro. *Science.* 140:387-388.
53. Correll, J.W. (1963b) Central neural structures and pathways important for free fatty acid (FFA) mobilization demonstrated in chronic animals. *Fed. Proc.* 22:574 .
54. Cruz, A. P. M.; Frei, F. ; Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 171–176.
55. Cuello, A. C.; Kanazawa, I. (1978) The distribution of substance P immunoreactive fibres in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 178:129-155.
56. Culman, J.; Unger, T. (1995). Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. *J.*

- Physiol. *Pharmacol.* 73:885-891.
57. Culman, J.; Klee, S.; Ohlendorf, C.; Unger, T. (1997) Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 238–246.
 58. Curtis, A.L.; Drolet, G.; Valentino, R.J. (1993) Hemodynamic stress activates locus coeruleus neurons of unanesthetized rats. *Brain Res. Bull.* 31:737-744.
 59. Darimont, C.; Saint-Marc, P.; Ailhaud, G.; Negrel, R. (1996) Modulation of vascular tone and glycerol levels measured by in situ microdialysis in rat adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 271(4):E631-635.
 60. Davis, M.; Rainnie, D.; Cassell, M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *TINS.* 7:208-214.
 61. Davison, T.F. (1973). Metabolic changes in the neonate fowl in response to cold stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A:979-989.
 62. De Araújo, J.E.; Huston, J.P.; Brandão, M.L. (1998) Aversive effects of the C-fragment of Substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. *Exp Brain Res.* 123(1-2):84-9.
 63. De Araújo, J.E.; Silva, R.C.B.; Huston, J.P.; Brandão, M.L. (1999) Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. *Peptides.* 20:1437-1443.
 64. De Boer, S.F.; Koopmans, S.J.; Slanger, J.L.; Van Der Gugten, J. (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiology and Behavior.* 47:1117-1124.
 65. Dekeyser, F.G.; Leker, R.R.; Weidenfeld, J. (2000) Activation of the adrenocortical axis by surgical stress: involvement of central norepinephrine and interleukin-1. *Neuroimmunomodulation.* 7:4:182-8.
 66. De Kloet, E.R.; Joëls, M.; Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews.* 6:463-475.
 67. Delbende, C.; Delarue, C.; Lefebvre, H.; Bunel, D.T.; Szafarczyk, A.; Mocaër, E.; Kamoun, A.; Jégou, S.; Vaudry, H. (1992) Glucocorticoids, transmitters and stress. *Br J Psychiatry Suppl.* 15:24-35.
 68. Demas, G.E.; Bartness, T.J. (2001) Direct innervation of white fat and adrenal medullary catecholamines mediate photoperiodic changes in body fat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R1499-R1505.
 69. De Mello, D.M.S.; Freitas, C.G.; Marino-Neto, J.; Paschoalini, M.A. (1996) Participation of the autonomic nervous system in lipolysis induced by intraventricular injection of carbachol in the pigeon. *J. Auton. Nerv. Syst.* 59:83-86.
 70. de Souza, E.B. (1995) Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 20:789-819.
 71. De Souza, M.M.; Schenberg, L.C.; Carobrez, A.P. (1998) NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxio-selective drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res.* 90(2):157-165.
 72. De Vane, C.L. (2001) Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy.* 21(9):1061-1069.
 73. Dole, P. , Meinertz, H. (1960) Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235:2595-2599.

74. Douglas, F.L.; Palkovits, M.; Brownstein, M.J. (1982) Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brain stem of the rat. *Brain Res.* 245:376-378.
75. Dubrovsky, B. (2000) The specificity of stress responses to different nocuous stimuli: neurosteroids and depression. *Brain Res. Bull.* 51(6):443-455.
76. Dunn, A.J.; Berridge, C.W. (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Ver.* 15:71-100.
77. Ebner, K.; Rupniak, N.M.; Saria, A.; Singewald, N.; Hokfelt, T. (2004) Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proc Nat. Acad. Sci. USA.* 101(12):4280-4285.
78. Ebner, K.; Singewald, N. (2006) The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids.* 31(3):251-272.
79. Euker, J.S.; Meites, J.; Riegler, G.D. (1975) Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology.* 96(1):85-92.
80. Exton, J.H.; Friedmann, N.; Wong, E.H.; Brineaux, J.P.; Corbin, J.D.; Park, C.R. (1972) Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and lipolysis in adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 247(11):3579-3588.
81. Fain, J.N.; Garcíja-Sáinz, J.A. (1983) Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid.Res.* 24(8):945-966.
82. Faria, M.; Navarro, P.; Tsagarakis, S.; Besser, G.M.; Grossman, A. B. (1991) Inhibition of CRH-41 release by substance P, but not substance K, from the rat hypothalamus in chronic inflammatory stress. *Life Sci.* 57:2021-2029.
83. Fehder, W. P.; Sachs, J.; Uvaydova, M.; Douglas, S.D. (1997) Substance P as immune modulator of anxiety. *Neuroimmunomodulation.* 4: 4248.
84. Ferreira, M. L. ; Marubayashi, U. ; Coimbra, C. C. (1999) The medial preoptic area modulates plasma glucose and free fatty acid mobilization induced by cold exposure. *Brain Res. Bull.* 49:189-193.
