

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA BETA GLOBINA LVV-H6 E LVV-H7 SOBRE OS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIEDADE E TIPO-DEPRESSÃO, FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS.

KELLEN ROSA DA CRUZ

GOIÂNIA-GO 2019



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a <u>Lei 9.610/98</u>, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[] Dissertação [x] Tese

2. Nome completo do autor

Kellen Rosa da Cruz

3. Título do trabalho

Efeitos de peptídeos derivados da beta globina LVV-H6 e LVV-H7 sobre os comportamentos tipo-ansiedade e tipo-depressão, função cardíaca e vascular de ratos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
 a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo. Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

•1

- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio**,



Professor do Magistério Superior, em 04/09/2020, às 23:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº</u> 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **KELLEN ROSA DA CRUZ**, **Discente**, em 09/09/2020, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6° , § 1°, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u>.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?</u> <u>acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0</u>, informando o código verificador **1534632** e o código CRC **985268DE**.

Referência: Processo nº 23070.034322/2019-42

SEI nº 1534632

KELLEN ROSA DA CRUZ

EFEITOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA BETA GLOBINA LVV-H6 E LVV-H7 SOBRE OS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIEDADE E TIPO-DEPRESSÃO, FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS.

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como prérequisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio Co-orientadora: Dra. Danielle Alves Ianzer

GOIÂNIA-GO 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rosa da Cruz, KELLEN EFEITOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA BETA GLOBINA LVV H6 E LVV-H7 SOBRE OS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIEDADE E TIPO-DEPRESSÃO, FUNÇÃO CARDÍACA E VASCULAR DE RATOS. [manuscrito] / KELLEN Rosa da Cruz 2019. 7, 100 f.: il.
Orientador: Prof. Carlos Henrique Xavier Custódio; co-orientador Danielle Alves Ianzer. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2019. Bibliografia. Anexos. Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.
 Hemorfinas. 2. LVV-h6. 3. LVV-h7. 4. Ansiedade. 5. Depressão. Xavier Custódio, Carlos Henrique, orient. II. Título.
CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 80 da sessão de Defesa de Tese de **Kellen Rosa da Cruz** que confere o título de Doutor(a) em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Ao/s onze dias do mês de outubro de 2019, a partir da(s) 14:00 h, no(a) Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas III, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "Efeitos de peptídeos derivados da beta globina LVV-H6 e LVV-H7 sobre os comportamentos tipo-ansiedade e tipo-depressão, função cardíaca e vascular de ratos". Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Carlos Henrique Xavier Custódio (ICB/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Patrícia Maria Ferreira (ICB/UFG), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Elder Sales da Silva (UEG), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Paulo César Ghedini (ICB/UFG), membro titular interno; Doutor(a) Ricardo Cambraia Parreira (ICB/UFG), membro titular externo. Durante a argüição os membros da banca **[não fizeram]** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **[aprovada]** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) Carlos de Banca Examinadora (a) candidato(b), Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) onze dias do mês de outubro de 2019.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio**, **Professor do Magistério Superior**, em 11/10/2019, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo César Ghedini**, **Professor do Magistério Superior**, em 11/10/2019, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Maria Ferreira**, **Professor do Magistério Superior**, em 11/10/2019, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Cambraia Parreira**, **Usuário Externo**, em 11/10/2019, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Elder Sales da Silva**, **Usuário Externo**, em 14/10/2019, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de</u> 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
 <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?</u>
 <u>acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0</u>, informando o código verificador 0903689 e
 o código CRC B2C58345.

Referência: Processo nº 23070.034322/2019-42

SEI nº 0903689

Dedicatória

Dedico ao meu Deus e Nossa Senhora Aparecida, que permitiram a realização deste sonho e seguraram em minhas mãos para eu me levantar depois de cada queda.

Dedico aos meus pais, Eunice e Lourenço que nunca mediram esforços para ver a minha felicidade e meus sonhos realizados.

Ao meu grande companheiro, confidente e cúmplice, Lauro, o amor da minha vida. Você me traz paz, sem você ao meu lado tudo teria sido muito mais difícil.

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio, pela confiança, oportunidade, por acreditar que eu era capaz e pela orientação.

Aos professores: Dr. Elson Alves Costa, por todo apoio, ensinamento e colaboração nos protocolos de comportamento, por ter cedido o aparato do Campo Aberto e algumas drogas, além de estar sempre à disposição para ajudar e ensinar; e ao professor Dr. Paulo César Ghedini pelo apoio e por ter cedido o aparato de Labirinto em Cruz Elevada.

Aos professores: Dr. Robson Santos, Dr. Carlos Henrique de Castro e Dr. Diego Basile Colugnati, pelo apoio e colaborações.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de Neurobiologia de Sistemas: Jean, Juliana, Dryeli, Michele e Elder, por toda ajuda no dia a dia do laboratório Em especial a Amanda no auxílio dos experimentos da técnica de vaso isolado. Agradeço também ao Ismaley, mestrando do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Neurológica e cardiovascular pelo auxílio nos experimentos de coração isolado. À Karina Gomes também do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Neurológica e cardiovascular pelo auxílio nos experimentos de coração isolado. À Karina Gomes também do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Neurológica e cardiovascular pela colaboração, apoio e conhecimento compartilhado no decorrer deste caminho.

Aos meus pais Eunice e Lourenço. Às minhas irmãs: Mônica e Ellen, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram, incentivaram e me deram forças para continuar diante do caminho árduo que percorri até aqui, com tantos obstáculos.

Ao meu amor, Lauro, quem está sempre ao meu lado, incentivando os meus sonhos, apoiando minhas decisões e quem foi e é primordial em cada dia desta jornada.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

À população brasileira por me proporcionar a oportunidade de investir em minha formação.

A todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Às agências de fomento Capes, CNPq e Fapeg.

Ao INCT – Nano Biofar, pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	XII
Tabela de sigla e abreviaturas de aminoácidos	XV
Lista de Figuras	XVI
Lista de Tabelas	XVII
Lista de quadro	XVII
Resumo	XVIII
Abstract	XX
INTRODUÇÃO	1
1 Ansiedade	2
2 Depressão	5
3 Hemorfinas	11
3.1 LVV-hemorfina-6 (LVV-h6)	14
3.2 LVV-hemorfina-7 (LVV-h7)	15
OBJETIVOS	19
4 Objetivos	20
4.1 Objetivo geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
METODOLOGIA	21
5 Metodologia	22
5.1 Animais	22
5.2 Fármacos	22
5.3 Grupos experimentais	23
5.4 Análise estatística	24
5.5 Avaliação do comportamento tipo ansiedade e atividade	
locomotora/exploratória	25
5.5.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	25
5.5.2 Campo aberto (CA)	26
5.5.3 Sequência experimental	27

5.6 Avaliação do comportamento tipo depressão	29
5.6.1 Sequência experimental	30
5.7 Avaliação dos efeitos sobre a função cardíaca em coração isolado de	
ratos	32
5.8 Avaliação dos efeitos sobre a reatividade vascular em anéis de aorta	
isolados	.33
RESULTADOS	.35
6 Resultados	36
6.1 Avaliação do envolvimento da via catecolaminérgica e opióide no efeito	
tipo-ansiolítico promovido pela LVV-h6 e LVV-h7	.36
6.2 Avaliação do envolvimento da via catecolaminérgica e opióide no efeito	
tipo-antidepressivo promovido pela LVV-h6 e LVV-h7	.45
6.3 Efeitos da perfusão com LVV-h6 e LVV-h7 em coração isolado	.46
6.4 Efeitos da LVV-h6 e LVV-h7 sobre a reatividade vascular	.49
DISCUSSÃO	.50
7 Discussão	.51
CONCLUSÃO	.64
8 Conclusão	.65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.66
ANEXO 1	79
ANEXO 2	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH hormônio adrenocorticotrófico
- AMPc 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
- AMPT alfa-metil-p-tirosina
- ANOVA análise de variância
- AT4 receptor de angiotensina IV
- AT4/IRAP receptor de angiotensina IV com atividade aminopeptidase regulada

por insulina

- BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BNST núcleo da stria terminalis
- CA campo aberto
- CEBIO centro de bioterismo
- cm centímetro
- CRF fator de liberação de corticotrofina
- D2 receptor de dopamina subtipo 2
- DO dopamina
- DOR receptor Delta-opióide
- dP/dt derivada de pressão por tempo
- dP/dt_{max}- valor máximo da derivada de pressão por tempo
- dP/dt_{min} valor mínimo da derivada de pressão por tempo
- DPM desvio padrão da média
- DZP diazepam
- ECA enzima conversora de angiotensina
- EPM erro padrão da média
- FC- frequência cardíaca
- g grama
- G grupo experimental
- GABA ácido gama-aminobutírico
- GABAA- receptor do ácido gama-aminobutírico subtipo A
- Gi/o proteína G inibitória
- GLUT glutamato
- G_βγ subunidade beta e gamma da proteína G
- h hora

- Hb hemoglobina
- HPA hipotálamo-pituitária-adrenal
- IBGE instituto brasileiro de geografia e estatística
- IgE imunoglobulina E
- IMI imipramina
- i.p. intraperitoneal
- IRAP aminopeptidase regulada por insulina
- ISRS inibidores seletivos da receptação de serototina
- i.v. intravenoso
- Kg kilograma
- KOR receptor Kappa-opióide
- L litros
- LC Locus Coeruleos
- LCE labirinto em cruz elevada
- Log logarítimo
- LVV-h4 LVV-hemorfina-4
- LVV-h6 LVV-hemorfina-6
- LVV-h7 LVV-hemorfina-7
- M Mol
- mg miligrama
- min minutos
- mL mililitro
- MOR receptor µ-opióide
- MRGPRX1- Mas-related G-protein coupled receptor member X1
- n número de animais
- NA noradrenalina
- NF nado forçado
- NMDA N-metil-D-aspartato
- nMol nanoMol
- nº número
- NTX naltrexona
- ° C grau Celsius
- OT ocitocina
- OTr receptor de ocitocina

- PAM pressão arterial média
- PET Tomografia por emissão de pósitrons
- PIDS pressão intraventricular diastólica
- PIVS pressão intraventricular sistólica
- PNS pesquisa nacional em saúde
- PP pressão de perfusão
- PVC polyvinyl chloride
- RNAm ácido ribonucleico mensageiro
- s.c. subcutânea
- SD Sprague-Dawley
- SHR ratos espontaneamente hipertensos
- SNC sistema nervoso central SRA -
- sistema renina angiotensina TNFa -
- fator de necrose tumoral alfa UFG -
- Universidade Federal de Goiás vs -

versus

- VV-h4 VV-hemorfina-4
- VV-h7 VV-hemorfina-7
- WK-Wistar-Kyoto
- µg micrograma
- µL microlitro
- $\mu M-microMol$
- 5-HT serotonina
- 5-HTr receptor de serotonina
- 5-HT1A receptor de serotonina subtipo 1A
- 5-HT1B receptor de serotonina subtipo 1B
- 5-HT1D receptor de serotonina subtipo 1D
- 5-HT 2B receptor de serotonina subtipo 2B
- 5-HT2C receptor de serotonina subtipo 2C
- 5-HT3 receptor de serotonina subtipo 3
- 5-HT4 receptor de serotonina subtipo 4
- 5-HT7 receptor de serotonina subtipo 7
- 8-OH-DPAT agonista específico 5-HT1A

TABELA DE SIGLA E ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

SIGLA	ABREVIATURA	AMINOÁCIDO
Arg	R	Arginina
Gln	Q	Glutamina
Leu	L	Leucina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	Р	Prolina
Thr	Т	Treonina
Trp	W	Triptofano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto representativa do modelo experimental Labirinto em Cruz Ele	evada
(LCE)	26

Figura 3: Representação esquemática da sequência experimental para verificar o envolvimento das vias catecolaminérgicas e opióide no efeito tipo-ansiolítico e na atividade de locomoção/exploração promovidos pela LVV-h6 e LVV-h7......28

Figura 4: Desenho representativo do modelo experimental de Nado forçado.....30

Figura 8:	Avaliação	do	envolvimento	da	via	de	cateco	lamina	s e	opióide	na
atividade	locomot	ora	/exploratória	de	Э	LV	V-h6	е	L۷۷	/-h7	em
ratos											.44

Figura 9: Avaliação do envolvimento da via de catecolaminas e opióide no efeito tipo-antidepressivo de LVV-h6 e LVV-h7 em ratos......46

Figura 10: Efeitos da LVV-h6 e LVV-h7 em coração isolado......48

LISTA DE TABELAS

Tabela	1.	Peptídeos	opióides	endógenos	atípicos	derivados	das	cadeias	β-
globina	da	hemoglobi	na						12

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	. Grupos ex	perimentais		23
----------	-------------	-------------	--	----

RESUMO

LVV-hemorfina-6 e LVV-hemorfina-7 (LVVs) são hemorfinas bioativas, que apresentam sequência de resíduos de aminoácidos semelhante, diferindo apenas pelo aminoácido Fenilalanina na extremidade N-terminal de LVVhemorfina-7. Ambas hemorfinas reduzem o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão, sendo este último, promovido pela LVV-h7, dependente da ativação e receptores de ocitocina, mas não o efeito evocado pela LVV-h6. Somado a isso, os dados na literatura acerca dos efeitos cardiovasculares evocados pela LVV-h7, são controversos e não há estudos dos efeitos de LVV-h6 sobre esse sistema fisiológico. Diante disso, o objetivo deste estudo foi identificar os mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais e, também verificar os efeitos sobre a vasomotricidade e função cardíaca na artéria aorta e coração isolado de ratos Wistar. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas de uso de animais, sob aprovação do projeto pelo comitê de ética e uso de animais da UFG (Protocolo de aprovação nº 090/14). Foi utilizado o Labirinto em Cruz Elevada (LCE) para avaliação do comportamento tipo-ansiedade e, em seguida foram colocados no campo aberto (CA) para avaliação da locomoção. Para avaliar o comportamento tipo- depressão foi utilizado o teste de Nado Forçado (NF). A técnica de vaso isolado foi utilizada para avaliar a reatividade vascular em anéis isolados da aorta torácica e a técnica Langendorff para avaliar a função cardíaca em coração isolado de ratos Wistar. O efeito tipo-ansiolítico de ambas hemorfinas não depende da rota de biossíntese de catecolaminas ou da ativação de receptores opióides. Contudo, o efeito tipo-antidepressivo das LVVs, foi revertido pelo bloqueio de receptores opióides, indicando a ativação desses receptores como mecanismo potencial. Ambas LVVs, reduzem de maneira similar a pressão de perfusão, a dP/dt máxima e mínima e a pressão intraventricular sistólica e diastólica em coração isolado de ratos, sem promover contração ou relaxamento de anéis de aorta isolada de ratos. Assim, apesar das LVVs provocarem os mesmos efeitos sobre o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão, os mecanismos subjacentes são parcialmente diferentes, mesmo com uma substancial similaridade na estrutura primária dessas hemorfinas. Além disso LVVs atuam diminuindo a função cardíaca, nos parâmetros avaliados, em

coração isolado de ratos normotensos sem afetar a vasomotricidade de anéis isolados da artéria aorta de ratos normotensos.

Palavras-Chave: Hemorfinas; LVV-h6; LVV-h7; ansiedade; depressão; função cardíaca.

ABSTRACT

Hemorphins are peptides derived from the hemoglobin β-globin chain. LVVhemorphine-6 and LVV-hemorphine-7 (LVVs) are bioactive hemorphins, which exhibit similar amino acid residue sequence, differing only by the amino acid Phenylalanine at the N-terminus of LVV-hemorphine-7. Both hemorphins reduce anxiety-like and depression-like behavior, the latter being promoted by LVV-h7, is oxytocin receptors dependent, but not the effect evoked by LVV-h6. In addition, the data in the literature about the cardiovascular effects evoked by LVV-h7 are controversial and there are no studies on the effects of LVV-h6 on this physiological system. Therefore, the objective of this study was to identify the mechanisms involved in behavioral effects and also to verify the effects on vasomotricity and cardiac function in the aorta artery and isolated heart of Wistar rats. The experimental protocols were carried out according to the norms of use of animals, under project approval by the committee of ethics and animal use of the UFG (Protocol of approval nº 090/14). The Elevated Pluz Maze (EPM) was used to evaluate the anxiety-like behavior and were then placed in the Open Field (OF) to evaluate locomotion. To evaluate the depression-like behavior, the Forced Swim test (FST) was used. The isolated vessel technique was used to evaluate vascular reactivity in thoracic aorta rings isolated and the Langendorff technique to evaluate heart function in heart i solated from Wistar rats. The anxiolytic-like effect of both hemorphins does not depend on the route of biosynthesis of catecholamines or the activation of opioid receptors. However, the antidepressant-like effect of LVVs was reversed by blockade of opioid receptors, indicating the activation of these receptors as a potential mechanism. Both LVVs similarly reduce perfusion pressure, maximal and minimum dP/dt and systolic and diastolic intraventricular pressure in heart isolated from rats, without promoting contraction or relaxation of aorta rings isolated from rats. Thus, although LVVs cause the same effects on anxiety-like and depression-like behavior, the underlying mechanisms are partially different, even with a substantial similarity in the primary structure of these hemorphins. In addition, LVVs act by decreasing cardiac function, in the evaluated parameters, in isolated heart of normotensive rats without affecting the vasomotricity of aorta rings isolated of normotensive rats.

Keywords: Hemorphins; LVV-h6; LVV-h7; anxiety; depression; cardiac function.

Introdução

1 ANSIEDADE

A Organização Mundial da Saúde (OMS/2017), define ansiedade como um transtorno mental (1), trata-se de um sentimento subjetivo de mal-estar, desconforto, apreensão ou temerosa preocupação excessivamente frequente, grave e persistente. Essa doença pode ser classificada em ansiedade de estado e ansiedade de traço, sendo a primeira, ansiedade momentânea em determinadas situações, enquanto a ansiedade de traço é constante em todas as situações (2).