85. File, S. E. (1997) Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58: 747-752.
86. Freeman, B.M. (1970) Some aspects of thermoregulation in the adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 871:881.
87. Friedberg, S.J.; Sher, P.B.; Bogdonoff, M.D.; Estes, E.H.Jr. (1963). Changes in emotional state and in plasma free fatty acid metabolism during exercise. *J. Lipid Res.* 4:34-41.
88. Fukuhara, K.; Kvetnansky, R.; Cizza, G.; Pacak, K.; Ohara, H.; Goldstein, D.S.; Kopin, I.J. (1996) Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J Neuroendocrinol.* 8:533-541.
89. Gadek-Michalska, A.; Bugajski, J. (2003) Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J. Physiol.* 54(3):449-459.
90. Gale, J.S.; Bird, E.D.; Spoke, E.G.; Iversen, L.L.; Jessell, T. (1978) Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. *J Neurochem.* 30: 633-634.
91. Galitzky, J. Reverte, M.; Carpené, C.; Lafontan, M.; Berlan, M. (1993) Beta 3-adrenoceptors in dog adipose tissue: studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines. *J.*

- Pharmacol. Exp. Ther.* 266(1):358-366.
92. Garafolo, M.A. R.; Kettelhut, I.C.; Roselino, J.E.S.; Migliorini, R.H. (1996) Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Autonomic System.* 60:206-208.
 93. Gavioli, E.C.; Canteras, N.S.; De Lima, T.C.M. (1999) Anxiogenic-like effects induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. *Neuroreport.* 10:3399-3403.
 94. Gavioli, E.C.; Canteras, N.S.; De Lima, T.C.M. (2002) The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P. *Behavioural Brain Research.* 134:411-415.
 95. Gentsch, C.; Cutler, M.; Vassout, A.; Veenstra, S.; Brugger, F. (2002) Anxiolytic effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in the social investigation test in gerbils. *Behavioural Brain Research.* 133 (2):363 - 368.
 96. Gilgen, A.; Maickel, R.P.; Nikodijevic, O.; Brodie, B.B. (1962) Essential role of catecholamines in the mobilization of free fatty acids and glucose after exposure to cold. *Life Sci.* 1:709-715.
 97. Goldstein, D. S.; Garty, M.; Bagdy, G.; Szemeredi, K.; Sternberg, E.M.; Listwak, S.; Pacak, K.; Deka Starosta, A.; Hoffman, A.; Chang, P.C.; Stull, R.; Gold, P.W.; Kopin, I.J. (1993) Role of CRH in glucopenia-induced adrenomedullary activation in rats. *J.Neuroendocrinol.* 5(5): 475-486.
 98. Gómez, F.; Lahmame, A.; De Kloet, E.R.; Armario, A. (1996) Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology.* 63(4):327-337.
 99. González, B.G.; Escobar, A. (2002) Neuroanatomía del estrés. *Rev. Mex. Neuroci.* 3(5):273-282.
 100. Goodman, H.M. ; Knobil, E. (1959) The effects of adrenergic blocking agents of fatty acid mobilization during fasting. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102:493-495.
 101. Gorwood, P. (1999) From stressful life events to anxiety disorders. *Ver. Prat.* 49:(14):S11-13.
 102. Graeff, F.G. (1983) Psicobiologia da ansiedade. *J. Bras. Psiq.* 36:345-350.
 103. Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27:811-829.
 104. Gross, J.L.; Migliorini, R.H. (1977) Further evidence for a central regulation of free fatty acid mobilization in the rat. *Am. J. Physiol.* 232(2):E165-E171.
 105. Guard, S.; Watson, S. P. (1991) Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.* 18:149-165.
 106. Habib, K. E.; Gold, P. W.; Chrousos, G. P. (2001) Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30:695-728.
 107. Hagan, R.M.; Mclean, S. (1993) Stafford Vineyard Peptide Conference bears fruit. *TIPS.* 14:315-318.
 108. Hahn, M.K.; Bannon, M.J. (1999) Stress-induced c-fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation. *Neuroscience.* 94(4):1183-1188.
 109. Hajos-Korcsok, E.; Robinson, D.D.; Yu, J.H.; Fitch, C.S.; Walker, E.; Merchant, K.M.(2003) Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(3):609-16.

110. Hales, C.N.; Luzio, J.P.; Siddle, K. (1978) Hormonal control of adipose-tissue lipolysis. *Biochem. Soc. Symp.* 43:97-135.
111. Handley, S.L.; Mithani, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 327:1-5.
112. Harms, P.G.; Ojeda, S.R. (1974) A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *Journal of Applied Physiology.* 36: 391-392.
113. Harro, J.; Vasar, E.; Bradwyn, C. (1993) CCK in animal and human research of anxiety. *TIPS.*14: 244-249.
114. Hasenöhrl, R.U.; Souza-Silva, MA.; Nikolaus S.; Tomaz, C.; Brandao, M.L.; Schwarting, R.K.; Huston, J.P. (2000) Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides.* 34(5):272-80.
115. Hata, T.; Nishikawa, H.; Itoh, E.; Funakami, Y. (2001) Anxiety-like in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 85:189-196.