Segundo a OMS (2017), cerca de 3,6% da população mundial (264 milhões de pessoas) é acometida por transtornos de ansiedade, com maior prevalência em mulheres (4,6 %) do que homens (2,6 %). É uma doença que não difere, significativamente, entre as faixas etárias (1).

Transtornos de ansiedade estão em 6º lugar como contribuinte para incapacitação de indivíduos em todos o mundo (1). Essa doença resulta de alterações no sistema límbico, especialmente na amígdala, que tem conexões com o córtex pré-frontal, e desempenha importante regulação da emoção negativa (3). A amígdala é uma região cerebral dividida em três subnúcleos: núcleo basolateral (formação e recuperação de memórias condicionadas ao medo) (4), núcleo corticomedial (controle de comportamentos sociais, sexual e processamento de respostas de defesa ao odor de predadores) (5-7) e núcleo central da amígdala (núcleo de projeções de saída da amígdala) (8). O estresse, considerado o maior fator de risco (7), recruta vias do sistema límbico, que inclui a amigdala. De fato, o estresse social aumentou arborização dendrítica em

neurônios do núcleo basolateral da amígdala de ratos, promovendo aumento do comportamento de evitação e ansiedade (9).

Além da amígdala outras áreas cerebrais contribuem para expressão dos sintomas de ansiedade, como o hipocampo, hipotálamo, córtex pré-frontal e córtex cingulado (10). Entre os neurotransmissores reguladores do comportamento ansiedade, evidências apontam para o GABA (11, 12), tendo em vista, que há uma redução na neurotransmissão GABAérgica na ansiedade (13). O receptor GABAérgico, subtipo GABAA, tem sua estrutura e função extensivamente investigada. Esse receptor é classificado como ionotrópico específico para íons cloreto, que tem sua atividade dependente de ligante. O receptor GABA_A contém cinco subunidades (2 subunidade α , 2 subunidades β e 1 subunidade y) (14) e para abertura do canal iônico é necessária a ligação de duas moléculas do neurotransmissor GABA nas subunidades $\alpha \in \beta$, promovendo inibição fásica do neurônio pelo influxo de cloreto (15).

Além da neurotransmissão GABAérgica, evidências por meio de tomografia por emissão de pósitrons (PET) demonstraram o envolvimento do sistema serotonérgico. Esses estudos identificaram, que há menor ligação ao receptor 5-HT1A (receptor inibitório) em pacientes com transtorno do pânico (16, 17) o que pode estar relacionado com sintomas associados ansiedade (18). Somando a isso, camundongos transgênicos sem expressão de receptores 5-HT1B, que inibem a liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central, após o tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), houve aumento nos níveis de serotonina no hipocampo reduzindo o comportamento tipo-ansiedade (19).

Somado a isso, vítimas de suicídio têm aumento na expressão de receptores 5-HT2C no córtex pré-frontal (20), sugerindo que ativação desse receptores possa contribuir para etiologia de transtornos de ansiedade e sintomas como ideação suicida (21). Diante do fato de que o tratamento agudo com ISRS pode promover ansiedade, sugere-se que isso esteja relacionado com o aumento de serotonina nas fendas sinápticas e a consequente ativação de receptores 5-HT2C e de auto receptores 5-HT1A (22-26). Além disso, a ativação de receptores 5-HT2C pelo o aumento da liberação de serotonina do núcleo dorsal da rafe aumenta o medo e ansiedade, via liberação do fator de liberação de corticotrofina (CRF) no núcleo hipotalâmico da *stria terminalis* (BNST), uma vez que a inibição desses neurônios na BNST reverte tais efeitos (27). Além disso, o receptor 5-HT2C inibe neurônios serotonérgicos por meio de mecanismos dependentes do neurotransmissor GABA (28).

Além do envolvimento da neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica na regulação do comportamento ansiedade, há também atuação dos hormônios do eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA) (3) e, além disso, há evidências de que o processo inflamatório, imunidade, estresse oxidativo e microbiota intestinal também podem interferir nesse comportamento (29, 30).

No individuo com ansiedade, os mecanismos excitatórios estão exacerbados e os inibitórios estão reduzidos, pode ocorrer aumento da resposta de defesa, por aumento da atividade da amígdala (31, 32). Todavia, em alguns pacientes pode ocorrer o oposto, havendo baixa reatividade. Tais diferenças podem promover sintomas diferentes entre pacientes. No primeiro caso, há respostas defensivas exageradas e, no segundo caso, mais relacionada à ansiedade crônica, ocorre embotamento emocional. A hiperatividade da

amigdala está associada com comportamento de ansiedade, promovendo aumento da vigilância e agressividade, por outro lado, a redução da atividade da amígdala promove sintomas de ansiedade relacionados ao embotamento, que corresponde à dificuldade em expressar emoções, pensamentos e sentimentos (33), além disso, muitas pessoas possuem ansiedade e depressão simultaneamente (1), por isso é de suma importância o estudo de ambos esses tipos de comportamentos.

2 DEPRESSÃO

Segundo a OMS, depressão é um transtorno mental (1), trata-se de uma doença complexa, heterogênea e, apesar de ser caracterizada por diversas etiologias (21), depende de emoções, como a tristeza, que estão presentes no cotidiano e, em vários casos, não possui uma causa externa definida (28).

A depressão acomete pessoas no mundo inteiro (322 milhões) (34), é a principal causa de incapacitação de indivíduos, sendo contribuinte para o suicídio, cerca de 800 mil por ano (1).

A prevalência de depressão no mundo é de 4,4% da população, nas américas, a prevalência é de 5,8 %, acometendo 11,5 milhões de pessoas. É uma doença com maior prevalência em mulheres (5,1%) comparado aos homens (3,6%), e ocorre em maior proporção na faixa etária entre os 55 e 74 anos de idade (1). No Brasil, o último relatório (volume 4) da Pesquisa nacional em saúde (PNS), divulgado em 2016 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), relata que a prevalência de depressão em 2013 foi de 7,6% (35), maior que a estatística mundial e de todo o continente americano.

Apesar de não haver um mecanismo fisiopatológico de depressão bem estabelecido (28), estudos demonstram o envolvimento de alguns sistemas neurobiológicos como a neurotransmissão monoaminérgica (28, 36).

Acredita-se que a redução da neurotransmissão de serotonina e noradrenalina possui papel predominante na fisiopatologia da depressão (37). De fato, estudos demonstraram que a redução da concentração de monoaminas (especificamente serotonina e noradrenalina) no sistema nervoso central pode conduzir à depressão (21). Pacientes em tratamento farmacoterapêutico apresentaram remissão da doença e naqueles com histórico familiar de depressão, há maior susceptibilidade de desenvolver a doença após a depleção desses neurotransmissores (38, 39).

Neurônios produtores de serotonina (5-HT) têm origem principalmente nos núcleos dorsal e mediano da rafe no tronco encefálico. A ativação de receptores 5-HT promove efeitos diversos, dependendo do tipo de receptor e local de expressão/ativação. Os receptores 5-HT1, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4 e 5-HT7 têm sido relacionados aos sintomas somáticos da depressão (37), que são sintomas corporais persistentes sem causas estruturais, orgânicas ou outra patologia, após avaliação por profissional de diagnóstico (40).

A sensibilidade de receptores inibitórios serotonérgicos como 5-HT1A, têm sido relacionada com o efeito de antidepressivos, sugere-se que receptores 5-HT1A pós-sinápticos (receptores inibitórios, que medeiam a liberação de 5-HT no sistema nervoso central) estejam dessensibilizados na depressão (21, 37). Além disso, auto receptores somatodendríticos 5-HT1A e aqueles localizados no terminal axônio do neurônio pré-sináptico (5-HT1B e 5-HT1D) podem estar

hipersensíveis à ligação com serotonina, limitando a neurotransmissão serotonérgica nos casos de depressão (21, 41).

Foi verificado que agonistas do receptor 5-HT1A (somatodendríticos e pós-sinápticos), por si só, não promoveram efeito antidepressivo (41), apesar de em estudo mais recente ser demonstrado que o agonista 5-HT1A (8-OH-DPAT) foi capaz de promover efeitos comportamental e neurogênese hipocampal semelhantes a antidepressivos (42). Ademais, estudos em camundongos expressão 5-HT1A transgênicos com menor de auto receptores (somatodendríticos), responderam melhor ao tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (43), sendo que tais antidepressivos (ISRS) não promoveram efeitos em camundongos que não expressam ambos os tipos de receptores 5-HT1A (auto receptores e póssináptico) (42). A deleção específica de receptores 5-HT1A pós-sinápticos no hipocampo reverteu o efeito de ISRS. Tais achados demonstram que receptores 5-HT1A, especificamente 5-HT1A pós-sináptico, pode ser um alvo terapêutico para tratamento da depressão (43, 44).

Os receptores 5-HT1B são auto receptores inibitórios do terminal axônio de neurônios serotonérgicos e não-serotonérgicos, reduzindo a liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central (21, 45, 46). Esses receptores têm sido relacionados com efeito crônico de antidepressivos, em que há menor expressão desse auto receptor no núcleo dorsal da Rafe (19, 47, 48). Todavia, estudos com antagonistas 5-HT1B sugerem um efeito ambivalente desse receptor, tendo em vista sua vasta distribuição pelo sistema nervoso central, uma vez que nem todo bloqueio desse receptor utilizando antagonista, promoveu efeito antidepressivo (21). Em pacientes depressivos, estudo *post mortem*

revelou menor concentração no cérebro da proteína p11, um importante sinalizador intracelular recrutado após a ativação do receptor 5-HT1B (49).

Receptores 5-HT2B, regulam a atividade de neurotransmissores na via mesocorticolimbica (50). O bloqueio de 5-HT2B por antagonistas aumenta a liberação de serotonina nessa via e, também, foi identificado RNAm para este receptor em interneurônios GABAérgicos no Núcleo Dorsal da Rafe, sugerindo que o receptor 5-HT2B exerce efeito inibitório em neurônios serotonérgicos na via mesocorticolimbica, via neurotransmissão GABAérgica (28).

Vítimas de suicídio têm aumento na expressão de receptores 5-HT2C no córtex pré-frontal (20), sugerindo que ativação desse receptores possa contribuir para depressão e ansiedade (21). Evidências demonstram que esse receptor pode estar envolvido no efeito ansiogênico de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (27). Receptores 5-HT3 aumentam a neurotransmissão sináptica de dopamina, serotonina e GABA, além de modular o eixo HPA, estresse oxidativo e plasticidade sináptica. Além disso, apesar de estarem amplamente distribuídos no sistema nervoso, podem se localizar em interneurônios inibitórios, e uma vez ativados, esses receptores estimulam a via inibitória sobre neurônios glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial, que por sua vez, não estimula neurônios no núcleo dorsal da Rafe, reduzindo a liberação de serotonina. Ambos receptores 5-HT2C e 5-HT3 culminam na redução da liberação de serotonina (28).

Receptores 5-HT4 são excitatórios e estão relacionados com a etiologia da depressão (51-55), tendo sua expressão aumentada em pacientes com depressão e vítimas de suicídio. Além disso, a concentração de 3'5'-adenosinamonofosfato-cíclico (APMc) é maior nesses indivíduos, demonstrando maior

ativação da via adenilil ciclase, possivelmente pela maior ativação de receptores 5-HT4 (52).

Os receptores 5-HT7 aumentam a expressão de receptores glicocorticóides em cultura de células do hipocampo (56). Em camundongos que não expressam esse receptor houve efeito tipo-antidepressivo e, também, antagonistas 5-HT7 promoveram uma resposta tipo-antidepressiva em ratos (21). O tratamento com amisulpride, um antagonista 5-HT7 promove efeito tipo-antidepressivo, que foi revertido em camundongos que não expressam esse receptor (57).

Os neurônios produtores de noradrenalina (NA) têm origem no *Locus Coeruleus* e, assim como a serotonina, promovem efeitos, de acordo com o receptor, que pode ser α ou β -adrenérgico e, seu respectivo local de expressão (40). Receptor adrenérgico subtipo α -2 (auto receptor inibitório) hipersensível em pacientes com depressão (58). Contudo, após o tratamento clássico para depressão com ISRS e inibidores atípicos, esses últimos que são antagonistas de auto receptores inibitórios de serotonina e também de noradrenalina, a taxa de remissão foi de 67 %, ou seja, aproximadamente 33 % dos pacientes não responderam efetivamente ao tratamento (59), sugerindo o envolvimento de outras vias, além da neurotransmissão monoaminérgica, na fisiopatologia da depressão.

Na depressão, a hiperatividade do eixo HPA é considerada o primeiro biomarcador (60). O nível aumentado de cortisol reduz a densidade de células da glia (61-64), ao mesmo tempo em que aumenta a concentração de glutamato plasmático e no líquido encefaloraquidiano em pacientes com transtorno depressivo. Isso demonstra uma correlação entre a severidade da depressão e

os níveis de glutamato (65-67). O antagonista de receptores de N-metil-Daspartato (NMDA) ketamina, promoveu efeito antidepressivo em paciente com depressão resistente a outros fármacos, evidenciando o envolvimento do glutamato no desenvolvimento de depressão (68-70), juntamente com o aumento de cortisol plasmático têm sido relacionado com a doença (71).

Foi identificado redução na neurotransmissão GABAérgica em pacientes depressivos (72-75), que após tratamento com ISRS retornou aos níveis normais, sugerindo que o efeito antidepressivo desses fármacos pode envolver o aumento da biodisponibilidade central do neurotransmissor GABA (76). Outro estudo verificou que o tratamento com ISRS aumenta a proliferação de neurônios inibitórios no córtex, sugerindo que a redução da atividade de interneurônios inibitórios GABAérgicos está envolvida no desenvolvimento da depressão (77, 78).

Tem sido demonstrado também, que pacientes com depressão apresentam redução de fatores neurotróficos e neurogênese hipocampal e como consequência, há redução do tamanho do hipocampo nesses pacientes (79) gerando déficit cognitivo e hiperatividade do eixo HPA (79-81). A restauração dessa disfunção, tem importante função na eficácia de antidepressivos (21). Os fatores mediadores da redução hipocampal, induzida por estresse, inclui a redução dos níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), ampla ativação de receptores NMDA e aumento de hormônio esteróide adrenal (82, 83).

3 HEMORFINAS

Hemorfinas são peptídeos derivados da hemoglobina e podem ser liberadas por meio de processos fisiológicos ou patológicos. Esses peptídeos foram identificados durante a purificação de citocrofinas, em sangue bovino hidrolizado por enzimas gastrointestinais. Nessa fração foram identificadas as hemorfina-4 e hemorfina-5 (84). A liberação de hemorfinas ocorre pela ação de diferentes enzimas proteolíticas como: prolil oligopeptidase, neurolisina, dipeptidil-peptidase IV (85), enzima conversora da angiotensina (86, 87), aminopeptidase M (87), catepsina D (88, 89), catepsina E (90), proteases lisossomais endógenas (91), pepsina (92, 93), elastase pancreática (94). As hemorfinas, foram assim denominadas tendo em vista sua atividade opióide e sequência de resíduos de aminoácidos (84). Foram descritas 12 hemorfinas que possuem em comum a sequência de quatro resíduos de aminoácidos correspondente a hemorfina-4 (Tyr-Pro-Trp-Thr) (Tabela 1) (95). As hemorfinas possuem alta estabilidade em tecidos (96) e plasma humano (97) in vitro. Contudo, hemorfinas podem ser degradadas no citosol das células do sistema renal in vitro (98), degradadas por catepsina B (88), dipeptidil peptidase IV (99), prolil oligopeptidase (98), neurolisina e endopeptidase (100).

Origem	Fragmento	Nomenclatura	Sequência de resíduos de aminoácidos
Hbβ	35-38	Hemorfina-4	Tyr-Pro-Trp-Thr
Hbβ	35-39	Hemorfina-5	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln
Hbβ	35-40	Hemorfina-6	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg
Hbβ	35-41	Hemorfina-7	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe
Hbβ	33-38	VV-Hemorfina-4	Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr
Hbβ	33-39	VV-Hemorfina-5	Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr -Gln
Hbβ	33-40	VV-Hemorfina-6	Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr -Gln-Arg
Hbβ	33-41	VV-Hemorfina-7	Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr -Gln-Arg-Phe
Hbβ	32-38	LVV-Hemorfina- 4	Leu-Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr
Hbβ	32-39	LVV-Hemorfina- 5	Leu-Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr- Gln
Hbβ	32-40	LVV-Hemorfina- 6	Leu-Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr -Gln-Arg
Hbβ	32-41	LVV-Hemorfina- 7	Leu-Val-Val- Tyr-Pro-Trp-Thr -Gln-Arg-Phe

Tabela 1. Peptídeos opióides endógenos atípicos derivados das cadeias βglobina da hemoglobina.

As hemorfinas pertencem a um grupo de substâncias endógenas com atividade opióide, classificadas como opióides endógenos átípicos. Esse grupo é formado por peptídeos derivado da hemoglobina e, também, derivados da βcaseína e citocromo-b mitocondrial, tendo em comum a sequência dipeptídica Tyr-Pro (95). A atividade sobre receptores opióides evoca antinocicepção (84, 93, 101). Além disso, as hemorfinas tem efeito de: agonista sobre o receptor órfão MRGPRX1 (102), que está envolvido na percepção da dor e coceira (103-105); inibição da resposta inflamatória aguda (106); degranulação em mastócitos independente de IgE e estimulação da liberação de quimiocinas (107, 108). As hemorfinas também possuem atividade sobre o sistema nervoso central (109), induzindo a liberação *in vitro* de β -endorfinas centrais (95); inibição da degradação de encefalina (110). Efeitos periféricos também foram identificados por promover vasoconstrição das artérias coronarianas (111); modulam a atividade de enzimas dependentes do complexo cálcio-calmodulina (112); inibem a atividade enzima conversora de angiotensina (ECA) (96); potencialização da bradicinina (113); inibição da micção espontânea induzida por reflexo de volume (109); agonismo de baixa afinidade por receptores bombesina subtipo 3 (114); redução dos níveis de RNAm de claudina-4 em células de modelo intestinal (Caco-2) (115); além disso é possível que as hemorfinas alterem a tumorigênese cerebral, já que o gene que expressa β -globina reside na região cromossômica 11p15.5, de importantes genes de imunidade e genes relacionados a cânceres e gliomas (116). Somado a isso, as hemorfinas podem estar envolvidas na patogênese da esclerose múltipla, uma vez que nessa condição há um desequilíbrio entre a hemoglobina intracelular expressa em neurônios e a hemoglobina livre (117).