116. Havel, R.G. ; Goldfien, A. (1959a). The role of the sympathetic nervous system in the metabolism of free fatty acids. *J. Lipid. Res.* 1:102-108.
117. Havel, R.G. ; Goldfien, A. (1959b). Evidence for control of unesterified fatty acids metabolism by sympathetic nervous system. *Clin.Res.* 7:116-123.
118. Havel, R.J. ; Naimark, A. ; Borchgrevink, C.F. (1963) Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-I-C14. *J. Clin. Invest.* 42:1054-1063.
119. Hayashi, M.; Oshima, K. (1986) Neuropeptides in cerebral cortex of macaque monkey (Macaca fuscata): regional distribution and ontogeny. *Brain Res.* 364: 360-368.
120. Herman, J. P.; Cullinan, W. E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20:78-84.
121. Hofmann, M.; Kleemann, P.P. (1991) Free fatty acids as na indicator of preoperative stress and effects of premedication with flunitrazepam, morphine and promethazne on blood fatty acid level. *Infusionstherapie.* 18:(5):227-230.
122. Hökfelt, T.; Broberger, C.; Xu, Z-Q.D.; Sergejev, R.U.; Diez, M. (2000) Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacology.* 39:1337-1356.
123. Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Bloom, F. (2003) Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurology.* 2:463-472.
124. Holsboer, F.; Spengler, D.; Heuser, I. (1992) The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementia. *Prog. Brain Res.* 93:385-417.
125. Holsboer, F.; Barden, N. (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Rev.* 17:187-205.
126. Holsboer, F. (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J. Psych. Res.* 33(3):181-214.
127. Huether G, Doering S, Ruger U, Ruther E, Schussler G. (1999) The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. *Psychiat Res.* 87:83-95.
128. Ionescu, E.; Coimbra, C.C.; Walker, C.D.; Jeanrenaud, B. (1989) Paraventricular nucleus

- modulation of glycaemia and insulinemia in freely moving lean rats. *Am. J. Physiol.* 257: R1370-R1376.
129. Itoi, K.; Tschöpe, C.; Jost, N.; Culman, J.; Lebrun, C.; Stauss, B.; Unger, T. (1992) Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. *European J. Pharmacol.* 219: 435-444.
 130. Jain, S.K.; Pandey, S.N.; Srivastava, R.K.; Ghosh, S.K. (2000) Stress and serum cholesterol levels-an experimental study. *J. Ant. Soc.* 49(2):165-167.
 131. Jessop, D.S.; Chowdrey, H.S.; Lightman, S.L. (1990) Substance P and substance K in the median eminence and paraventricular nucleus of the rat. *Neuropeptides.* 17: 135-140.
 132. Jessop, D.S.; Chowdrey, H.S.; Larsen, P.J.; Lightman, S.L. (1992) Substance P: multifunctional peptide in the hypothalamo-pituitary system? *J Endocrinol.* 132:333-337.
 133. Jessop, D.S.; Renshaw, D.; Larsen, P.J.; Chowdrey, H.S. (1998) Endogenous substance P acts centrally to terminate the HPA axis response to acute stress. Abstract P1 410, 80th Annual Meeting. Endocrine Society, New Orleans, USA.
 134. Jessop, D.S. (1999) Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Endocr.* 160:169-180.
 135. Jeukendrup, A .E.; Saris, W.H.; Wagenmakers, A .J. (1998) Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int. J. Sports. Med.* 19:(4):231-244.
 136. Jezova, D.; Ochedalski, T.; Glickman, M.; Kiss, A.; Aguilera, G. (1999) Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience.* 94:(3): 797-802.
 137. Jones, R.S.; Olpe, H.R. (1984) Activation of noradrenergic projection from locus coeruleus reduces the excitatory responses of anterior cingulate cortical neurons to substance P. *Neuroscience.* 13:819-825.
 138. John, T.M.; Viswanathan, M.; George, J.C.; Scanes, C.G. (1988) Flight effects on plasma levels of free fatty acids, growth hormone in homing pigeons. *Horm. Metabol. Res.* 20:271-273.
 139. Kalueff, A.V.; Tuohimaa, P. (2004) Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiol. Exp.* 64:439-448.
 140. Kanazawa, I.; Jessel, T. (1976) Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res.* 117: 362-367.
 141. Kang, J.; Kelley, D.E.; Robertson, R.J.; Goss, F.L.; Suminski, R.R.; Utter, A.L.; Dasilva, S.G. (1999) Substrate utilization and glucose turnover during exercise of varying intensities in individuals with NIDDM. *Med. Sci.Spt. Exec.* 31:82-89.
 142. Kopchik, K.L.; Altman, H.J.; Commissaris, R.L. (1992) Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:453-461.
 143. Kramer, M.S.; Cutler, N.; Feighner, J. (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science.* 281:1640-1645.
 144. Kumon, A.; Takahashi, A.; Kóri-Hara, T. (1977) Epinephrine: a mediator of plasma glycerol elevation by hypothalamic stimulation. *Am. J. Physiol.* 233:E369-E373.