A identificação de fragmentos de hemoglobina em diversos órgãos permite sugerir que há uma clivagem enzimática tecidual contínua (110, 118). A liberação de hemorfinas pode ocorrer durante e depois do exercício físico, assim como das β-endorfinas, podendo ser responsável direta ou indiretamente pela analgesia e euforia geradas (95). Somado a isso, Song et al (2013) sugerem que hemorfinas podem ser liberadas após acupuntura, podendo também ser reabsorvidas e promover seus efeitos biológicos (119). Lesões hepáticas causadas por injeções i.p. de tunicamicina em ratos, reduzem o metabolismo de hemoglobina e, portanto, diminuem a liberação desses peptídeos opióides (120). Além da produção hepática citada anteriormente, o hipotálamo, a medula óssea e o cérebro, são considerados importantes origens de hemorfinas (121). Somado a isso, existem evidências do aumento no nível de hemorfinas no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (122). Em pacientes obesos com diabetes tipo 2, os níveis séricos de VV-h7 são baixos (123), indicando que há

possibilidade de que alterações na concentração de hemorfinas estariam relacionadas com essas doenças. As hemorfinas, portanto, são peptídeos que fazem parte do novo sistema de regulação peptidérgica, sugerido por Karelin et. al. (1998) (124). Em consonância à isso, os resultados de Cruz e colaboradores (2016) permitem sugerir que as hemorfinas sejam classificadas como neuropeptídeos não clássicos (125), um conceito inicialmente proposto por Gelman e Fricker (2010), que se refere a derivados de proteínas intracelulares que foram degradadas pela ação de proteases (126).

3.1 LVV-HEMORFINA-6 (LVV-h6)

LVV-hemorfina-6 (LVV-h6) é uma hemorfina formada por uma sequência de nove resíduos de aminoácidos, que correspondem ao fragmento 32-40 da β-globina humana (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg). Essa hemorfina é produto da ação de enzimas tipo-quimotripsina. Além de ter sido isolada e identificada na glândula pituitária de humanos (14 μg/glândula) por Glamsta e cols (101), também está presente em pulmão e coração de indivíduos saudáveis (127), em células de hepatocarcinoma de pacientes (128) e no cérebro de portadores da doença de Alzheimer, onde é encontrada em concentrações aumentadas (122).

Existem poucas pesquisas sobre LVV-h6, mas sabe-se que essa hemorfina exerce atividade opióide por agir em receptores μ - e σ -opióides (101), Sua degradação, por sua vez, é feita por enzimas presentes no extrato de pulmão (com exceção da enzima ECA) cujo produto da catálise é a LVV- h4. Este mesmo estudo demonstrou que, apesar de não sofrer efeito catalítico pela

ECA, a LVV-h6 é capaz de inibir tal enzima *in vitro* (96). Além disso, LVV-h6 exerce efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo (125).

3.2 LVV-HEMORFINA-7 (LVV-h7)

LVV-hemorfina-7 é um peptídeo derivado da hemoglobina, formado por dez resíduos de aminoácidos. Corresponde ao fragmento 32-41 da β-globina humana (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) (95, 97, 129). Essa hemorfina é obtida pela ação catalítica de diferentes enzimas como: enzimas tipo-quimiotripsina (118), proteinase aspártica (90), catepsina D e L (91). A LVV-h7 é encontrada no sangue hidrolisado (93) e no plasma de pacientes submetidos a hemofiltração (130). Pacientes com hemorragia cerebrovascular apresentam níveis elevados de LVV-h7 no fluído cérebro-espinhal (118). Por outro lado, pacientes obesos com diabetes tipo-2 apresentam os níveis séricos diminuídos de LVV-h7 (123, 131). LVV-h7 também foi identificada em tecidos como pulmão e coração (127), cérebro (132), em especial no hipotálamo (133) e no córtex e medula adrenal (134).

Essa hemorfina é degradada *in vivo* por enzimas proteolíticas do fluído extracelular no *striatum* e no sangue de ratos (129). Apesar de estudos *in vitro* mostrarem que LVV-h7 tem alta estabilidade no plasma e tecidos humanos (96, 97), o decapeptídeo pode ser hidrolizado pela ação da aminopeptidase M (87) e ECA (87, 135).

LVV-h7 atravessa a barreira hemato-encefálica (136) e promove efeitos como aumento da aprendizagem espacial (137-140), pelo aumento da neurotransmissão colinérgica (141) e, também tem efeitos antinociceptivo (85)

anti-hiperalgésico (142) através da ligação em diferentes receptores opióides (85, 93, 142). O efeito antinociceptivo da LVV-h7 é mais potente quando comparado a outras hemorfinas como, por exemplo, a LVV-h6 (93).

LVV-h7 modula o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) por reduzir o aumento plasmático de Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNFα) e de corticoesterona evocados pelo estresse metabólico induzido por endotoxina (lipopolissacarídeo) (135). Essa hemorfina exerce atividade agonista de baixa afinidade em receptores bombesina subtipo 3, que estão envolvidos no crescimento do câncer de pulmão (114) e está presente no fluído broncoalveolar de pacientes com câncer de pulmão de pequenas células (143). Adicionalmente, a LVV-h7 reduz a atividade de calcineurina (135), enzima primordial na ativação de linfócitos T (136), modula a regulação de sinapses e liberação de neurotransmissores como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), dopamina (DA), glutamato (GLUT), liberação de neuropeptídeos e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (144-146).

Além disso, LVV-h7 exerce atividade agonista sobre o receptor de angiotensina IV (AT4) (136, 147), promovendo os mesmos efeitos cognitivos da angiotensina IV (137-139). Além de ser agonista deste receptor, a LVV-h7 inibe a atividade do domínio catalítico desse receptor, que também é uma aminopeptidase de membrana (Insulin-regulated aminopeptidase - IRAP) (148, 149). Experimentos *in vitro* detectaram que a atividade peptidase de AT4/IRAP é constitutiva e que ligantes desse receptor são capazes de inibir essa atividade catalítica, reduzindo a degradação de diferentes peptídeos como vasopressina, angiotensina III e ocitocina (148, 150-152). *In vivo,* a inibição da IRAP resultou em aumento nos níveis de ocitocina (OT) no núcleo central da amígdala (153),
regulando as concentrações centrais desse hormônio (152). Em estudo recente do nosso laboratório, foi verificado que LVV-h7 promove efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo, sendo este último dependente da ativação de receptores de ocitocina, possivelmente pelo aumento da biodisponibilidade central de OT como resultado da inibição de sua degradação pela atividade ocitocinase de AT4/IRAP (154). Recentemente foi verificado o efeito antialodínio de LVV-h7, possivelmente pela inibição da atividade ocitocinase, tendo em vista que injeções de ocitocina promoveram o mesmo efeito (155).

LVV-h6 e LVV-h7 promovem efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo, sendo o efeito tipo-antidepressivo de LVV-h7, dependente da ativação de receptores de ocitocina (125), possivelmente pelo aumento da biodisponibilidade central de OT como resultado da inibição de sua degradação pela atividade ocitocinase de AT4/IRAP (154).

Adicionalmente, a administração endovenosa de LVV-h7 promove efeitos simpatomiméticos de curta duração, sobre a frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) de ratos Sprague-Dawley (SD) anestesiados e vagotomizados (no intuito de reduzir o reflexo barorreceptor) (156). Já a administração intraperitoneal não alterou esses parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) de ratos normotensos Wistar-Kyoto (WK) conscientes. No entanto, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram observados efeitos pressor e taquicárdico nos vinte minutos iniciais, seguidos por redução de PAM e FC nos oitenta minutos subsequentes (157). Adicionalmente, LVV-h7 potencializa os efeitos da bradicinina *in vivo* (113) e tem atividade inibidora não competitiva sobre a ECA, podendo desempenhar função importante sobre Sistema Renina

Angiotensina (SRA) (86) (158). Entretanto, a LVV-h7 não promoveu alterações na PAM e na resistência vascular renal, bem como não alterou o fluxo sanguíneo renal e não induz natriurese em ratos normotensos WK anestesiados (171).

LVV-h7 potencializa os efeitos da bradicinina *in vivo* (113) e tem atividade inibidora não competitiva sobre a ECA, podendo desempenhar função importante sobre Sistema Renina Angiotensina (SRA) (86, 158). Entretanto, a LVV-h7 não promoveu alterações na PAM e na resistência vascular renal, bem como não alterou o fluxo sanguíneo renal e não induz natriurese em ratos normotensos WK anestesiados (171).

Os dados na literatura acerca do efeitos cardiovasculares evocados pela LVV-h7, são controversos e não há estudos dos efeitos de LVV-h6 sobre esse sistema fisiológico, apesar de outros efeitos serem similares entre essas hemorfinas (86, 96, 101) como descrito acima. Diante disso, torna-se importante avaliar LVV-h6 e LVV-h7 promovem efeitos sobre a vasomotricidade e função cardíaca, a fim de verificar se são capazes de desempenhar efeitos diretamente sobre anéis de aorta e coração isolado de ratos. Somado a isso, e tendo em vista os efeitos de LVV-h6 e LVV-h7 sobre o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão (125), é relevante investigar vias potencialmente envolvidas nesses efeitos.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos sobre o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão e avaliar os efeitos sobre a função cardíaca e vasomotricidade de ratos dos peptídeos derivados da hemoglobina: LVV-h6 e LVV-h7.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o envolvimento do sistema catecolaminérgico diante dos efeitos sobre o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão promovidos LVV-h6 e LVV-h7;
- Avaliar o envolvimento do sistema opióide nos efeitos sobre o comportamento tipo ansiedade e tipo-depressão promovidos LVV-h6 e LVV-h7;
- Verificar o efeito de LVV-h6 e LVV-h7 sobre a função cardíaca de ratos;
- Verificar o efeito de LVV-h6 e LVV-h7 sobre a vasomotricidade de ratos.

Metodologia

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar pesando entre 250-350g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os procedimentos que envolveram animais e seus cuidados foram conduzidos de acordo com Gilles et al.1987 (159). Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas de uso de animais, sob aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais da UFG (Protocolo de aprovação nº 090/14). Os animais foram alojados em gaiolas individuais (47 cm x 31 cm x 16 cm) em salas climatizadas (temperatura entre 22-24 °C) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e com livre acesso (*ad libitum*) à água e ração. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento.

5.2 FÁRMACOS

No protocolo de comportamento tipo-ansiedade e atividade locomotora/exploratória foi utilizado Diazepam (DZP) (medicamento genérico -Neo química, Goiás/Brasil), um benzodiazepínico, agonista do receptor GABAA, na dose de 2 mg/Kg diluído em salina isotônica estéril como controle positivo (160, 161). No protocolo de comportamento tipo-depressão foi utilizado Imipramina (IMI) - Trofanil® (Novartis, SP/Brasil), um antidepressivo tricíclico, que inibe a receptação de monoaminas, na dose de 15 mg/Kg diluído em salina isotônica estéril como controle positivo (162). Foi utilizado salina isotônica (NaCI

0,9%) (HalexIstar, Goiás/Brasil) como controle negativo (0,1 mL protocolos comportamentais) e veículo (protocolo comportamentais e *ex vivo*; LVV-h6 e LVV-h7 (GenOne, Brasil) na dose de 153 nMol/Kg, baseada em estudo realizado por lanzer (2006) (113). Inibidor da enzima tirosina hidroxilase, alfa-metil-p-tirosina (AMPT – Sigma, St. Louis MO, USA) foi utilizado na dose de 200 mg/Kg (163) para verificar o envolvimento da via catecolaminérgica. O antagonista de receptores opióides, naltrexona (NTX) foi utilizado na dose de 0,3 mg/Kg s.c.) (164) para verificar se a via opióide está envolvida nos efeitos evocados pela LVV-h6 e LVV-h7.

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Protocolo	Grupo	Veículo/Fár macos	Veículo/Drogas (volume ou dose e via de administração	Injeção prévia	Injeção prévia (dose e via de administração)	n
Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e Campo Aberto (CA)	G1	Veículo	0,1 mL i.p.	-		9
	G2	Diazepam	2 mg/Kg i.p.	-		7
	G3	LVV-h6	153 nMol/Kg i.p.	-		10
	G4	LVV-h7	153 nMol/Kg i.p.	-		7
	G5	Veículo	0,1 mL i.p.	AMPT	200 mg/Kg i.p.	7
	G6	LVV-h6	153 nMol/Kg i.p.	AMPT	200 mg/Kg i.p.	7
	G7	LVV-h7	153 nMol/Kg i.p.	AMPT	200 mg/Kg i.p.	10
	G8	Veículo	0,1 mL i.p.	NTX	0,3 mg/Kg s.c.	6
	G9	LVV-h6	153 nMol/Kg i.p.	NTX	0,3 mg/Kg s.c.	6
	G10	LVV-h7	153 nMol/Kg i.p.	NTX	0,3 mg/Kg s.c.	7
Nado forçado (NF)	G11	Veículo	0,1 mL i.p.	-	-	7
	G12	Imipramina	15 mg/Kg i.p.	-	-	6
	G13	LVV-h6	153 nMol/Kg i.p.	-	-	7
	G14	LVV-h7	153 nMol/Kg i.p.	-	-	6
	G15	Veículo	0,1 mL	AMPT	200 mg/Kg i.p.	7

Quadro 1. Grupos experimentais. i.p. = intraperitoneal; i.v. = intravenoso; n = número de animais no grupo.

			i.p.			
Técnica de Langendorff com fluxo constante	G16	LVV-h6	153 nMol/Kg i.p.	AMPT	200 mg/Kg i.p.	6
	G17	LVV-h7	153 nMol/Kg i.p.	AMPT	200 mg/Kg i.p.	5
	G18	Veículo	0,1 mL i.p.	NTX	0,3 mg/Kg s.c.	6
	G19	LVV-h6	153 nMol/Kg i.p.	NTX	0,3 mg/Kg s.c.	6
	G20	LVV-h7	153 nMol/Kg i.p.	NTX	0,3 mg/Kg s.c.	6
	G21	LVV-h6	1 nMol/L ex vivo	-	-	6
	G22	LVV-h7	1 nMol/L <i>ex vivo</i>	-	-	6
Técnica de vaso isolado	G23	LVV-h6	Concentrações crescentes (10 ⁻¹⁰ M, 3x10 ⁻¹⁰ M, 10 ⁻⁹ M, 3x10 ⁻⁹ M, 10 ⁻⁸ M) <i>ex vivo</i>	-	-	6
	G24	LVV-h7	Concentrações crescentes (10 ⁻¹⁰ M, 3x10 ⁻¹⁰ M, 10 ⁻⁹ M, 3x10 ⁻⁹ M, 10 ⁻⁸ M) <i>ex vivo</i>	-	-	6

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos protocolos de avaliação comportamental (LCE, CA e NF) foi adotado o método de exclusão como média ± DPM (Desvio Padrão da Média). Os animais que foram excluídos em 50% ou mais dos parâmetros comportamentais avaliados, foram excluídos do respectivo protocolo experimental (154). Todos os resultados foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média). Os resultados da avaliação comportamental foram analisados utilizando análise de variância (One-way ANOVA) seguido de pós-teste Tukey. Para as análises dos experimentos de coração isolado foi utilizado análise de variância (Two-way ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett e para resultados da técnica de vaso isolado foi utilizada pós-teste de Sidak. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, Inc.).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p <0,05.

5.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE E ATIVIDADE LOCOMOTORA/EXPLORATÓRIA.

5.5.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Para avaliação do efeito tipo ansiedade foi utilizado o protocolo de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de acordo com o método descrito por Pinheiro e cols. 2007 (165). O LCE é um aparelho constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm), sem paredes laterais, perpendiculares a dois braços fechados de mesma dimensão, circundados por paredes laterais de 40 cm de altura. Uma pequena parede de 1 cm de altura encontra-se acoplada ao redor dos braços abertos, a fim de evitar a queda dos animais do equipamento, que é elevado 50 cm do solo (Figura 1). Os animais receberam injeções i.p de LVV-h7 ou LVV-h6 ou veículo (salina 0,9% controle negativo) ou diazepam (2 mg/Kg controle positivo). Os ratos foram colocados individualmente na plataforma central do labirinto (com a cabeça direcionada para um dos braços fechados) após 30 minutos da injeção de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo e ficaram livres para explorar o aparelho por 5 minutos. Uma câmera de vídeo foi fixada acima do LCE para filmar o comportamento. Os experimentos foram filmados e após cada sessão, o LCE foi limpo (álcool 10%) para evitar interferência de pistas olfativas. Posteriormente, os vídeos foram analisados e foram mensurados o número de entradas nos braços abertos e fechados e, também, o tempo despendido nos braços abertos e braços fechados, o número total de entradas (soma de entradas

nos braços abertos e braços fechados) e o tempo na plataforma central do LCE (análise de risco) (Figura 3A).

Para verificar o envolvimento da via catecolaminérgica, foi injetado AMPT (200 mg/Kg i.p.) 1 hora antes de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo (Figura 3B). Para avaliar se a via opióide está envolvida nos efeitos das hemorfinas sobre esse comportamento, foi injetado NTX (0,3 mg/Kg s.c.) 10 minutos antes de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo (Figura 3C).



Figura 1: Foto representativa do modelo experimental Labirinto em Cruz Elevada (LCE).

5.5.2 Campo aberto (CA)

A avaliação da atividade locomotora e exploratória foi realizada de acordo com Moreira e cols (2005) (166). Os animais foram colocados individualmente no campo aberto (CA), imediatamente após a exploração no LCE (Figura 3). O CA é dividido em quadrantes (23 cm x 15,5 cm) (Figura 2). Uma câmera de vídeo foi fixada acima do campo para filmar o comportamento do rato. Os ratos foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto e ficaram livres para explorar o aparelho por 5 minutos (Figura 3). Após cada sessão o CA foi limpo (álcool 10%) para evitar interferência de pistas olfativas. Posteriormente, os filmes foram analisados e avaliados os seguintes parâmetros: cruzamentos, autolimpeza, levantadas, tempo de imobilidade, tempo no centro e tempo na periferia do CA



Figura 2: Foto representativa do modelo experimental do Campo Aberto (CA).

5.5.3 Sequência experimental

Os animais pertencentes aos grupos experimentais G1, G2, G3 e G4 (tratados com veículo (NaCl 0,9%), diazepam, LVV-h6 ou LVV-h7, respectivamente), ficaram em ambientação na sala de experimentos por uma hora, em seguida, receberam injeções i.p. de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo. Trinta minutos depois foram submetidos a avaliação comportamental. Os ratos foram inicialmente submetidos a exploração no LCE durante cinco minutos e, em seguida, foram colocados no CA e ficaram livres para explorar esse aparato também por cinco minutos (Figura 3A). Após exploração no CA o rato foi devolvido para sua gaiola de origem. Os animais dos grupos experimentais G5, G6 e G7 receberam injeções i.p. de AMPT (200 mg/Kg) 1 hora antes de receberem a injeção i.p. de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo (Figura 3B). Os animais dos grupos experimentais G8, G9, G10 receberam injeções s.c. de NTX (0,3 mg/Kg) 10 minutos antes da injeção de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo (Figura 3C).



Figura 3: Representação esquemática da sequência experimental para verificar o envolvimento das vias catecolaminérgicas e opióide no efeito tipo-ansiolítico e na atividade de locomoção/exploração promovidos pela LVV-h6 e LVV-h7.

5.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSÃO

Para avaliação do efeito tipo antidepressivo o protocolo experimental de nado forçado (NF) foi adaptado do modelo proposto originalmente por Porsolt e colaboradores (1977) (167). Os ratos foram colocados individualmente dentro de um cilindro de PVC (Polyvinyl Chloride) de 24 cm de diâmetro por 60 cm de altura, preenchido por uma coluna d'água de 42 cm de altura, à temperatura de 25±1 °C (Figura 4). A avaliação do efeito tipo-antidepressivo em ratos requer exposição prévia dos animais ao nado forçado (168). Então, o protocolo ocorre em dois dias (Figura 5). No primeiro dia, os ratos ficaram em ambientação durante 60 minutos na sala de experimentação e, em seguida, foram individualmente submetidos à ambientação do teste (pré-teste) permanecendo no cilindro de PVC por 15 minutos. Em seguida foram secos com auxílio de uma toalha e aquecidos durante 15 minutos, após esse período, foi administrada a primeira injeção de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo (figura 5A) e, então os animais foram devolvidos à gaiola de origem.

No segundo dia de experimento, a segunda injeção LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo foi administrada 5 horas antes do teste. A terceira (última injeção) de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo foi administrada 1 hora antes do teste (Figura 5A). O teste foi realizado 24 horas após a primeira injeção (após 15 minutos de secagem) e teve duração de 6 minutos (Figura 5A). O comportamento dos ratos no interior do cilindro foi filmado por uma câmera. Após cada sessão, a água do cilindro foi trocada e o cilindro foi higienizado com solução álcool 10%, para evitar interferência de pistas olfativas. Somente nos últimos 4 minutos, da filmagem de

cada rato, foi mensurado o tempo de imobilidade, caracterizado por pequenos movimentos das patas em que o animal manteve a cabeça fora d'água (162).



Figura 4: Desenho representativo do modelo experimental de Nado forçado. Adaptado de Abelaira (2013) (169).

5.6.1 Sequência experimental

Os animais pertencentes aos grupos experimentais G11, G12, G13 e G14 (tratados com veículo (NaCl 0,9%), imipramina, LVV-h6 ou LVV-h7, respectivamente), ficaram em ambientação na sala de experimentos por uma hora, em seguida, receberam injeções i.p. de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo 24, 5 e 1 hora antes do teste, como descrito anteriormente (Figura 5A). Os animais dos grupos G15, G16 e G17 receberam injeções i.p. de AMPT (200 mg/Kg) 1 hora antes da última injeção i.p. de LVV-h6 ou LVV-h7 ou veículo para avaliação do envolvimento da via catecolaminérgica (Figura 5B). E os animais dos grupos experimentais G18, G19, G20 receberam injeções s.c. de NTX (0,3 mg/Kg) 10 minutos antes de receberem a última injeção de LVV-h6, LVV-h7 ou veículo (Figura 5C), para avaliação do envolvimento da via opióde.



Figura 5: Representação esquemática da sequência experimental para avaliar o envolvimento das vias catecolaminérgicas e opióide no efeito tipo-antidepressivo promovido pela LVV-h6 e LVV-h7.

5.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA EM CORAÇÃO ISOLADO DE RATOS.

Para avaliação da função cardíaca *ex-vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com Fluxo constante ($10 \pm 2 \text{ mL/min}$; $37 \pm 1^{\circ}$ C) (172). Os animais foram eutanasiados por decaptação 10 minutos após serem heparinizados (400 µL). A cavidade torácica foi aberta e o coração retirado e colocado em um béquer com solução rica em nutrientes (aproximadamente 4° C). Esse resfriamento é primordial a fim reduzir o metabolismo do miocárdio, antes de ser conectado ao sistema de perfusão. Em seguida, o coração foi posicionado sobre uma placa de Petri para remoção dos possíveis tecidos adjacentes que tenham sido removidos junto com o coração. A artéria aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutritiva de Krebs Ringer (composição em nMol/L: NaCl 118,41; KCl 4,69; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄.7H₂O 1,17; CaCl_{2.2}H₂O 1,25; Dextrose Anidra (Glicose) 11,65; NaHCO₃ 26,24). A solução de perfusão foi mantida a 37 \pm 1° C e saturada com solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂).

Um transdutor de pressão (MLT0699 Adinstruments®) foi conectado à via de perfusão com o objetivo de registrar as variações da pressão de perfusão mediante a reatividade das coronárias. Um balão, preenchido com água e conectado a um transdutor de pressão (MLT0699 Adinstruments®), foi introduzido no ventrículo esquerdo através de uma incisão no átrio esquerdo, para a medição da pressão intraventricular.

Após um período de estabilização de aproximadamente 20-30 minutos, os corações isolados foram submetidos à perfusão com 1 nm/L de LVV-h6 ou LVVh7 durante 30 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Pressão de perfusão (PP), Pressão Intraventricular Sistólica (PIVS), dP/dt máx, dP/dt mín, Pressão Intraventricular Diastólica (PIVD) e frequência cardíaca (FC).

5.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA ISOLADOS

Para avaliar os efeitos da LVV-h6 e LVV-h7 sobre a reatividade vascular foi realizada a técnica de vaso isolado (173) (Figura 9). Os animais foram eutanasiados por decapitação e então, a cavidade torácica foi aberta para a remoção de todo o tecido extra-aórtico, assim como do tecido adiposo. A artéria aorta torácica foi extraída do animal e então colocada em uma placa de petri contendo solução Krebs-Henseleit aquecida. Em seguida, o vaso foi cortado em anéis de 4 mm. Os anéis foram colocados em cubas contendo 9 mL de solução de Krebs-Henseleit em temperatura de 37 ± 1° C. (composição em nM/L: NaCL 6,90 g; KCL 0,350 g; KH₂PO₄ 0,160 g; MgSO₄ 0.30 g; C₆H₁₂O₆ 2,0 g; NaHCO₃ 2,10 g; CaCL₂ 0,370 g; oxigenada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os anéis foram mantidos sob uma tensão de 1.5 g, durante 1 hora para se estabilizarem. A atividade mecânica foi registrada isometricamente usando um sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments). A presença de endotélio funcional foi avaliada pela porcentagem de relaxamento induzido pela acetilcolina (1,0 μM) nos vasos pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µM). Os vasos foram considerados com endotélio viável quando a acetilcolina gerou relaxamento maior que 80%.



Figura 6: Representação esquemática de uma preparação de anel de aorta em banho de órgãos isolados. Fonte: adaptado de YILDIZ et al., (2013) (174).

Após o teste de endotélio, para avaliar os efeitos das hemorfinas sobre a reatividade vascular, os anéis de aorta foram incubados com concentrações crescentes de LVV-h6 e LVV-h7 (Quadro 1) em condições basais. A avaliação do possível efeito vasorrelaxante das hemorfinas foi realizada a partir da précontração com fenilefrina 10⁻⁷ e, em seguida, concentrações crescentes de LVV-h6 ou LVV-h7 foram adicionadas.

RESULTADOS

6 **RESULTADOS**

Os resultados obtidos na avaliação do comportamento tipoansiedade e tipo-depressão da presente tese estão compilados nos artigos publicados (ver anexos 1 e 2).

6.1 Avaliação do envolvimento da via catecolaminérgica e opióide no efeito tipo-ansiolítico promovido pela LVV-h6 e LVV-h7

Segundo estudos anteriores (125), LVV-h6, LVV-h7 e diazepam (controle positivo) aumentaram o tempo nos braços abertos (LVV-h6 = 49 ± 9 segundos; LVV-h7 = 63 ± 6 segundos; diazepam = 74 ± 9 segundos vs veículo = 10 ± 5 segundos), aumentaram o número de entradas nos braços abertos (LVV-h6 = 4 ± 1 ; LVV=h7 = 5 ± 1 ; diazepam = 6 ± 1 ; vs. veículo = 1 ± 1) e reduziram o tempo nos braços fechados (LVV-h6 = 193 ± 12 segundos; LVV-h7 = 175 ± 8 segundos; diazepam = 185 ± 10 segundos; vs. veículo = 222 ± 10 segundos) (Figura 6A, 6C e 6B, respectivamente).

O tempo despendido no centro do LCE não foi alterado no grupo que recebeu injeção de LVV-h6 (54±6 segundos vs. veículo = 62±6 segundos) ou LVV-h7 (63±3 segundos vs. veículo = 62±6 segundos), mas foi reduzido no grupo Diazepam (controle positivo) (40±4 segundos vs. veículo = 62±6 segundos) (Figura 6E). Esses resultados demonstram que as hemorfinas LVV-h6 e LVV-h7 alteram o comportamento tipo-ansiedade, promovendo efeito tipo-ansiolítico e, esses resultados estão em acordo com aqueles encontrados no CA: ambas

hemorfinas avaliadas aumentaram o tempo despendido no centro do CA (LVVh6 = 12 ± 2 segundos; LVV-h7 = 11 ± 1 segundos; vs. veículo = 5 ± 1 segundos) e reduziram o tempo na periferia do CA (LVV-h6 = 288 ± 2 segundos; LVV-h7 = 288 ± 1 segundos; vs. veículo = 295 ± 1 segundos) (125) (Figura 7A e 7B).

O número de entradas nos braços fechados e número total de entradas (entradas nos braços abertos e fechados do LCE) estão relacionados à locomoção no LCE (170), os quais não foram alterados pela LVV-h6 (LVV-h6 = 7±1; vs. veículo 6±1; e LVV-h6 = 11±1; vs. veículo = 8±1, respectivamente) e LVV-h7 alterou somente o número total de entradas (LVV-h7 = 13±1; vs. veículo = 8±1) (Figura 6D e 6F). No campo aberto, LVV-h6 não alterou cruzamentos $(LVV-h6 = 15\pm1; vs. veículo = 14\pm1)$, imobilidade $(LVV-h6 = 48\pm11 segundos; vs.$ veículo = 84 ± 15 segundos), levantadas (LVV-h6 = 11 ± 1 ; vs. veículo = 7 ± 1) e autolimpeza (LVV-h6 = 4 ± 1 ; vs. veículo = 3 ± 1) (Figura 7C, 7D, 7E e 7F, respectivamente). Contudo LVV-h7 aumentou o número de cruzamentos (LVV $h7 = 20\pm2$; vs. veículo = 14\pm1), levantadas (LVV-h7 = 14\pm2; vs. veículo = 7\pm1) e autolimpeza (LVV-h7 = 6 ± 1 ; vs. veículo = 3 ± 1) (Figura 8C, 8E e 8F) e reduziu o tempo de imobilidade (LVV-h7 = 20 ± 10 segundos; vs. veículo = 84 ± 15 segundos) (Figura 7D). Diazepam não alterou o número de cruzamento (diazepam = 14 ± 3 ; vs. veículo = 14 ± 1) e o tempo de imobilidade no CA (diazepam = 92 ± 26 segundos; vs. veículo = 84±15 segundos) (Figura 7C e 7D) (125). Juntos esses resultados indicam que LVV-h6 não alterou a locomoção/exploração, mas LVVh7 aumentou esse comportamento em ratos.

Os efeitos evocados pela LVV-h6 e LVV-h7 e sua relação com a via catecolaminérgica são mostrados na figura 6 e 8 e descritos a seguir. A inibição da biossíntese de catecolaminas por AMPT (200 mg/kg) potencializou o

aumento, promovido pela LVV-h6, no tempo nos braços abertos do LCE (AMPT + LVV-h6 = 97 ± 12 segundos; vs. LVV-h6 = 49 ± 9 segundos) e a redução no tempo nos braços fechados no LCE (AMPT + LVV-h6 = 145±11 segundos; vs. LVV-h6 = 193±12 segundos). Entretanto, a inibição por AMPT, não alterou o tempo nos braços abertos (AMPT + LVV-h7 = 44±8 segundos; vs. LVV-h7 = 63±6 segundos) e reverteu a redução no tempo nos braços fechado promovidos pela LVV-h7 (AMPT +LVV-h7 = 223 ± 11 segundos; vs. LVV-h7 = 175 ± 8 segundos) (Figura 6A e 6B). A administração prévia de AMPT não alterou o aumento no número de entradas nos braços abertos do LCE evocado pela LVV-h6 (AMPT + LVV-h6 = 5 ± 1 ; vs. LVV-h6 = 4 ± 1), contudo, reverteu o aumento do número de entradas nos braços abertos promovido pela LVV-h7 (AMPT + LVV-h7 = 2 ± 1 ; vs. LVV-h7 = 5 ± 1) (Figura 6C). O tempo no centro e periferia do CA (Figura 7A e 7B), evocado por ambas hemorfinas (LVV-h6 e LVV-h7) não foi alterado pela injeção prévia de AMPT (tempo no centro CA: AMPT+LVV-h6 = 13±2 segundos; vs. LVV-h6 = 12±2 segundos; AMPT +LVV-h7 = 10±1 segundos; vs. LVV-h7 = 12±1 segundos; tempo na periferia CA: AMPT+LVV-h6 = 287±2 segundos; vs. LVV-h6 = 288±2 segundos; AMPT+LVV-h7 = 290±1 segundos; vs. LVV-h7 = 288±1 segundos). O tempo no centro do LCE não foi alterado pelas hemorfinas $(LVV-h6 = 55\pm 6 \text{ segundos}; LVV-h7 = 63\pm 3 \text{ segundos}; \text{ vs. veículo} = 62\pm 6$ segundos;), e essa resposta não foi alterada pelo AMPT quando administrado previamente à injeção de LVV-h6 (AMPT+LVV-h6 = 59±7 segundos; vs. LVV-h6 = 55±6 segundos), mas foi menor no grupo que recebeu AMPT+LVV-h7 $(AMPT+LVV-h7 = 34\pm 5 \text{ segundos}; \text{ vs. } LVV-h7 = 63\pm 4 \text{ segundos})$ (Figura 6E). Esses resultados demonstram que a via catecolaminérgica não é responsável pelo efeito tipo-ansiolítico promovidos pela LVV-h6 e LVV-h7 mas pode estar envolvida no aumento da atividade locomotora/exploratória evocado pela LVVh7, por reverter o aumento do número de entradas nos braços abertos e número total de entradas.

A injeção prévia com AMPT não alterou a resposta evocada pela LVV-h6 nos parâmetros que avaliam a locomoção no LCE (entradas nos braços fechados AMPT+LVV-h6 = 5 ± 1 vs. LVV-h6 = 7 ± 1 ; e total de entradas AMPT+LVV-h6 = 10±1 vs. LVV-h6 = 10±1) (Figura 6D e 6F). Além disso, AMPT não alterou o número de cruzamentos (AMPT+LVV-h6 = 18 ± 2 vs. LVV-h6 = 15 ± 1), tempo de imobilidade (AMPT+LVV-h6 = 49 ± 13 segundos vs. LVV-h6 = 48 ± 11 segundos) e levantadas (AMPT+LVV-h6 = 7 ± 1 vs. LVV-h6 = 10 ± 1) no CA evocados pela LVV-h6 (Figura 7C, 7D e 7E, respectivamente). Entretanto, o aumento no número de cruzamentos promovido pela LVV-h7, foi completamente revertido pela injeção prévia com AMPT (AMPT+LVV-h7 = 14 ± 1 vs. LVV-h7 = 20 ± 2) (Figura 7C), somado a isso, o aumento promovido pela LVV-h7 no número de autolimpeza também foi revertido pelo AMPT (AMPT+LVV-h7 = 3±1 vs. LVV-h7 = 5±1) e, curiosamente, reduziu a resposta evocada pela LVV-h6 nesse parâmetro (AMPT+LVV-h6 = 1 ± 1 segundos vs. LVV-h6 = 4 ± 1 segundos) (Figura 7F). Somente LVV-h7 e não LVV-h6, aumentou a locomoção e atividade exploratória de ratos. Os resultados demonstram que a via catecolaminérgica pode estar envolvida nesse efeito evocado pela LVV-h7.