 145. Kumon, A. ; Takahashi, A. ; Kóri-Hara, T. ; Shimazy, T. (1976) Mechanism of lipolysis induced by electrical stimulation of hypothalamus in the rabbit. *J. Lipid. Res.* 17:551-558.
 146. Kurtz, M. M.; Wang, M. K. Clements, M. A. Cascieri, C. P. Austin, B. R. Cunningham, G. G.

- Chicchi, Q. Liu. (2002) Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*. 296:205-212.
147. Kvetnanský, R.; Mikulaj, L. (1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 87: 738-743.
 148. Kvetnanský, R.; Pacák, K.; Fukuhara, K.; Viskupic, E.; Hiremagalur, B.; Nankova, B.; Goldstein, D.S.; Sabban, E.L.; Kopin, I.J. (1995) Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann NY Acad Sci*. 771:131-58.
 149. Lacerda, A.C.R.; Marubayashi, U.; Balthazar, C.H.; Coimbra, C.C. (2006) Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise reducing running performance in rats. *Neurosci. Lett*. 393:260-263.
 150. Lafontan, M.; Bousquet-Melou, A.; Galitzky, J.; Barbe, P.; Carpené, C.; Langin, D.; Berlan, M.; Valet, P.; Bolouminé, A. (1995) Adrenergic adrenoceptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. *Obes. Res*. 3(4):507s-514s.
 151. Lafontan, M. (2001) Lipid metabolism in adipose tissue: adrenergic control of the adipocyte and mobilization on the lipids. *Am.Endocrinol*. 62(4):S7-S17.
 152. Lafontan, M.; Berlan, M.; Stich, V.; Crampes, F.; Riviere, D.; De Glisezinski, I.; Sengenés, C.; Galitsky, J. (2002) Recent data on the regulation of lipolysis by catecholamines and natriuretic peptides. *Ann. Endocrinol*. 63(2):86-90.
 153. Laneuville, O.; Dorais, J.; Couture, R. (1988) 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.
 154. Lang, P.J.; Davis, M.; Öhman, A. (2000) Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J. Affec. Disor*. 61(3):137-159.
 155. Large, V.; Arner, P. (1998) Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diab.Metab*. 24:409-418.
 156. Larsen, P.J.; Jessop, D.; Patel, H.; Lightman, S.L.; Chowdrey, H.S. (1993a). Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotrophin via a central mechanism involving corticotrophin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol*. 5:99-105.
 157. Larsen, P.J.; Mikkelsen, J.D.; Jessop, D.S.; Lightman, S.L.; Chowdrey, H.S. (1993b) Neuropeptide Y mRNA and immunoreactivity in hypothalamic neuroendocrine neurons: effects of adrenalectomy and chronic osmotic stimulation. *J. Neurosci*. 13:1138-1147.
 158. Leibowitz, S.F.; Sladek, C.; Spencer, L.; Tempel, D. (1988). Neuropeptide Y, epinephrine and norepinephrine in the paraventricular nucleus: stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose. *Brain Res Bull*. 21(6):905-912.
 159. Lennquist, S. (1975) Urinary excretion of hydroxyprolines in man under the influence of cold. *Scand J Clin Lab Invest*. 35(2):103-107.
 160. Lima, N.V.; Coimbra, C.C.; Marubayashi, U. (1998) Effect of intracerebroventricular injection of atropin on metabolic responses during exercise in untrained rats. *Physiol. Behv*. 64:69-74.
 161. Ljungdahl, A.; Höekfelt, T.; Nilsson, G. (1978) Distribution of substance p-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminalis. *Neuroscience*. 3:861-943.
 162. Loopuijt, L.D.; Van Der Kooy, D. (1985) Organization of the striatum: collateralization of its efferent axons. *Brain Res*. 348:86-99.

163. Maggi, C. A.; Patacchini, R.; Rovero, P.; Giachetti, A. (1993) Tachykinin receptors and tachykinin antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 13: 23-93.
164. Maggio, J. E. (1988) Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosci.* 11:13-28.
165. Malendowicz, L. K.; Markowska, A. (1994) Neuromedins and their involvement in the regulation of growth, structure and function of the adrenal cortex. *Histol. Histopathol.* 9:591-601.
166. Margis, R.; Picon, P.; Cosner, A.F.; Silveira, R.O. (2003) Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Ver. Psiquiatr.* 25(1):65-74.
167. Márquez, C.; Belda, X.; Armário, A. (2002) Pos-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Research.* 926:181-185.
168. Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2004) The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience.* 123(3):601-612.
169. Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2005) Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology.* 30:179-187.
170. Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2006) Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult rats. *Behav. Brain Res.* 168:13-22.
171. Martí, O.; Armario, A. (1998). Anterior pituitary response to stress : time-related changes and adaptation. *J. Develop. Neurosc.* 7: 241-260 .
172. Martí, O.; Harbuzb, M.S.; Andrésa, R.; Lightmanb, S.L.; Armário, A. (1999) Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. *Brain Research.* 821(1):1-7.
173. Marti, O.; García, A.; Vallés, A.; Harbuz, M.S.; Armario, A. (2001) Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *Eur. J. Neurosci.* 13:129-136.
174. Martijena, I.D.; Calvo, N.; Volosin, M.; Molina, V.A. (1997) Prior exposure to a brief session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Research.* 752: 136-142.