Figura 7: Avaliação do envolvimento da via de catecolaminas e opióide no efeito tipo-ansiolítico de LVV-h6 e LVV-h7 em ratos. A: Tempo despendido nos braços abertos; B: Tempo despendido nos braços fechados; C: Entradas nos braços abertos; D: Entradas nos braços fechados; E: Tempo despendido no centro do LCE; F: Total de entradas. AMPT: alfametil-p-tirosina. NTX: Naltrexona. Valores expressos como Média ± EPM. Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05. * vs. Veículo; # vs. LVV-h6; § vs. LVV-h7; & vs. AMPT+veículo; * vs NTX + veículo. O efeito tipo-ansiolítico evocado pela LVV-h6 e LVV-h7 não parecem depender das vias catecolaminérgicas (como descrito) e ocitocinérgica (125). Diante disso e, considerando que hemorfinas são agonistas de receptores opióides (85, 93, 101), verificamos o envolvimento da via opióide nos efeitos sobre o comportamento tipo-ansiedade e atividade locomotora/exploratória promovidos pela LVV-h6 e LVV-h7 (Figura 6 e 7), descritos a seguir.

O bloqueio de receptores opióide com naltrexona (0,3 mg/kg s.c.) potenciou o aumento no tempo e o número de entradas nos braços abertos (NTX+LVV-h6 = 114±19 segundos vs. LVV-h6 = 49±9 segundos; NTX+LVV-h6 = 7±1 vs. LVV-h6 = 4±1, respectivamente) e, também, potenciou a redução no tempo nos braços fechados promovidos pela LVV-h6 (NTX+LVV-h6 = 135±19 segundos vs. LVV-h6 = 193±12 segundos), mas não alterou a resposta promovida pela LVV-h7 nesses parâmetros (tempo nos braços abertos: NTX+LVV-h7 = 75 ± 13 segundos vs. LVV-h7 = 63 ± 6 segundos; número de entradas nos braços abertos: NTX+LVV-h7 = 5 ± 1 vs. LVV-h7 = 5 ± 1 ; tempo nos braços fechados: NTX+LVV-h7 = 177±16 segundos vs. LVV-h7 = 175±8 segundos) (Figura 6A, 6C e 6B, respectivamente). Somado a isso, a injeção prévia de naltrexona, não alterou a resposta evocada pelas hemorfinas no tempo no centro do LCE (NTX+LVV-h6 = 51 ± 5 segundos vs. LVV-h6 = 54 ± 6 segundos; NTX+LVV-h7 = 49 ± 4 segundos vs. LVV-h7 = 63 ± 4 segundos) (Figura 6E) e no tempo no centro e tempo na periferia do CA (tempo no centro do CA: NTX+LVV $h6 = 24\pm11$ segundos vs. LVV- $h6 = 12\pm2$ segundos; NTX+LVV- $h7 = 13\pm4$ segundos vs. LVV-h7 = 11±1 segundos; e tempo na periferia do CA (NTX+LVVh6 = 276±11 segundos vs. LVV-h6 = 288±3 segundos; NTX+LVV-h7 = 287±4 segundos vs. LVV-h7 = 288±1 segundos) (Figura 7A e 7B). Juntos, esses resultados demonstram que o efeito tipo-ansiolítico promovido pelas hemorfinas (LVV-h6 e LVV-h7) não depende da ativação de receptores opióides.

A injeção prévia de naltrexona, não alterou a resposta evocada pelas hemorfinas (LVV-h6 e LVV-h7) no número de entradas nos braços fechados $(NTX+LVV-h6 = 7\pm 1 \text{ vs. } LVV-h6 = 7\pm 1; NTX+LVV-h7 = 9\pm 1 \text{ vs. } LVV-h7 = 8\pm 1) e$ no número total de entradas no LCE (NTX+LVV-h6 = 14 ± 1 vs. LVV-h6 = 11 ± 1 ; NTX+LVV-h7 = 14 ± 1 vs. LVV-h7 = 13 ± 1) (Figura 6D e 6F). O bloqueio de receptores opióides, potenciou o aumento de cruzamentos promovido pela LVVh7 (Figura 7C). O aumento da autolimpeza promovido pela LVV-h7 foi revertido pelo cotratamento com NTX (NTX+LVV-h7 = 2 ± 1 vs. LVV-h7 = 5 ± 1) (Figura 7F). NTX não alterou a redução no tempo de imobilidade e o aumento no número de levantadas promovidos pela LVV-h7 (tempo de imobilidade: NTX+LVV-h7 = 14±10 segundos vs. LVV-h7 = 20±10 segundos; e número de levantadas: NTX+LVV-h7 = 13 ± 2 vs. LVV-h7 = 14 ± 2) (Figura 7D e 7E, respectivamente). O número de cruzamentos (LVV-h6 = 15 ± 1 vs. veículo = 14 ± 1 , tempo de imobilidade (LVV-h6 = 48 ± 11 segundos; vs. veículo = 84 ± 15 segundos), levantadas (LVV-h6 = 11 ± 1 ; vs. veículo = 7 ± 1) e autolimpeza no CA (LVV-h6 = 4 ± 1 ; vs. veículo = 3 ± 1), evocado pela LVV-h6 não foi diferente do grupo veículo (Figura 7C, 7D, 7E e 7F, respectivamente), mas no grupo NTX+LVV-h6 houve aumento do número de cruzamentos (NTX+LVV-h6 = 24 ± 2 vs. LVV-h6 = 15 ± 1) e redução do tempo de imobilidade (NTX+LVV-h6 = 9±3 segundos vs. LVV-h6 = 48 ± 11 segundos) e autolimpeza no CA (NTX+LVV-h6 = 2 ± 1 vs. LVV-h6 = 4 ± 1), sem alterar a resposta no número de levantadas (NTX+LVV-h6 = 12±4 vs. LVVh6 = 11±1) (Figura 7C, 7D, 7F, 7E respectivamente). O aumento no número de cruzamentos e redução no tempo de imobilidade no CA parecem ser decorrentes do efeito direto da NTX, como demonstrado no grupo NTX+Veículo (número de cruzamentos: NTX+Veículo = 24±3 vs. veículo = 14±1; tempo de imobilidade: NTX+Veículo = 28±10 segundos vs. veículo = 84±15 segundos) (Figura 7C e 7D). O bloqueio de receptores opióides potenciou o aumento da atividade locomotora promovida pela LVV-h7 (Figura 7C).



Figura 8: Avaliação do envolvimento da via de catecolaminas e opióide na atividade locomotora/exploratória de LVV-h6 e LVV-h7 em ratos. A: Tempo despendido no centro no CA; B: Tempo despendido na periferia do CA; C: Cruzamentos; D: Imobilidade; E: Levantadas; F: Autolimpeza. AMPT: alfa-metil-p-tirosina. NTX: Naltrexona. Valores expressos como Média \pm EPM. Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05. * vs. Veículo; # vs. LVV-h6; § vs. LVV-h7.

6.2 Avaliação do envolvimento da via catecolaminérgica e opióide no efeito tipo-antidepressivo promovido pela LVV-h6 e LVV-h7

Segundo CRUZ (2016) (125), LVV-h6 e LVV-h7 reduzem o comportamento tipo-depressão em ratos, demonstrando um efeito tipoantidepressivo (125), esses dados são mostrados na figura 8 em conjunto com a avaliação do envolvimento de vias centrais nesse efeito. Imipramina (controle positivo) reduziu o tempo de imobilidade no NF em comparação com o grupo veículo (controle negativo) (IMI = 7±2 segundos vs. veículo = 31±6 segundos) (Figura 8). A redução no tempo de imobilidade no NF indica redução do comportamento depressivo (efeito tipo-antidepressivo).

A depleção catecolaminérgica, pela injeção prévia de AMPT, não alterou a redução no tempo de imobilidade no NF promovido pelas hemorfinas (AMPT+LVV-h6 = 17 ± 5 segundos vs. LVV-h6 = 20 ± 2 segundos; e AMPT+LVVh7 = 27 ± 2 segundos vs. LVV-h7 = 6 ± 1 segundos), mas o bloqueio de receptores opióides, pela injeção de NTX, reverteu completamente o efeito tipoantidepressivo evocado por ambas hemorfinas (NTX+LVV-h6 = 46 ± 5 segundos vs. LVV-h6 = 20 ± 2 segundos; e NTX+LVV-h7 = 39 ± 3 segundos vs. LVV-h7 = 6 ± 1 segundos). Aparentemente, o aumento no tempo de imobilidade no NF, nos grupos que receberam injeção prévia de NTX, pode ocorrer de um efeito direto de NTX sobre o comportamento tipo-depressão (NTX+Veículo = 73 ± 9 segundos vs. veículo = 31 ± 6 segundos) (Figura 8). Esses resultados indicam que a via opióide, mas não catecolaminérgica, pode estar envolvida no efeito tipoantidepressivo evocado pela LVV-h6 e LVV-h7.



Figura 9: Avaliação do envolvimento da via de catecolaminas e opióide no efeito tipoantidepressivo de LVV-h6 e LVV-h7 em ratos. Imobilidade. AMPT: alfa-metil-p-tirosina. NTX: Naltrexona. Valores expressos como Média ± EPM. Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05. * vs. Veículo; [#] vs. LVV-h6; [§] vs. LVV-h7; [&] vs. AMPT+veículo; * vs NTX + veículo.

6.3 EFEITOS DA PERFUSÃO COM LVV-H6 E LVV-H7 EM CORAÇÃO ISOLADO

Os resultados dos efeitos de LVV-h6 e LVV-h7 (1 nMol) sobre a função de coração isolado, são mostrados na Figura 11. Foi utilizada a técnica de Langendorff com fluxo constante de perfusão para avalição da reatividade das artérias coronarianas. Ambas hemorfinas (LVV-h6 e LVV-h7) reduziram a pressão de perfusão (LVV-h6: -22,8 % a -34,8 %; LVV-h7: -18,9 % a -28,4 %) indicando efeito vasorelaxante no leito coronariano (Figura 10A). LVV-h6 e LVV-h7 reduziram a pressão intraventricular sistólica (PIVS) (LVV-h6: -12,8 % a -32,7 %) (Figura 10B). A Pressão intraventricular diastólica

(PIVD) foi aumentada (LVV-h6: +26,35 %; LVV-h7: +20,38 %) nos primeiros 2 minutos após a perfusão de hemorfinas, mas somente a LVV-h6 promoveu alterações subsequente significativas, reduzindo a PIVD (-27,2 % a -36,75 %) (Figura 10C). Somado a isso, ambas hemorfinas reduziram a dP/dt máxima (LVV-h6: -11,1 % a -32,8 %; LVV-h7: -11,1 % a -32,8 %) e dP/dt mínima (LVVh6: -19 % a -45,23 %; LVV-h7: -19 % a -45,23 %) (Figuras 10D e 10E). Entretanto, somente a LVV-h6 foi capaz de alterar significativamente a frequência cardíaca, indicando efeito cronotrópico negativo (-7,13 % no 8° minuto; -5,95 % no 22° minuto) (Figura 10F). --- LVV-h6 --- LVV-h7



Figura 10: Efeitos da LVV-h6 e LVV-h7 em coração isolado. A. Percentual da variação da pressão perfusão; **B.** Percentual da variação da pressão intraventricular sistólica (PIVS); **C:** Percentual da variação da pressão intraventricular diastólica (PIVD); **D:** Percentual da variação da dP/dt_{máx}; **E:** Percentual da variação da dP/dt_{min}; **F:** Percentual da variação da frequência cardíaca. Valores expressos como Média ± EPM. Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05. * vs. basal; # vs. LVV-h6.

6.4 EFEITOS DA LVV-H6 E LVV-H7 SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR

Os resultados dos efeitos de LVV-h6 e LVV-h7 sobre a reatividade vascular na técnica de vaso isolado, são mostrados na Figura 10. Não houve reatividade vascular, após adição de LVV-h6 ou LVV-h7 na cuba do banho de órgãos. Esse resultado indica que nenhuma das hemorfinas (LVV-h6 e LVV-h7) promoveram efeitos vasoconstritores (Figura 11A) ou vasorelaxantes (Figura 11B) sobre os anéis isolados de artéria aorta descendente de ratos.



Figura 11: Efeitos da LVV-h6 e LVV-h7 sobre a reatividade vascular de anéis de aorta isolados. A: Contração; **B:** Relaxamento. Valores expressos como Média ± EPM. Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Estudo realizado por Cruz et al., (2016) (125) demonstra que LVV-h6 e LVV-h7 evocam efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo em ratos, sendo o efeito tipo-ansiolítico promovido por ambas hemorfinas não dependente da ativação de receptores de ocitocina. Entretanto, o bloqueio de receptores de ocitocina reverteu o efeito tipo-antidepressivo evocado pela LVV-h7, indicando que a via ocitocinérgica está envolvida no efeito de LVV-h7 sobre o comportamento tipo-depressão (125, 154). Portanto, outras vias (nãoocitocinérgicas) poderiam estar envolvidas nos efeitos de LVV-h6 e LVV-h7 sobre os comportamentos tipo-ansiedade e tipo-depressão. Sabendo que as catecolaminas exercem efeitos modulatórios sobre esses comportamentos (175), verificamos o envolvimento da via catecolaminérgica nos efeitos promovidos pelas hemorfinas, inibindo a biossíntese de catecolaminas com AMPT (200 mg/kg), um inibidor da enzima tiroxina hidroxilase. O efeito tipoansiolítico e tipo-antidepressivo evocado pela LVV-h6 e LVV-h7 não foi revertido pela injeção prévia de AMPT (Figura 12), mas o efeito evocado pela LVV-h6 no comportamento tipo-ansiedade, foi potencializado. De fato, sabe-se que o aumento na neurotransmissão noradrenérgica provoca sintomas ansiogênicos (176) (177, 178). A maioria dos neurônios catecolaminérgicos estão localizados no Locus Coeruleos (LC) e modulam diferentes funções, incluindo comportamento emocional. O aumento na liberação de noradrenalina promove sintomas depressivos e ansiogênicos (176-178). O LC exerce efeitos prosencefálicas antagônicos em reaiões que controlam respostas comportamentais (179). Por exemplo, lesões na região dorsal do LC aumenta o medo e induz a ansiedade (180). A lesão de LC na mesma região aumenta o

efeito tipo-antidepressivo promovido pela Reboxetina, um inibidor da recaptação de noradrenalina. Por outro lado, lesões em regiões ventrais do LC, revertem completamente o efeito tipo-antidepressivo (179), demonstrando que LC modula respostas comportamentais e esse controle depende da região que estiver mais ativa no LC. Aferências noradrenérgicas para amígdala regulam a formação da memória após experiências emocionais (181, 182). A amígdala é responsável pela organização de comportamentos de medo e ansiedade, como evitação e congelamento (183). Após experiências emocionais (184), os níveis de noradrenalina encontram-se aumentados na amígdala (185), o que é acompanhado por mudanças no perfil hormonal sanguíneo (186) e na atividade autonômica (187).

Dopamina, outra catecolamina, também pode estar envolvida nas respostas neurobiológicas da depressão, ansiedade, aprendizado e comportamentos motivacionais (175). Como a noradrenalina, a função da dopamina é controversa no comportamento depressivo, por exemplo: enquanto o aumento desta catecolamina no córtex pré-frontal pode desencadear o comportamento depressivo, a redução da neurotransmissão dopaminérgica nessa região promove efeito tipo-antidepressivo (188), aparentemente, por meio da ativação de receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2) (188-190). Se as hemorfinas exercem efeitos sobre a via dopaminérgica, especificamente, pela ativação de receptores D2, permanece por ser elucidado.

Diante disso, é aceitável a hipótese que regiões do cérebro, principalmente aquelas com envolvimento de vias catecolaminérgicas, estejam envolvidas nos efeitos comportamentais promovidos pela LVV-h6 e LVV-h7, principalmente porque recentemente identificamos RNAm para cadeia β-globina
da hemoglobina em regiões encefálicas, tais como: córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, hipotálamo e hipófise (154). Neste caso, se os efeitos das hemorfinas, estão vinculados a atividade de receptores das catecolaminas, isso ainda deve ser verificado (Figura 12).

As hemorfinas são peptídeos endógenos opióides (84, 85, 93, 95). O sistema opióide controla diferentes funções (191), incluindo o estado de humor (192). Diante disso, buscamos investigar a contribuição dos receptores opióides nos efeitos exercidos pela LVV-h6 e LVV-h7. O bloqueio de receptores opióides com o antagonista naltrexona, não alterou o efeito tipo-ansiolítico evocado pela LVV-h7, entretanto, potencializou o efeito tipo-ansiolítico promovido pela LVVh6. O efeito tipo-antidepressivo de ambas hemorfinas foi revertido pelo bloqueio de receptores opióides com naltrexona. Os receptores opióide são amplamente expressos pelo Sistema Nervoso Central (SNC) e sistema nervoso periférico (193). Opióides endógenos são liberados no SNC após ingestão de alimentos, sentimentos positivos e aceitação social (194). O tratamento com morfina, um opióide exógeno, reduz a ansiedade em pacientes com transtornos de estresse pós-traumático (195, 196). Ativação de receptores, com o agonista opióide buprenorfina, reduz os níveis de cortisol, sem alterar a ansiedade em pacientes saudáveis (197). Todavia, o bloqueio dos receptores opióides promove disforia e potencializa sentimentos negativos (198, 199). O sistema opióide também estar envolvido em reações de defesa, por inibir correntes pós-sinápticas excitatórias na amígdala lateral de ratos (200).

Receptores Kappa-opióide (KOR) desempenham função na ansiedade, depressão (201, 202) e interação social (203, 204). Ativação de KOR durante eventos estressantes induz mudanças comportamentais a longo-prazo (205),

está envolvida na resposta anti-recompensa (206) e participa da psicopatologia induzida pelo estresse (207). De maneira interessante, outro receptor opióide está envolvido no processo de recompensa: o receptor μ-opióide (MOR) (206, 208). A ativação deste receptor (MOR) reduz a atividade neuronial na substância cinzenta periaquedutal lateral e globo pálido ventral, que regulam componentes sensório-motor de reações de defesa (209). Por outro lado, camundongos knockout para receptores Delta-opióide (DOR) apresentaram aumento no comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão, sugerindo, que este receptor opióide também contribui para o estado de humor (209, 210), além de estar envolvido na aprendizagem e no sistema de recompensa (211).