175. Mazzone, S.B.; Geraghty, D.P. (1999) Altered respiratory response to substance P and reduced NK1 receptor binding in the nucleus of the solitary tract of aged rats. *Brain Res.* 826:139-142.
176. McEwen, B.S. (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 33:171-179.
177. McEwen, B. S. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research.* 886:172-189.
178. McEwen, B. S. (2005) Stressed or stressed out: what is the difference? *Rev. Psychiatr. Neurosci.* 30(5):315-318.
179. McKeown, B.A.; John, T.M.; George, J.C. (1974) Effect of exercise on levels of plasma growth hormone, free fatty acids and glucose in the pigeon. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 82:55-62.
180. McLean, S.; Ganong, A.; Seeger, T.F.; Bryce, D.K.; Pratt, K.G.; Reynolds, L.S.; Siok, C.J.; Lowe, J.A.; Heym, J. (1991) Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK1) receptor antagonist. *Science.* 251:437-439.

181. McLean, S. (1996) Nonpeptide antagonists of the NK1 tachykinin receptor. *Med. Res. Rev.* 16: 297-317.
182. Mello, A.A.F.; de Mello, M.F.; Carpenter, L.L.; Lawrence, H.P. (2003) Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25(4):231-238.
183. Migliorini, R.H.; Garofalo, M.A .R.; Kettelhut, I.C. (1997) Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am. J. Physiol.* 272: 656-661.
184. Millan, M.J. (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology.* 70:83-244.
185. Montgomery, K.C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. C. Physiol. Psychology*, 48: 254-260.
186. Mussap, C. J.; Geraghty, D. P.; Burcher, E. (1993) Tachykinin receptors: a radioligand binding prespective. *J. Neurochem.* 60:1987-2009.
187. Naeser P. (1973) Effects of adrenalectomy on the obese-hyperglycemic syndrome in mice (gene symbol ob). *Diabetologia.* 9(5):376–379.
188. Nagashima, A.; Takano, Y.; Tateishi, Y.; Matsuoka, T.; Hamaoka, T.; Kamuya, H. (1989) Cardiovascular roles of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitari of rats. *Brain Res.* 487:392-396.
189. Nakanishi, S. (1991) Mammalian tachykinin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 14:123-136.
190. Natelson, B.H.; Creighton, D.; McCarty, R.; Tapp, W.N.; Pitman, D.; Ottenweller, J.E. (1987) Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol. Behav.* 39:117-125.
191. Nicholson, S.A.; Adrian, T.E.; Gillham, B.; Jones, M.T.; Bloom, S.R. (1984) Effect of hypothalamic neuropeptides on corticotrophin release from quarters of rat anterior pituitary gland *in vitro*. *Journal of Endocrinology.* 100(2):219-226.
192. Nijima, A. (1986) Neural mechanisms in the control of blood glucose concentration. *J. Nutr.* 119:833-840.
193. Nijima, A. (1989) Neural control of blood glucose level. *J.Physiol.* 36:827-841.
194. Nonogaki, K. (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia.* 43: 533-549.
195. Nussdorfer, G.G.; Malendowicz, L.K. (1998) Role of tachykinins in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides.* 19(5):949-68.
196. Öro, L.; Wallenberg, L.R.; Bolme, P. (1965) Influence of electrical supramedullary stimulation on the plasma level of free fatty acids, blood pressure and heart rate in the dog. *Acta Med. Scand.* 178:697-711.
197. Otsuka, M.; Yoshioka, L. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 73: 229-308.
198. Ottosson, M.; Lönnroth, P.; Björntorp, P.; Edén, S. (2000) Effects of cortisol and growth hormone on lipolysis in human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:(2):799-803.
199. Owens, M.J. Nemeroff, C.B. (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 43:425-473.

200. Pacák, K.; Palkovits, M.; Kvetnanský, R.; Yadid, G.; Kopin, I.J.; Goldstein, D.S. (1995) Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci.* 771:115-30.
201. Pacak, K.; Miklos Palkovits, M.; Yadid,G.; Kvetnansky, R.; Irwin J. Kopin,I.J.; Goldstein, D.S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* . 275: R1247-R1255.
202. Pacák, K.; Palkovits, M. (2001) Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders . *Endocrine Reviews.* 22 (4): 502-548.
203. Page, N.M.; Bell, N.J.; Gardiner, S.M.; Manyonda, I.T.; Brayley, K.J.; Strange, P.G.; Lowry P. J. (2003) Characterization of the endokinins: Human tachykinins with cardiovascular activity . *PNAS.* 13(100):6245-6250 .
204. Padovan, C.M.; Guimarães, F.S. (2000) Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(1):79-83.
205. Panula, P.; Yang, Y.T.; Costa, E. (1984) Comparative distribution of bombesin/GRP- and substance P-like immunoreactivities in rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 224:606-617.
206. Papir-Kricheli, D.; Frey, J.R.; Laufer, C.; Gilon, M.; Chorev, Z.; Selinger, Devor, M. (1987) Behavioural effects of receptors specific substance P agonists. *Pain.* 31:263.