Embora o bloqueio de receptores opióides não tenha revertido o efeito tipo-ansiolítico das hemorfinas, o efeito tipo-antidepressivo de LVV-h6 e LVV-h7 foi completamente revertido (Figura 12), ainda que NTX tenha, por si só, aumentado o tempo de imobilidade no NF. Os receptores opióides regulam a atividade de neurônios monoaminérgicos (211) e desta maneira podem promover a redução no comportamento tipo-depressão. De fato, o efeito tipoantidepressivo de um antidepressivo tricíclico foi revertido pela naloxona (211, 212), um antagonista de receptores opióides não específico, semelhante ao utilizado em nosso estudo. A ativação de MOR, sobre interneurônios inibitórios GABAérgicos na área tegmental ventral, aumenta a neurotransmissão dopaminérgica e, também, a liberação de serotonina (5-HT) no núcleo dorsal da rafe. Em neurônios noradrenérgicos, receptores MOR promovem efeito direto sobre a liberação de noradrenalina (211). Entretanto, a ativação de KOR inibe a liberação dopamina desencadeando de no nucleus accumbens, 0

comportamento depressivo e diminuição de humor (207, 213). De fato, o bloqueio de KOR e ativação de DOR promovem efeito tipo-antidepressivo (211).

Todos os tipos de receptores opióides são expressos no hipocampo e modulam a neurogênese promovida pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (211), o principal fator neurotrófico promotor do efeito tipo-antidepressivo de muitas drogas (214). A ativação de MOR no hipocampo reduz a sobrevivência e proliferação de neurônios (215, 216). Contudo, após administração de encefalinas e agonistas específicos DOR, houve aumento nos níveis de RNAm para BDNF, o que foi revertido pelo bloqueio de DOR e MOR pelo uso de antagonistas (211). Diante do exposto, é evidente a contribuição da via opióide nos efeitos mediados pelo BDNF e a que LVV-h6 e LVV-h7 promoveria efeitos comportamentais a longo prazo mediados por receptores opióides, entretanto é necessário, que isso ainda seja investigado.



Figura 12: Hipóteses e vias centrais envolvidas no efeito tipo-ansiolítico e tipoantidepressivo promovido pela LVV-h6 e LVV-h7. A: LVV-h6 reduz o comportamento tipoansiedade e tipo-depressão (efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo, respectivamente) (linhas vermelhas e sólidas); o aumento na biodisponibilidade de catecolaminas e a ativação de receptores de ocitocina, não está envolvida nos efeitos comportamentais de LVV-h6 (linhas pretas e sólidas); Hipótese de LVV-h6 se ligar a receptores de catecolaminas, desenvolvendo

seus efeitos sobre o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão (setas azuis com linhas tracejadas na parte superior); hipótese de atividade de LVV-h6 sobre a biodisponibilidade de neurotransmissores (opióides, e serotonina) (setas azuis com linhas tracejadas) e, desta forma, elevando as concentrações desses componentes centrais, os mesmos ativariam os seus respectivos receptores (setas azuis com linha tracejadas) ou a hipótese de LVV-h6 se ligar diretamente em receptores de serotonina (seta azul com linhas tracejadas, na parte inferior) exercendo os efeitos de LVV-h6 sobre o comportamento emocional; A ativação de receptores ocitocinérgicos não está relacionada aos efeitos comportamentais promovidos pela LVV-h6 (linha preta e sólida); mas LVV-h6 se liga em receptores opióides e os estabiliza na conformação ativa (efeito agonista), sendo este pelo menos um dos mecanismos envolvidos no efeito tipoantidepressivo de LVV-h6 (seta verde com linha sólida), mas não no efeito tipo-ansiolítico (linha preta e sólida). B: LVV-h7 reduz o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão (efeito tipoansiolítico e tipo-antidepressivo, respectivamente) (linhas vermelhas e sólidas); o aumento na biodisponibilidade de catecolaminas, não está envolvido com os efeitos comportamentais de LVV-h7 (linhas pretas e sólidas, na parte superior); a ativação de receptores opióides e receptores ocitocinérgicos não está envolvida com o efeito tipo ansiolítico promovido pela LVVh7 (linhas pretas e sólidas), mas sim no efeito tipo-antidepressivo evocado pela LVV-h7 (seta verde e sólida), sendo a ativação de receptores opióides, diretamente pelo agonismo de LVV-h7 a esses receptores (seta verde e sólida) ou pela hipótese de LVV-h7 aumentar os níveis de opióides endógenos e, esses, por sua vez, se ligarem em seus receptores (setas azuis com linhas tracejadas), desencadeando o efeito tipo-antidepressivo de LVV-h7; hipótese de LVV-h7 aumentar a biodisponibilidade de ocitocina (seta azul com linha tracejada), pela inibição da atividade aminopeptidase do AT4/IRAP (seta laranja com linha tracejada), aumentando os níveis de ocitocina central, que por sua vez, ativa seus respectivos receptores (setas azuis com linhas tracejadas, na parte inferior), desempenhando o efeito tipo-antidepressivo de LVV-h7; hipótese de LVV-h7 alterar as concentrações de serotonina que, desta forma, se ligaria em seus receptores (setas azuis com linhas tracejadas, na parte inferior) e/ou, hipótese de ligação direta de LVV-h7 em receptores de serotonina exercendo os efeitos sobre o comportamento emocional (setas azuis com linhas tracejadas, na parte inferior). SNC: sistema nervoso central; αadrenérgicos: D1: receptores de dopamina tipo 1; D2: receptores de dopamina tipo1; OTr: receptores de ocitocina; 5-HT: serotonina; 5-HTr: receptores de serotonina; AT4/IRAP: receptor de angiotensina IV com atividade constitutiva aminopeptidase; MOR: receptor µ-opióide; DOR: receptor Delta-opióide; KOR: receptor Kappa-opióide.

No presente estudo não foi identificado efeito de LVV-h6 e LVV-h7 sobre anéis isolados de aorta de ratos normotensos. Todavia, estudos sobre os efeitos de hemorfinas sobre o sistema cardiovascular são escassos e controversos: administração endovenosa de LVV-h7 evocou efeito pressor e taquicárdico de curta duração em ratos anestesiados e vagotomizados (156). Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), também foram observados efeitos pressor e taquicárdico, entretanto somente nos 20 minutos iniciais, seguidos por redução de PAM e FC nos oitenta minutos subsequentes (157). A administração de LVVh7 pela via intraperitoneal não alterou a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos conscientes (157). Foi identificada uma correlação entre o aumento da pressão diastólica sanguínea com os baixos níveis séricos da VV-h7 (123).

Em estudo realizado em íleo isolado de cobaias (217), que avaliou a atividade sobre a musculatura lisa, foi verificado que hemorfina-4 inibe a contração quando o íleo de cobaias foi estimulado eletricamente. Tal inibição depende da ativação de receptores opióides, contudo, em cobaias tolerantes à morfina ou após inativação parcial dos receptores opióides, com β -cloronaltrexamina, o efeito sobre esses receptores é antagonista (217). Os efeitos de hemorfina-4 e hemorfina-5 sobre a motilidade gastrointestinal foram testados pela técnica do centro geométrico e não foi identificada nenhuma alteração na atividade propulsora da musculatura gastrointestinal (109). Foi verificado também que essas mesmas hemorfinas (hemorfina-4 e hemorfina-5) inibem a motilidade da bexiga, desempenhando efeito inibidor do reflexo de micção induzido por volume (109).

Foi estabelecido que VV-h4 e LVV-h4 apresentam propriedades constritora sobre vasos coronários (111). Adicionalmente, hemorfina-7 diminui o aumento do fluxo sanguíneo local induzido por estimulação elétrica em modelo de inflamação, além de inibir a vasodilatação e o extravasamento do plasma, promovidos pela substância P, sendo esses efeitos dependentes de receptores opióides (106). Em 2006, lanzer e colaboradores demonstraram que LVV-h7 potencializa o efeito hipotensivo da bradicinina em ratos normotensos anestesiados (113). Interessantemente, LVV-h7 não altera a PAM e resistência vascular renal, bem como não altera o fluxo sanguíneo renal (171) e hipocampal em ratos anestesiados (138) e, ainda, não induz natriurese de ratos normotensos anestesiados (171).

Diante da hipótese de que LVV-h6 e LVV-h7 podem influenciar o sistema cardiovascular, a ausência de efeitos de LVV-h6 e LVV-h7 em anéis isolados de aorta de ratos, demonstrados no presente estudo, indicam que tais efeitos, se presentes, não ocorrem nesse leito vascular. Neste contexto, também avaliamos os efeitos das hemorfinas em coração isolado de ratos. Ambas LVV-h6 e a LVVh7 atuaram diminuindo a pressão de perfusão, a dp/dt máxima e mínima e a pressão intraventricular sistólica e diastólica, o que demonstra um efeito sobre o inotropismo cardíaco. Experimentos adicionais in vivo são necessários para maior compreensão desses efeitos ex vivo, uma vez que a regulação do sistema cardiovascular é de caráter integrativo. A partir disso, algumas hipóteses mecanísticas podem ser levantadas para explicar os efeitos cardíacos provocados pelas hemorfinas: i) LVV-h7 é um agonista do receptor de angiotensina IV (AT4) (136, 147), somado a isso, foi demonstrado, que LVV-h6 não tem diferença significativa na ligação ao AT4/IRAP em comparação a LVVh7 (149, 218); ii) ambas LVV-h6 e LVV-h7 são inibidores da ECA (86, 158), diante disso, é possível inferir, que as hemorfinas podem desempenhar importantes funções no sistema renina angiotensina aldosterona; iii) ao se ligar no receptor AT4, LVV-h7 promove os mesmos efeitos, mediados por mensageiros intracelulares, desencadeados pela ativação do receptor (136). Adicionalmente, LVV-h7 é capaz de inibir a atividade aminopeptidase (aminopeptidase de membrana regulada por insulina - IRAP) constitutiva do AT4 e, desta forma, impedir a degradação de diversos peptídeos como vasopressina, angiotensina III e ocitocina (148, 150-152). Em estudos in vivo, a inibição do AT4/IRAP resultou em aumento nos níveis de ocitocina na amígdala (153), portanto, AT4/IRAP é também denominada ocitocinase, com importante função de

controle nas concentrações centrais desse hormônio (152). A ocitocina exerce efeitos cronotrópicos e ionotrópicos negativos em coração isolado de cães, por meio da liberação de óxido nítrico (NO) e acetilcolina pelos neurônios pósganglionares cardíacos (219). Além disso, a ocitocina aumenta a perfusão sanguínea no coração, favorecendo a contratilidade cardíaca e, exercendo efeito cardioprotetor no modelo de isquemia-reperfusão em coração isolado (220).

É possível que LVV-h6 e LVV-h7 se liguem ao AT4/IRAP aumentando a concentração de ocitocina no coração, o que resultaria nos efeitos que encontramos no coração isolado. Recentemente, demonstramos que LVV-h7 evoca efeitos comportamentais em ratos, os quais são dependentes de receptores de ocitocina. No mesmo estudo, LVV-h7 não alterou a amplitude do cronotropismo positivo e das respostas pressora e neuroendócrina ao estresse emocional agudo (154). Em contrapartida, outros estudos demonstraram que o aumento nos níveis de ocitocina tem efeitos vasculares, o que foi evidenciado em outros modelos experimentais (221). Entretanto, ainda é necessário ser confirmado, se os efeitos cardíacos das hemorfinas dependem da atividade de receptores de ocitocina. Interessante, todavia, é que ambas LVV-h6 e LVV-h7 modificaram função cardíaca de maneira equipotente no que diz respeito a amplitude e duração dos efeitos nos experimentos realizados no coração isolado. Isso permite sugerir que ambas LVV-h6 e LVV-h7 atuariam em um alvo molecular cardíaco comum, modificando o metabolismo de cálcio em cardiomiócitos.

A LVV-h7 não tem efeito agonista ou antagonista de receptores de angiotensina, uma vez que não alterou os efeitos de angiotensina II e angiotensina IV (222). Entretanto, como citado anteriormente, tanto LVV-h6

como LVV-h7 são capazes de inibir a ECA (86, 96, 158), que converte angiotensina I em angiotensina II, além de degradar bradicinina (223). Em 2006, lanzer e colaboradores demonstraram que LVV-h7, assim como a angiotensina (1-7) (224-226), é capaz de potencializar o efeito da bradicinina, que regula o tônus vascular, promovendo vasodilatação (113). No presente estudo, LVV-h6 e LVV-h7 reduziram a pressão de perfusão no coração isolado de ratos, possivelmente por promoverem a vasodilatação das coronárias. Se, de fato, tais efeitos dependerem de seu efeito sobre a ECA, os mecanismos potencialmente envolvidos na melhora da perfusão podem ser via aumento dos níveis de angiotensina (1-7) e bradicinina (86, 96, 158).

O LVV-h6 e o LVV-h7 apresentam uma similaridade estrutural substancial em suas sequências de aminoácidos, a única diferença é que LVV-h6 não possui uma fenilalanina (Phe) em sua posição C-terminal (85). Lee e colaboradores demonstraram que a deleção deste último resíduo de aminoácido (Phe10 da posição C-terminal de LVV-h7) foi incapaz de produzir mudanças pronunciadas na afinidade pelo receptor AT4/IRAP (149), demonstrando que LVV-h-6 e LVVh7 podem atuar com a mesma afinidade sobre determinados alvos biológicos, por exemplo a ECA, resultando na similaridade dos efeitos sobre o coração isolado, encontrados neste estudo. Em contrapartida, nossos resultados comportamentais, demonstram que os mecanismos envolvidos nos efeitos centrais evocados pelo LVV-h6 e LVV-h7 são parcialmente diferentes (Figura 12), possivelmente em consequência da ausência de Phe na LVV-h6, assim como no sistema renina-angiotensina-aldosterona, em que a mesma remoção de Phe entre a angiotensina II em angiotensina (1-7) resulta em efeitos contrarregulatórios e principalmente opostos em consequência da relação

estrutura/afinidade, de modo que: angiotensina II apresenta afinidade pelos receptores AT1 (receptores da angiotensina subtipo 1) e receptores AT2 (receptores de angiotensina subtipo 2), enquanto a angiotensina 1-7 se liga preferencialmente ao receptor Mas (227). Portanto, pequenas mudanças na estrutura primária do peptídeo podem modificar a afinidade e especificidade de ligação, como notado na via ocitocinérgica, como um dos mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais de LVV-h6 e LVV-h7 (Figura 12).

Foi demonstrado que a LVV-h7 promoveu taquicardia quando aplicada via intravenosa em animais anestesiados e vagotomizados, sendo esses efeitos dependentes da atividade do braço simpático do sistema nervoso autônomo (156). As hemorfinas exercem efeitos analgésicos e anti-hiperalgésicos mediados por receptores opióides (142) o que reforça a hipótese de que os efeitos autonômicos, cardíacos e vasculares de LVV-h6 e LVV-h7 poderiam envolver esse sistema. De fato, os receptores opióides são encontrados em diversos locais do coração (228, 229), e sua ativação promove bradicardia (230). Tais receptores são acoplados à proteína Gi/o, que inibe a adenilil ciclase e a produção de AMPc e a Gβγ interage com diferentes canais iônicos de membrana (231), modulando canais de Ca^{2+} e inibindo o influxo de Ca^{2+} (232). Além disso, a ativação de receptores opióides leva à abertura de canais de K + acoplados à proteína G, impedindo assim a excitação celular e/ou a propagação de potenciais de ação. Os receptores opióides também podem atuar inibindo canais de Na⁺ (233, 234). A modulação no transiente iônico através da membrana celular e no citosol pode ser um mecanismo determinante das respostas cardíacas geradas pelas LVV-h6 e LVV-h7. Duas hemorfinas (VV-h4 e LVV-h4) possuem propriedades dos peptídeos constritores coronários (111). Contudo, estudos in

vitro demonstraram que a morfina levou a um aumento na produção de NO em células endoteliais, que foi revertida pela ação da naloxona (235). Sendo assim, o aumento na produção de NO pelas células endoteliais das coronárias, mediado pela ligação de LVV-h6 e LVV-h7 em receptores opióides, também pode ser um mecanismo viável para os efeitos encontrados por essas hemorfinas no presente estudo. Tais hipóteses, entretanto, merecem estudos futuros.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

O efeito tipo-ansiolítico de LVV-h6 e LVV-h7 não depende da rota de biossíntese de catecolaminas ou da ativação de receptores opióides, O efeito tipo-antidepressivo de ambas hemorfinas, foi revertido pelo bloqueio de receptores opióides, indicando a ativação desses receptores como mecanismo potencial. Adicionalmente, LVV-h6 e LVV-h7, atuam diminuindo a função cardíaca, nos parâmetros avaliados, em coração isolado sem afetar a vasomotricidade de anéis isolados da artéria aorta de ratos. Apesar de LVV-h6 e LVV-h7 provocarem os mesmos efeitos sobre o comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressão, os mecanismos determinantes desses são parcialmente diferentes, mesmo com uma substancial similaridade na estrutura primária dessas hemorfinas. Ademais, a cascata metabólica β-globinas-hemorfinas pode compor um sistema de regulação de funções fisiológicas e do comportamento ansiedade e depressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (WHO). WHO. Depression and Other Common Mental Disorders – Global Health Estimates 2017 [Available from: <u>http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/</u>.

2. Philpott LF, Savage E, FitzGerald S, Leahy-Warren P. Anxiety in fathers in the perinatal period: A systematic review. Midwifery. 2019;76:54-101.

3. Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2006;5(4):453-79.

4. Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, et al. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. J Neurosci. 2004;24(15):3810-5.

5. McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE. Neural correlates of cat odorinduced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. J Neurosci. 2004;24(17):4134-44.

6. Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. Nature. 2006;444(7117):308-15.

7. Patel D, Kas MJ, Chattarji S, Buwalda B. Rodent models of social stress and neuronal plasticity: Relevance to depressive-like disorders. Behav Brain Res. 2019;369:111900.

8. Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. J Neurosci. 2004;24(24):5506-15.

9. Patel D, Anilkumar S, Chattarji S, Buwalda B. Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. Behav Brain Res. 2018;347:314-24.

10. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. Neuropsychiatr Dis Treat. 2015;11:165-75.

11. Boyer P. Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? Acta Psychiatr Scand Suppl. 2000(406):24-9.

12. Mehta AK, Ticku MK. An update on GABAA receptors. Brain Res Brain Res Rev. 1999;29(2-3):196-217.

13. Benham RS, Engin E, Rudolph U. Diversity of neuronal inhibition: a path to novel treatments for neuropsychiatric disorders. JAMA Psychiatry. 2014;71(1):91-3.

14. Rudolph U, Crestani F, Mohler H. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. Trends Pharmacol Sci. 2001;22(4):188-94.

15. Nuss P, Ferreri F, Bourin M. An update on the anxiolytic and neuroprotective properties of etifoxine: from brain GABA modulation to a whole-body mode of action. Neuropsychiatr Dis Treat. 2019;15:1781-95.

16. Neumeister A, Bain E, Nugent AC, Carson RE, Bonne O, Luckenbaugh DA, et al. Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. J Neurosci. 2004;24(3):589-91.

17. Nash JR, Sargent PA, Rabiner EA, Hood SD, Argyropoulos SV, Potokar JP, et al. Serotonin 5-HT1A receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study. Br J Psychiatry. 2008;193(3):229-34.

18. Sullivan GM, Oquendo MA, Simpson N, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsey RV. Brain serotonin1A receptor binding in major depression is related to psychic and somatic anxiety. Biol Psychiatry. 2005;58(12):947-54.

19. Nautiyal KM, Tritschler L, Ahmari SE, David DJ, Gardier AM, Hen R. A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. Neuropsychopharmacology. 2016;41(12):2941-50.

20. Niswender CM, Herrick-Davis K, Dilley GE, Meltzer HY, Overholser JC, Stockmeier CA, et al. RNA editing of the human serotonin 5-HT2C receptor. alterations in suicide and implications for serotonergic pharmacotherapy. Neuropsychopharmacology. 2001;24(5):478-91.

21. Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA. The role of 5-HT receptors in depression. Mol Brain. 2017;10(1):28.

22. Gorman JM, Liebowitz MR, Fyer AJ, Goetz D, Campeas RB, Fyer MR, et al. An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. J Clin Psychopharmacol. 1987;7(5):329-32.

23. Westenberg HG, den Boer JA. Serotonin-influencing drugs in the treatment of panic disorder. Psychopathology. 1989;22 Suppl 1:68-77.

24. Burghardt NS, Bush DE, McEwen BS, LeDoux JE. Acute selective serotonin reuptake inhibitors increase conditioned fear expression: blockade with a 5-HT(2C) receptor antagonist. Biol Psychiatry. 2007;62(10):1111-8.

25. Dekeyne A, Denorme B, Monneyron S, Millan MJ. Citalopram reduces social interaction in rats by activation of serotonin (5-HT)(2C) receptors. Neuropharmacology. 2000;39(6):1114-7.

26. Belzung C, Le Guisquet AM, Barreau S, Calatayud F. An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice. Behav Pharmacol. 2001;12(3):151-62.

27. Marcinkiewcz CA, Mazzone CM, D'Agostino G, Halladay LR, Hardaway JA, DiBerto JF, et al. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. Nature. 2016;537(7618):97-101.

28. Villas Boas GR, Boerngen de Lacerda R, Paes MM, Gubert P, Almeida W, Rescia VC, et al. Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. Eur J Pharmacol. 2019;851:99-121.

29. Michopoulos V, Powers A, Gillespie CF, Ressler KJ, Jovanovic T. Inflammation in Fearand Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. Neuropsychopharmacology. 2017;42(1):254-70.

30. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. Cell. 2016;167(4):915-32.

31. Moberg CA, Bradford DE, Kaye JT, Curtin JJ. Increased startle potentiation to unpredictable stressors in alcohol dependence: Possible stress neuroadaptation in humans. J Abnorm Psychol. 2017;126(4):441-53.

32. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology. 2010;35(1):169-91.

33. Grillon C, Robinson OJ, Cornwell B, Ernst M. Modeling anxiety in healthy humans: a key intermediate bridge between basic and clinical sciences. Neuropsychopharmacology. 2019.

34. (OPAS) OPds. Folha informativa - depressão 2018 [Available from: <u>https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-</u>informativa-depressao&Itemid=1095.

35. (PNS) PNdS. Indicadores de saúde e marcado de trabalho - Brasil e grandes regiões Rio de Janeiro: IBGE, coordenação de trabalho e rendimento; 2016 [Available from: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv97329.pdf.

36. Massart R, Mongeau R, Lanfumey L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012;367(1601):2485-94.

37. Liu Y, Zhao J, Fan X, Guo W. Dysfunction in Serotonergic and Noradrenergic Systems and Somatic Symptoms in Psychiatric Disorders. Front Psychiatry. 2019;10:286.

38. Miller HL, Delgado PL, Salomon RM, Berman R, Krystal JH, Heninger GR, et al. Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. Arch Gen Psychiatry. 1996;53(2):117-28.

39. Ruhé HG, Mason, N.S., Schene, A.H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: A meta-analysis of monoamine depletion studies. Mol Psychiatry. 2007;12:331-59.

40. Kleinstauber M, Lambert MJ, Hiller W. Early response in cognitive-behavior therapy for syndromes of medically unexplained symptoms. BMC Psychiatry. 2017;17(1):195.

41. Blier P, de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. Trends Pharmacol Sci. 1994;15(7):220-6.

42. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science. 2003;301(5634):805-9.

43. Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, et al. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. Neuron. 2010;65(1):40-52.

44. Samuels BA, Anacker C, Hu A, Levinstein MR, Pickenhagen A, Tsetsenis T, et al. 5-HT1A receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. Nat Neurosci. 2015;18(11):1606-16.

45. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. Behav Brain Res. 2008;195(1):198-213.

46. Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013;45:54-63.

47. McDevitt RA, Hiroi R, Mackenzie SM, Robin NC, Cohn A, Kim JJ, et al. Serotonin 1B autoreceptors originating in the caudal dorsal raphe nucleus reduce expression of fear and depression-like behavior. Biol Psychiatry. 2011;69(8):780-7.

48. Neumaier JF, Petty F, Kramer GL, Szot P, Hamblin MW. Learned helplessness increases 5-hydroxytryptamine1B receptor mRNA levels in the rat dorsal raphe nucleus. Biol Psychiatry. 1997;41(6):668-74.

49. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, et al. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. Science. 2006;311(5757):77-80.

50. Devroye C, Cathala A, Piazza PV, Spampinato U. The central serotonin2B receptor as a new pharmacological target for the treatment of dopamine-related neuropsychiatric disorders: Rationale and current status of research. Pharmacol Ther. 2018;181:143-55.

51. Ohtsuki T, Ishiguro H, Detera-Wadleigh SD, Toyota T, Shimizu H, Yamada K, et al. Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative Bipolar Pedigrees. Mol Psychiatry. 2002;7(9):954-61.

52. Madsen K, Torstensen E, Holst KK, Haahr ME, Knorr U, Frokjaer VG, et al. Familial risk for major depression is associated with lower striatal 5-HT(4) receptor binding. Int J Neuropsychopharmacol. 2014;18(1).

53. Compan V, Zhou M, Grailhe R, Gazzara RA, Martin R, Gingrich J, et al. Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT4 receptor knock-out mice. J Neurosci. 2004;24(2):412-9.

54. Conductier G, Dusticier N, Lucas G, Cote F, Debonnel G, Daszuta A, et al. Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT(4) receptor knock-out mouse. Eur J Neurosci. 2006;24(4):1053-62.

55. Carr GV, Lucki I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. Psychopharmacology (Berl). 2011;213(2-3):265-87.

56. Laplante P, Diorio J, Meaney MJ. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor. Brain Res Dev Brain Res. 2002;139(2):199-203.

57. Abbas AI, Hedlund PB, Huang XP, Tran TB, Meltzer HY, Roth BL. Amisulpride is a potent 5-HT7 antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. Psychopharmacology (Berl). 2009;205(1):119-28.

58. Ordway GA, Schenk J, Stockmeier CA, May W, Klimek V. Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. Biol Psychiatry. 2003;53(4):315-23.

59. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. Am J Psychiatry. 2006;163(11):1905-17.

60. Evans DL, Charney DS. Mood disorders and medical illness: a major public health problem. Biol Psychiatry. 2003;54(3):177-80.

61. Ongur D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(22):13290-5.

62. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, et al. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. Biol Psychiatry. 1999;45(9):1085-98.

63. Cotter DR, Pariante CM, Everall IP. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. Brain Res Bull. 2001;55(5):585-95.

64. Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. Cereb Cortex. 2002;12(4):386-94.

65. Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, Gershon S, McClure RJ, Pettegrew JW. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. Biol Psychiatry. 2000;47(7):586-93.

66. Kugaya A, Sanacora G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. CNS Spectr. 2005;10(10):808-19.

67. Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby CR, Jr., Kawahara R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006;30(6):1155-8.

68. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biol Psychiatry. 2000;47(4):351-4.

69. Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. Arch Gen Psychiatry. 2006;63(8):856-64.

70. Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. J Clin Psychopharmacol. 2008;28(6):631-7.

71. Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, et al. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. Acta Psychiatr Scand Suppl. 2007(433):90-103.

72. Gerner RH, Hare TA. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. Am J Psychiatry. 1981;138(8):1098-101.

73. Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Petroff OA, et al. Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. Arch Gen Psychiatry. 1999;56(11):1043-7.

74. Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, et al. Subtypespecific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. Arch Gen Psychiatry. 2004;61(7):705-13.

75. Bhagwagar Z, Wylezinska M, Jezzard P, Evans J, Ashworth F, Sule A, et al. Reduction in occipital cortex gamma-aminobutyric acid concentrations in medication-free recovered unipolar depressed and bipolar subjects. Biol Psychiatry. 2007;61(6):806-12.

76. Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. Am J Psychiatry. 2002;159(4):663-5.

77. Ohira K, Takeuchi R, Shoji H, Miyakawa T. Fluoxetine-induced cortical adult neurogenesis. Neuropsychopharmacology. 2013;38(6):909-20.

78. Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. Mol Psychiatry. 2011;16(4):383-406.

79. Park SC. Neurogenesis and antidepressant action. Cell Tissue Res. 2019;377(1):95-106.

80. Bremner JD, Vermetten E. Neuroanatomical changes associated with pharmacotherapy in posttraumatic stress disorder. Ann N Y Acad Sci. 2004;1032:154-7.

81. Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. Neuropsychopharmacology. 2000;23(5):477-501.

82. Cameron HA, Tanapat P, Gould E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. Neuroscience. 1998;82(2):349-54.

83. Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. Nat Neurosci. 2006;9(4):519-25.

84. Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, Mertz R, Jaeger KH, Herz A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. Eur J Pharmacol. 1986;125(2):309-10.

85. Gomes I, Dale CS, Casten K, Geigner MA, Gozzo FC, Ferro ES, et al. Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. AAPS J. 2010;12(4):658-69.

86. Zhao Q, Sannier F, Garreau I, Guillochon D, Piot JM. Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. Biochem Biophys Res Commun. 1994;204(1):216-23.

87. John H, Schulz S, Forssmann WG. Comparative in vitro degradation of the human hemorphin LVV-H7 in mammalian plasma analysed by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. Biopharm Drug Dispos. 2007;28(2):73-85.

88. Fruitier I, Garreau I, Piot JM. Cathepsin D is a good candidate for the specific release of a stable hemorphin from hemoglobin in vivo: VV-hemorphin-7. Biochem Biophys Res Commun. 1998;246(3):719-24.

89. Garreau I, Cucumel K, Dagouassat N, Zhao Q, Cupo A, Piot JM. Hemorphin peptides are released from hemoglobin by cathepsin D. radioimmunoassay against the C-part of V-V-hemorphin-7: an alternative assay for the cathepsin D activity. Peptides. 1997;18(2):293-300.

90. Barkhudaryan N, Kellermann J, Galoyan A, Lottspeich F. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. FEBS Lett. 1993;329(1-2):215-8.

91. Fruitier I, Garreau I, Lacroix A, Cupo A, Piot JM. Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: hemorphins. FEBS Lett. 1999;447(1):81-6.

92. Choisnard L, Durand D, Vercaigne-Marko D, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Guillochon D. A simple method for the two-step preparation of two pure haemorphins from a total haemoglobin peptic hydrolysate by conventional low-pressure chromatographies. Biotechnol Appl Biochem. 2001;34(Pt 3):173-81.

93. Piot JM, Zhao Q, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. Biochem Biophys Res Commun. 1992;189(1):101-10.

94. Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Release of hemorphin-5 from human hemoglobin by pancreatic elastase. Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66(5):1130-2.

95. Nyberg F, Sanderson K, Glamsta EL. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. Biopolymers. 1997;43(2):147-56.

96. Lantz I, Glamsta EL, Talback L, Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. FEBS Lett. 1991;287(1-2):39-41.

97. Sanderson K, Andren PE, Caprioli RM, Nyberg F. In vitro metabolism of LVV-hemorphin-7 in human plasma studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography and micro-electrospray mass spectrometry. J Chromatogr A. 1996;743(1):207-12.

98. Fruitier-Arnaudin I, Cohen M, Coitoux C, Piot JM. In vitro metabolism of LVV-Hemorphin-7 by renal cytosol and purified prolyl endopeptidase. Peptides. 2003;24(8):1201-6.

99. Cohen M, Fruitier-Arnaudin I, Piot JM. Hemorphins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV. Biochimie. 2004;86(1):31-7.

100. Rioli V, Gozzo FC, Heimann AS, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem. 2003;278(10):8547-55.

101. Glamsta EL, Marklund A, Hellman U, Wernstedt C, Terenius L, Nyberg F. Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. Regul Pept. 1991;34(3):169-79.

102. Karhu T, Akiyama K, Vuolteenaho O, Bergmann U, Naito T, Tatemoto K, et al. Isolation of new ligands for orphan receptor MRGPRX1-hemorphins LVV-H7 and VV-H7. Peptides. 2017;96:61-6.

103. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. Cell. 2001;106(5):619-32.

104. Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, O'Donnell D, Roy MO, Zhang J, et al. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron--specific GPCRs. Nat Neurosci. 2002;5(3):201-9.

105. Solinski HJ, Boekhoff I, Bouvier M, Gudermann T, Breit A. Sensory neuron-specific MASrelated gene-X1 receptors resist agonist-promoted endocytosis. Mol Pharmacol. 2010;78(2):249-59.

106. Sanderson K, Nyberg F, Khalil Z. Modulation of peripheral inflammation by locally administered hemorphin-7. Inflamm Res. 1998;47(2):49-55.

107. Solinski HJ, Petermann F, Rothe K, Boekhoff I, Gudermann T, Breit A. Human Mas-related G protein-coupled receptors-X1 induce chemokine receptor 2 expression in rat dorsal root ganglia neurons and release of chemokine ligand 2 from the human LAD-2 mast cell line. PLoS One. 2013;8(3):e58756.

108. Tatemoto K, Nozaki Y, Tsuda R, Konno S, Tomura K, Furuno M, et al. Immunoglobulin Eindependent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2006;349(4):1322-8.

109. Davis TP, Gillespie TJ, Porreca F. Peptide fragments derived from the beta-chain of hemoglobin (hemorphins) are centrally active in vivo. Peptides. 1989;10(4):747-51.

110. Nishimura K, Hazato T. Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord. Biochem Biophys Res Commun. 1993;194(2):713-9.

111. Barkhudaryan N, Oberthuer W, Lottspeich F, Galoyan A. Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors. Neurochem Res. 1992;17(12):1217-21.

112. Barkhudaryan N, Gambarov S, Gyulbayazyan T, Nahapetyan K. LVV-hemorphin-4 modulates Ca2+/calmodulin-dependent pathways in the immune system by the same mechanism as in the brain. J Mol Neurosci. 2002;18(3):203-10.

113. Ianzer D, Konno K, Xavier CH, Stocklin R, Santos RA, de Camargo AC, et al. Hemorphin and hemorphin-like peptides isolated from dog pancreas and sheep brain are able to potentiate bradykinin activity in vivo. Peptides. 2006;27(11):2957-66.

114. Lammerich HP, Busmann A, Kutzleb C, Wendland M, Seiler P, Berger C, et al. Identification and functional characterization of hemorphins VV-H-7 and LVV-H-7 as low-affinity agonists for the orphan bombesin receptor subtype 3. Br J Pharmacol. 2003;138(8):1431-40.

115. Domenger D, Cudennec B, Kouach M, Touche V, Landry C, Lesage J, et al. Food-Derived Hemorphins Cross Intestinal and Blood-Brain Barriers In Vitro. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:159.

116. Altinoz MA, Elmaci I, Ince B, Ozpinar A, Sav AM. Hemoglobins, Hemorphins, and 11p15.5 Chromosomal Region in Cancer Biology and Immunity with Special Emphasis for Brain Tumors. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg. 2016;77(3):247-57.

117. Altinoz MA, Ozcan EM, Ince B, Guloksuz S. Hemoglobins as new players in multiple sclerosis: metabolic and immune aspects. Metab Brain Dis. 2016;31(5):983-92.

118. GLÄMSTA ELea. Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1992;184(2):1060-6.

119. Song CZ, Wang QW, Song CC. Does needling stimulate erythrocyte-based local analgesia? Acupunct Med. 2013;31(4):451-2.

120. Tseng SH, Chang TY, Shih CK, Hsieh RH, Chen CW, Chen YC, et al. Effect of Endoplasmic Reticular Stress on Free Hemoglobin Metabolism and Liver Injury. Int J Mol Sci. 2018;19(7).

121. Galoyan AA. Primary structure and biological activity of hemoglobin-related hypothalamic peptides. Biopolymers. 1997;43(2):135-7.

122. Poljak A, McLean CA, Sachdev P, Brodaty H, Smythe GA. Quantification of hemorphins in Alzheimer's disease brains. J Neurosci Res. 2004;75(5):704-14.