207. Paschoalini, M.A.; Migliorini, R.H. (1990) participation of the CNS in the control of FFA Mobilization during fasting in rabbits. *J. Physiol. Beh.* 47:461-465.
208. Patacchini, R.; Maggi, C. A. (1995) Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 329: 161-184.
209. Paxinos, G.; Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, Sydney), 3rd Ed.
210. Peeters, B.W.; Broekkamp, C.L. (1994) Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. *Steroid Biochem Mol Biol.* 49(4-6):417-27.
211. Pellow, S. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodentes valid? *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 8:557-565.
212. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods.* 14: 149-167.
213. Pennefather, J.N.; Lecci, A.; Candenas, ML.; Patak, E.; Pinto, F.M.; Maggi, C.A. (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences.* 74:1445-1463.
214. Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35: 85-141.
215. Pickel, V.M.; Joh, T.H.; Reis, D.J.; Leeman, S.E.; Miller, R.J. (1979) Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res.;* 160:387-400.
216. Piedimonte, G. (1995) Neurokinin peptides, receptors, and peptidases in airway disease. *Exp. Lung Res.* 21:809-834.
217. Pihoker, C.; Owens, M.J.; Kuhn, C.M.; Schanberg, S.M.; Nemeroff, C.B. (1993) Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology.* 18:(7):485-93.

218. Pilkis, S.J.; El-Magharibi, M.R.; Claus, T.H. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57:755-783.
219. Radziuk, J.; Pye, S. (2001) Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Met. Res. Ver.* 17:250-272.
220. Rayner, D.V. (2001) The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc. Nut. Soc.* 60:357-364.
221. Regoli, D.; Drapeau, G.; Dion, S.; D'orle'ans-Juste, P. (1989) Receptors for substance P and related tachykinins. *Pharmacology.* 38:1-15.
222. Reis, F. M.; Oliveira Junior, A.R.; Machado, L.J.C.; Guerra, R.M.; Reis, A.M.; Coimbra, C. C. (1998) Plasma prolactin and glucose alterations induced by surgical stress: a single or dual response?. *Experimental Physiology.* 83:1-10.
223. Renoldi, G.; Invernizzi, R.W. (2006) Blockade of tachykinin NK1 receptors attenuates stress-induced rise of extracellular noradrenaline and dopamine in the rat and gerbil medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Research* . 84(5): 961 – 968.
224. Ribeiro, S. J. (1998) Envolvimento do receptor neurocinérgico NK₃ na ansiedade experimental em camundongos avaliada no labirinto em cruz elevado. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Florianópolis, SC.
225. Rodgers, R.J.; Cole, J.C. (1993) Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.* 54:729-736.
226. Rodgers, R.J.; Cao, B.J.; Dalvi, A.; Holmes, A. (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Res.* 30(3):289-304.
227. Rogatto, G.P. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar. Dissertação de Mestrado em Ciências da Motricidade – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
228. Romero, L.M.; Plotsky, P. M.; Sapolsky, R.M. (1993) Patterns of adrenocorticotropin secretagog release with hypoglycemia, novelty, and restraint after colchicine blockade of axonal transport. *Endocrinology.* 132:199-204.
229. Rósen, A.; Brodin, K.; Eneroth, P.; Brodin, E. (1992). Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 146:341-348.
230. Rosenfeld, P.; Wetmore, J.B.; Levine, S. (1992) Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav.* 52: 787-791.
231. Ruffin, M.; Nicolaidis, S. (1999) Electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus enhances both fat utilization and metabolic rate that precede and parallel the inhibition of feeding behavior. *Brain Res.* 846:(1):23-9.
232. Rupniak NM and Kramer MS (1999) Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 20: 485-490.
233. Rupniak, N.M.J.; Carlson, E.C.; Harrison, T.; Oates, B.; Seward, E.; Owen, S.; De Felipe, C.; Hunt, S.; Wheeldon, A. (2000) Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology.* 39:1413-1421.
234. Salpolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress response? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*

- 21:55-89.
235. Sampaio-Barros, M.M.; Farias-Silva, E.; Grassi-Kassisse, D. M.; Spadari-Bratfisch, R.C. (2003) Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. *Stress*. 6(2):127-132.
 236. Sanders, S.K.; Shekhar, A. (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmac. Biochem. Behav.* 52:701-706.
 237. Sandford, J.J.; Argyropoulos, S.V.; Nutt, D.J. (2000) The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. *Pharm. Therap.* 88:197-212.
 238. Santarelli, L.; Gobbi, G.; Debs, P.C.; Sibille, E.T.; Blier, P.; Hen, R.; Heath, M.J. (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1912-1917.
 239. Santarelli, L.; Saxe, M.; Gross, C.; Surget, A.; Battaglia, F.; Dulawa, S.; Weisstaub, N.; Lee, J.; Duman, R.; Arancio, O.; Belzung, C.; Hen, R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301:805-809.
 240. Santos, I.N. Spadari-Bratfisch, R.C. (2006) Stress and cardiac beta adrenoceptors. *Stress*. 9(2):1-16.
 241. Saria, A. (1999) The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 51-60.
 242. Schadt, J.C.; Ludbrook, J. (1991) Hemodynamic and neurohormonal responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am. J. Physiol.* 260 (29): H305-H318.
 243. Scheurink, A.J.W.; Steffens, A.B.; Bouritius, H.; Dreteler, G.H.; Bruntink, R.; Remie, R.; Zaagsma, J. (1989). Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *Am. J. Physiol.* 256:R155-R160.
 244. Seabrook, G.R.; Bowery, B.J.; Hill, R.G. (1995). Pharmacology of tachykinin receptors on neurons in the ventral tegmental area of rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 273:113-119.
 245. Selye, H. (1936) A syndrome produce by diverse nocuous agents. *Nature*. 138:32.
 246. Severini, C.; Improya, G.; Falconieri-Erspamer, G.; Salvadori, S.; Erspamer, V. (2002) The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Rev.* 54(2):285-322.
 247. Shaik, M.B.; Siegel, A. (1994) Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defense rage behavior in the cat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27:2759-2779.
 248. Shimazu, T.;Fukuda, A.; Ban, T. (1966) Reciprocal influence of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose levels and liver glycogen content. *Nature*. 210: 1178-1179.
 249. Shultz, C.W.; Quirion, R.; Chonwall, B.; Chase, T.N.; O'Donohue, T.L. (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides*. 5:1097-1128.
 250. Siegel, R.A.; Duker, E.M.; Pahnke, U.; Wuttke, W. (1987) Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 46(1):75-81.
 251. Silveira, S.A.; Haibara, A.S.; Lima, N.V.; Coimbra, C.C. (2003) The hypothalamic paraventricular nucleus and carotid receptors modulate hyperglycemia induced by hemorrhage. *Brain Research*. 993:183-191.
 252. Silveira, S.A.; Haibara, A.S.; Coimbra, C.C. (2005) The carotid baroreceptors modulates the hyperglycemia induced by hemorrhage. *Autonomic Neuroscience*. 123:36-43.

253. Sinha, R.K.; Ray, A.K. (2004) An assessment of changes in open-field and elevated plus-maze behavior following heat stress in rats. *Iran. Biomed. J.* 8(3):127-133.
254. Skutella, T.; Probst, J. C.; Renner, U.; Holsboer, F. ; Beh, C. (1998) Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience.* 85(3)795-805.
255. Slavin, B.G.; Ong, J.M.; Kern, P.A. (1994) Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J.Lipid Res.* 35(9):1535-1541.
256. Southwick, S.M.; Paige S.; Morgan, C.A.; Bremner, J.D.; Krystal, J.H.; Charney, D.S. (1999) Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. *Semin. Clin. Neuropsychiatry.* 4(4):242-8.
257. Stables, J. M.; Beresford, I. J. M.; Arkinstall, S.; Ireland, S. J.; Walsh, D. M.; Seale, P. W.; Ward, P.; Hagan, R. M. (1994) GR 138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK3 receptors. *Neuropeptides.* 27: 333-341.
258. Stahl, S.M. (1999). Substance P and the neurokinins: novel peptide neurotransmitters in psychopharmacology. *J Clin Psychiatry.* 60(2):77-78.
259. Steckler, T.; Holsboer, F. (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol. Psychiatry.* 46(11):1480-508.
260. Steenbergen, H.L.; Heinsbroek, R.P, Van Hest, A.; Van de Poll, N.E. (1990) Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav.* 48(4):571-576.
261. Steffens, A .B.; Damsma, G.; van der Gugten, J.; Luiten, P.G. (1984) Circulating free fatty acids, insulin, and glucose during chemical stimulation of hypothalamus in rats. *Am J Physiol.* 247:E765-71.
262. Steinberg, R.; Alonso, R.; Griebel, G.; Bert, L.; Jung, M.; Oury-Donat, F.; Poncelet, M.; Gueudet, C.; Desvignes, C.; Le Fur.; G. Soubrie, P. (2001) Selective blockade of neurokinin-2 receptors produces antidepressant-like effects associated with reduced corticotropin-releasing factor function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299:449-458.
263. Sterling, P.; Eyer, J. (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher, S., Reason, J., editors. *Handbook of life stress, cognition and health.* 629-649.
264. Strand, F.L.(1999) Tachykinins: substance P, neurokinin A, and neurokinin B. In: Steven, C.F. (Ed.), *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes.* *The Mit Press*, Cambridge, MA, pp. 365-382.
265. Stratakis, C.A.; Chrousos, G.P. (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Am. N.Y. Acad. Sci.* 771:1-18.
266. Stratton, S.C.; Beresford, I. J. M.; Hagan, R. M. (1994). GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK2 receptor antagonist, release suppressed behaviours in a novel aversive environment. *British J. Pharmacol.* 112:49P.
267. Stratton, S.C.; Beresford, I.J.M.; Harvey, F.J.; Turpin, M.P.; Hagan, R.M.; Tyers, M.B. (1993) Anxiolytic activity of tachykinin NK₂ receptor antagonists in the mouse light-dark box. *Eur. J. Pharmacol.* 250:11-12.
268. Strohle, A.; Jahn, H.; Montkowski, A.; Liebsch, G.; Boll, E.; Landgraf, R.; Holsboer, F.; Wiedemann, K. (1997) Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. *Neuroendocrinology.* 65:210-215.
269. Sutoo, D.; Akiyama, K. (2002) Neurochemical changes in mice following physical or psychological stress exposures. *Behav-Brain-Res.* 134(1-2): 347-54.

270. Takayama, H.; Ota, Z.; Ogawa, N. (1986) Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. *Regul. Pept.* 15:239-248.
271. Teixeira, R.M.; Santos, A .R.S.; Calixto, J.B.; Era, G.A.; De Lima, T.C.M. (1996) Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 311:7-14.
272. Timo-Iaria, C. (1990) Glucoreceptor Systems: From Control of Glycemia to Feeding Behavior . *News Physiol Sci.* 5: 46-49.
273. Trayhurn, P.; Beattie, J.H. (2001) Physiologicl role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nut. Soc.* 60:329-339.
274. Treit, D. (1985) Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 203-223.
275. Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:463-469.
276. Tsigos, C.; Chrousos, G.P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychos. Res.* 53:865-871.
277. Tsuda, K.; Yoshimatsu, H.; Nijjima, A. Chiba, S. Okeda, T.; Sakata, T. (2002) Hypotlamic histamine neurons activate lipolysis in rat adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* 227:208-213.
278. Tsuruo, Y.; Kawano, H.; Nishiyama, T.; Misano, S.; Daikoku, S. (1983) Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hipothalamus light and electron microscopy. *Brain Res.* 289:1-9.
279. Unger, T.; Carolus, S.; Demmert, G. Ganten, D.; Lang, R.E.; Maser-Gluth, C. (1988) Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res.* 63: 812-820.
280. Van Den Bruse, M.; Van Acker, S.A.B.E.; Fluttert, M.; De Kloet, E.R. (2001) Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological “novelty” stress freely moving rats. *Psychophysiology.* 38:490-499.
281. Van de Kar, L.D. (1991) neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:289-320.
282. Van de Kar, L.D.; Blair, M.L. (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 20(1):1-48.
283. Vassout, A.; Veenstra, S.; Hauser, K.; Ofner, S.; Brugger, F.; Schilling, W.; Gentsch, C.; Saria, A.; Geppetti, P.; Urban, L. (2000) NKP608 : a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats. *Neuropeptides.* 96:7-16.
284. Vedhara, K.; Hyde, J.; Gilchrist, I.D.; Tytherleigh, M.; Plummer, S. (2000) Acute stress, memory, attention and cortisol. *Psychoneuroendocrinology.* 25(6):535-49.
285. Verago, J.L.; Grassi-Kassisse, D.M.; Spadari-Bratfisch, R.C. (2001) Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. *Braz J Med Biol Res.* 34(9)1197-1207.
286. Vissing, J. (2000) Muscle reflex and central motor control of neuroendocrine activity, glucose homeostasis and circulation during exercise. *Acta Physiol. Scand.* 170:5-26.
287. Von Euler, V.; Gaddum, J. (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* 72:74-87.
288. Watt, M.J.; Howlett, K.F.; Febbraio, M.A.; Spriet, L.L.; Hargreaves, M. (2001) Adrenaline increases

- skeletal muscle glycogenolysis pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J. Physiol.* 534(1):269-278.
289. Wennlund, A.; Wahrenberg, H.; Hagstrom-Toft, E.; Bolinder, J.; Arner, P. (1994). Lipolytic and cardiac responses to various forms of stress in humans. *Int. J. Sports. Med.* 15(7):408-13.
290. Wettstein, J.G.; Earley, B.; Junierns, J.L. (1995). Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol. Ther.* 65:397-414.
291. Widmaier, E.P.; Rosen, K.; Abbott, B. (1992). Free fatty acids activate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rats. *Endocrinology.* 131:2313-2318.
292. Yadin, E.; Thomas, E.; Vaughan, M.P. (1993) The role of the lateral septum in anxiety. *Physiol. Behav.* 53:1077-1083.
293. Yamada, F.; Inoue, S.; Saitoh, T.; Tanaka, K.; Satoh, S.; Takamura, Y. (1993) Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology.* 132: 2199-2205.
294. Yamaguchi, N. (1992) Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70(2):167-206.
295. Zaia, C.T.B.V.; Gaziri, L. C. J.; Zaia, D. A. M.; Delatre, E.; Dolnikoff, M. S.; Iaria, C. T. (1997) Effect of chemical stimulation of dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acid. *Brain Res. Bull.* 42(3):195-198.
296. Zangrossi, H.Jr.; File, S.E. (1992) Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull.* 29:381-388.
297. Zernig, G.; Dietrich, M.; Maggi, C. A.; Saria, A. (1992) The substance P (NK₁) receptor antagonists (±)-CP-96,345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. *Neurosci Lett.* 143:169-172.
298. Zernig, G.; Troger, J.; Saria, A. (1993) Different behavioral profile of the nonpeptide substance P (NK₁) antagonists CP-96,345 and RP 67580 in Swiss albino mice in the black-and-white box. *Neurosci Lett.* 151: 64-66.
299. Zhang, Y.; Lu, C.; Furlonger, G. E. Wu, C. J. Paige. (2000) Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat. Immunol.* 1:392.