123. Maraninchi M, Feron D, Fruitier-Arnaudin I, Begu-Le Corroller A, Nogueira JP, Mancini J, et al. Serum hemorphin-7 levels are decreased in obesity. Obesity (Silver Spring). 2013;21(2):378-81.

124. Karelin AA, Blishchenko E, Ivanov VT. A novel system of peptidergic regulation. FEBS Lett. 1998;428(1-2):7-12.

125. CRUZ KR. EFEITOS CENTRAIS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA HEMOGLOBINA: LVV-HEMORFINA-6 E LVV-HEMORFINA-7. In: Goiás UFd, editor. Mestrado em Ciências Biológicas. Goiânia2016.

126. Gelman JS, Fricker LD. Hemopressin and other bioactive peptides from cytosolic proteins: are these non-classical neuropeptides? AAPS J. 2010;12(3):279-89.

127. Yatskin ON, Philippova MM, Blishchenko E, Karelin AA, Ivanov VT. LVV- and VVhemorphins: comparative levels in rat tissues. FEBS Lett. 1998;428(3):286-90.

128. Zhou M, Peng JR, Wang HX, Zhong ZH, Guo YT, Pan XY, et al. [Identification of a natural opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-6 in hepatocarcinoma cells of a patient by LC-MS]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2005;13(8):617.

129. Nydahl KS, Pierson J, Nyberg F, Caprioli RM, Andren PE. In vivo processing of LVVhemorphin-7 in rat brain and blood utilizing microdialysis combined with electrospray mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17(8):838-44.

130. Nyberg G, Sanderson K, Andren P, Thornwall M, Einarsson M, Danielson B, et al. Isolation of haemorphin-related peptides from filter membranes collected in connection with haemofiltration of human subjects. J Chromatogr A. 1996;723(1):43-9.

131. Fruiter A, II, Cohen MM, Nervi SS, Bordenave SS, Sannier FF, Piot JM. Reduced level of opioid peptides, hemorphin-7 peptides, in serum of diabetic patients. Diabetes Care. 2003;26(8):2480.

132. Karelin AA, Philippova MM, Karelina EV, Ivanov VT. Isolation of endogenous hemorphinrelated hemoglobin fragments from bovine brain. Biochem Biophys Res Commun. 1994;202(1):410-5.

133. Chang RC, Huang WY, Redding TW, Arimura A, Coy DH, Schally AV. Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami. Biochim Biophys Acta. 1980;625(2):266-73.

134. Cerpa-Poljak A, Lahnstein J, Mason KE, Smythe GA, Duncan MW. Mass spectrometric identification and quantification of hemorphins extracted from human adrenal and pheochromocytoma tissue. J Neurochem. 1997;68(4):1712-9.

135. Murillo L, Piot JM, Coitoux C, Fruitier-Arnaudin I. Brain processing of hemorphin-7 peptides in various subcellular fractions from rats. Peptides. 2006;27(12):3331-40.

136. Moeller I, Lew RA, Mendelsohn FA, Smith AI, Brennan ME, Tetaz TJ, et al. The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. J Neurochem. 1997;68(6):2530-7.

137. Albiston AL, Pederson ES, Burns P, Purcell B, Wright JW, Harding JW, et al. Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. Behav Brain Res. 2004;154(1):239-43.

138. De Bundel D, Smolders I, Yang R, Albiston AL, Michotte Y, Chai SY. Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow. Neurobiol Learn Mem. 2009;92(1):19-26.

139. Lee J, Albiston AL, Allen AM, Mendelsohn FA, Ping SE, Barrett GL, et al. Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. Neuroscience. 2004;124(2):341-9.

140. Ho JK, Nation DA. Cognitive benefits of angiotensin IV and angiotensin-(1-7): A systematic review of experimental studies. Neurosci Biobehav Rev. 2018;92:209-25.

141. Lee J, Chai SY, Mendelsohn FA, Morris MJ, Allen AM. Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. Neuropharmacology. 2001;40(4):618-23.

142. Cheng BC, Tao PL, Cheng YY, Huang EY. LVV-hemorphin 7 and angiotensin IV in correlation with antinociception and anti-thermal hyperalgesia in rats. Peptides. 2012;36(1):9-16.

143. Duethman D, Dewan N, Conlon JM. Isolation of the opioid peptide Leu-Val-Valhemorphin-7 from bronchoalveolar lavage fluid of a patient with non-small cell lung cancer. Peptides. 2000;21(1):137-42.

144. Hens JJ, De Wit M, Ghijsen WE, Leenders AG, Boddeke HW, Kissmehl R, et al. Role of calcineurin in Ca2+-induced release of catecholamines and neuropeptides. J Neurochem. 1998;71(5):1978-86.

145. Day M, Olson PA, Platzer J, Striessnig J, Surmeier DJ. Stimulation of 5-HT(2) receptors in prefrontal pyramidal neurons inhibits Ca(v)1.2 L type Ca(2+) currents via a PLCbeta/IP3/calcineurin signaling cascade. J Neurophysiol. 2002;87(5):2490-504.

146. Yakel JL. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. Trends Pharmacol Sci. 1997;18(4):124-34.

147. Moeller I, Albiston AL, Lew RA, Mendelsohn FA, Chai SY. A globin fragment, LVVhemorphin-7, induces [3H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT4 receptor. J Neurochem. 1999;73(1):301-8.

148. Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). J Neurochem. 2003;86(2):344-50.

149. Lee J MT, McDowall SG, Mendelsohn FA, Brennan M, Lew RA, Albiston AL, Chai SY. Structure-activity study of LVV-hemorphin-7: angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase. J Pharmacol Exp Ther. 2003;305(1):205-11.

150. Matsumoto H, Rogi T, Yamashiro K, Kodama S, Tsuruoka N, Hattori A, et al. Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells. Eur J Biochem. 2000;267(1):46-52.

151. Herbst JJ, Ross SA, Scott HM, Bobin SA, Morris NJ, Lienhard GE, et al. Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes. Am J Physiol. 1997;272(4 Pt 1):E600-6.

152. Tsujimoto M, Mizutani S, Adachi H, Kimura M, Nakazato H, Tomoda Y. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. Arch Biochem Biophys. 1992;292(2):388-92.

153. Beyer CE, Dwyer JM, Platt BJ, Neal S, Luo B, Ling HP, et al. Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation. Psychopharmacology (Berl). 2010;209(4):303-11.

154. da Cruz KR, Turones LC, Camargo-Silva G, Gomes KP, Mendonca MM, Galdino P, et al. The hemoglobin derived peptide LVV-hemorphin-7 evokes behavioral effects mediated by oxytocin receptors. Neuropeptides. 2017;66:59-68. 155. Chow LH, Chen YH, Lai CF, Lin TY, Chen YJ, Kao JH, et al. Sex Difference of Angiotensin IV-, LVV-Hemorphin 7-, and Oxytocin-Induced Antiallodynia at the Spinal Level in Mice With Neuropathic Pain. Anesth Analg. 2018;126(6):2093-101.

156. Moisan S, Harvey N, Beaudry G, Forzani P, Burhop KE, Drapeau G, et al. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu-Val-Val-hemorphin-7, a fragment of hemoglobin beta-chain in rats. Peptides. 1998;19(1):119-31.

157. Cejka J, Zelezna B, Velek J, Zicha J, Kunes J. LVV-hemorphin-7 lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats: radiotelemetry study. Physiol Res. 2004;53(6):603-7.

158. Fruitier-Arnaudin I, Cohen M, Bordenave S, Sannier F, Piot JM. Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity. Peptides. 2002;23(8):1465-70.

159. AR. G. Guidelines for the use of animals in biomedical research. Thromb Haemost. 1987;58(4):1078-84.

160. Mak P, Broussard C, Vacy K, Broadbear JH. Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat. J Psychopharmacol. 2012;26(4):532-42.

161. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. 1985;14(3):149-67.

162. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol. 1978;47(4):379-91.

163. Zhang TT, Xue R, Zhu L, Li J, Fan QY, Zhong BH, et al. Evaluation of the analgesic effects of ammoxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor. Acta Pharmacol Sin. 2016;37(9):1154-65.

164. Frussa-Filho R, Barbosa-Junior H, Silva RH, Da Cunha C, Mello CF. Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. Psychopharmacology (Berl). 1999;147(2):168-73.

165. Pinheiro SH, Zangrossi H, Jr., Del-Ben CM, Graeff FG. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. An Acad Bras Cienc. 2007;79(1):71-85.

166. Moreira FA, Guimaraes FS. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. Eur J Pharmacol. 2005;512(2-3):199-205.

167. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature. 1977;266(5604):730-2.

168. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. Nat Protoc. 2012;7(6):1009-14.

169. Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. Rev Bras Psiquiatr. 2013;35 Suppl 2:S112-20.

170. Wladimir Bocca Vieira de Rezende Pinto GMK VBV-L, Carolina Batista Ariza, Marimélia Porcionatto. TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: APLICAÇÕES E CONTRIBUIÇÕES NO ESTUDO DE DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS EM MODELOS ANIMAIS. RESBCAL. 2011;1(1):102-20.

171. Yang R, Smolders I, De Bundel D, Fouyn R, Halberg M, Demaegdt H, et al. Brain and peripheral angiotensin II type 1 receptors mediate renal vasoconstrictor and blood pressure responses to angiotensin IV in the rat. J Hypertens. 2008;26(5):998-1007.

172. Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. Hypertension. 2005;46(4):937-42.

173. de Oliveira LM, Rodrigues AG, da Silva EF, Cerqueira LB, Castro CH, Pedrino GR, et al. Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effect of Butanolic Fraction from Caryocar brasiliense Camb. Leaves in Rat Thoracic Aorta. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:934142. 174. YILDIZ OS, M.; GUL, H. Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. Artery Bypass. 2013;1(1):251-76. 175. Aston-Jones G, Cohen JD. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. Annu Rev Neurosci. 2005;28:403-50.

176. Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, Gorman JM. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. Biol Psychiatry. 1999;46(9):1205-18.

177. Stone EA, Lin Y, Sarfraz Y, Quartermain D. The role of the central noradrenergic system in behavioral inhibition. Brain Res Rev. 2011;67(1-2):193-208.

178. Szabo ST, de Montigny C, Blier P. Modulation of noradrenergic neuronal firing by selective serotonin reuptake blockers. Br J Pharmacol. 1999;126(3):568-71.

179. Cryan JF, Page ME, Lucki I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. Eur J Pharmacol. 2002;436(3):197-205.
180. Mason ST, Fibiger HC. Current concepts. I. Anxiety: the locus coeruleus disconnection. Life Sci. 1979;25(26):2141-7.

181. Ferry B, McGaugh JL. Clenbuterol administration into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in an inhibitory avoidance task. Neurobiol Learn Mem. 1999;72(1):8-12.

182. Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. Behav Neural Biol. 1992;58(1):16-26.

183. Babaev O, Piletti Chatain C, Krueger-Burg D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. Exp Mol Med. 2018;50(4):18.

184. Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. Brain Res. 1978;153(1):1-26.

185. Williams CL, Men D, Clayton EC. The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. Behav Neurosci. 2000;114(6):1131-44.

186. Adachi A, Shimizu N, Oomura Y, Kobashi M. Convergence of hepatoportal glucosesensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. Neurosci Lett. 1984;46(2):215-8.

187. Bhaskaran D, Freed CR. Changes in arterial blood pressure lead to baroreceptormediated changes in norepinephrine and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat nucleus tractus solitarius. J Pharmacol Exp Ther. 1988;245(1):356-63.

188. Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. Fundam Clin Pharmacol. 2004;18(6):601-7.

189. Ago Y, Hasebe S, Hiramatsu N, Hashimoto H, Takuma K, Matsuda T. Psychopharmacology of combined activation of the serotonin1A and sigma1 receptors. Eur J Pharmacol. 2017;809:172-7.

190. Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L. Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. Biol Psychiatry. 2007;61(2):145-53.

191. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2009. Peptides. 2010;31(12):2325-59.

192. Berrocoso E1 S-BP, Garzón J, Mico JA. Opiates as antidepressants. Curr Pharm Des. 2009;15(14):1612-22.

193. Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. Physiol Rev. 2009;89(4):1379-412.

194. Burghardt PR, Rothberg AE, Dykhuis KE, Burant CF, Zubieta JK. Endogenous Opioid Mechanisms Are Implicated in Obesity and Weight Loss in Humans. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(8):3193-201.

195. Bryant RA, Creamer M, O'Donnell M, Silove D, McFarlane AC. A study of the protective function of acute morphine administration on subsequent posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry. 2009;65(5):438-40.

196. Holbrook TL GM, Dye JL, Quinn K, & Dougherty AL. Morphine Use after Combat Injury in Iraq and Post-Traumatic Stress Disorder. New england journal of medicine. 2010;362:110-7.

197. Bershad AK, Jaffe JH, Childs E, de Wit H. Opioid partial agonist buprenorphine dampens responses to psychosocial stress in humans. Psychoneuroendocrinology. 2015;52:281-8.

198. Martin del Campo AF, McMurray RG, Besser GM, Grossman A. Effect of 12-hour infusion of naloxone on mood and cognition in normal male volunteers. Biol Psychiatry. 1992;32(4):344-53.

199. Petrovic P, Pleger B, Seymour B, Kloppel S, De Martino B, Critchley H, et al. Blocking central opiate function modulates hedonic impact and anterior cingulate response to rewards and losses. J Neurosci. 2008;28(42):10509-16.

200. Zhang JJ1 LX, Yu LC. Influences of morphine on the spontaneous and evoked excitatory postsynaptic currents in lateral amygdala of rats,. Physiol Res. 2016;65(1):165-9.

201. Knoll AT, Meloni, E.G., Thomas, J.B., Carroll, F.I., Carlezon Jr., W.A., Anxiolyticlike effects of k-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2007;323:838-45.

202. P. Huang TY, J.V. Aldrich, J. Tunis, C. Perry, L.Y. Liu-Chen. Two short-acting kappa opioid receptor antagonists (zyklophin and LY2444296) exhibited different behavioral effects from the long-acting antagonist norbinaltorphimine in mouse anxiety tests. Neurosci Lett. 2016; 615 15–20.

203. Bruchas MR, Schindler, A.G., Shankar, H., Messinger, D.I., Miyatake, M., Land, B.B., Lemos, J.C., Hagan, C.E., Neumaier, J.F., Quintana, A., Palmiter, R.D., Chavkin, C.,. Selective p38a MAPK deletion in serotonergic neurons produces stress resilience in models of depression and addiction. Neuron. 2011;71(3):498-511.

204. Bruchas MR, Land BB, Lemos JC, Chavkin C. CRF1-R activation of the dynorphin/kappa opioid system in the mouse basolateral amygdala mediates anxiety-like behavior. PLoS One. 2009;4(12):e8528.

205. Alexia V. Williamsa AL-M, Crystal V. Armstronga, Stephanie Ramos-Maciela, Vanessa A. Miniea, Brian C. Trainora. Acute inhibition of kappa opioid receptors before stress blocks depressionlike behaviors in California mice. Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry. 2018;86:166-74.

206. Wee S, Koob GF. The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. Psychopharmacology (Berl). 2010;210(2):121-35.

207. Knoll AT, Carlezon WA, Jr. Dynorphin, stress, and depression. Brain Res. 2010;1314:56-73.

208. Tenore PL. Psychotherapeutic benefits of opioid agonist therapy. J Addict Dis. 2008;27(3):49-65.

209. Saulo C. Ribeiro SEK, Yolanda R. Smith, Christian S. Stohler, Jon-Kar Zubieta. Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and A-opioid receptors. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 2005;29:1264 – 80.

210. Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, et al. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. Nat Genet. 2000;25(2):195-200.

211. Lutz PE, Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. Trends Neurosci. 2013;36(3):195-206.

212. Devoize JL, Rigal F, Eschalier A, Trolese JF, Renoux M. Influence of naloxone on antidepressant drug effects in the forced swimming test in mice. Psychopharmacology (Berl). 1984;84(1):71-5.

213. Svingos AL, Chavkin C, Colago EE, Pickel VM. Major coexpression of kappa-opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. Synapse. 2001;42(3):185-92.

214. Castren E, Rantamaki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. Dev Neurobiol. 2010;70(5):289-97.

215. Harburg GC, Hall FS, Harrist AV, Sora I, Uhl GR, Eisch AJ. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. Neuroscience. 2007;144(1):77-87.

216. Cominski TP, Turchin CE, Hsu MS, Ansonoff MA, Pintar JE. Loss of the mu opioid receptor on different genetic backgrounds leads to increased bromodeoxyuridine labeling in the dentate gyrus only after repeated injection. Neuroscience. 2012;206:49-59.

217. Zadina JE, Kastin AJ, Kersh D, Wyatt A. Tyr-MIF-1 and hemorphin can act as opiate agonists as well as antagonists in the guinea pig ileum. Life Sci. 1992;51(11):869-85.

218. Sardinia MF, Hanesworth JM, Krebs LT, Harding JW. AT4 receptor binding characteristics: D-amino acid- and glycine-substituted peptides. Peptides. 1993;14(5):949-54.

219. Mukaddam-Daher S, Yin YL, Roy J, Gutkowska J, Cardinal R. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. Hypertension. 2001;38(2):292-6.

220. Ondrejcakova M, Ravingerova T, Bakos J, Pancza D, Jezova D. Oxytocin exerts protective effects on in vitro myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. Can J Physiol Pharmacol. 2009;87(2):137-42.

221. Wsol A, Cudnoch-Je drzejewska A, Szczepanska-Sadowska E, Kowalewski S, Dobruch J. Central oxytocin modulation of acute stress-induced cardiovascular responses after myocardial infarction in the rat. Stress. 2009;12(6):517-25.

222. Chansel D, Vandermeersch S, Oko A, Curat C, Ardaillou R. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca2+ in mesangial cells. Eur J Pharmacol. 2001;414(2-3):165-75.

223. Yang HY, Erdos EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. Biochim Biophys Acta. 1970;214(2):374-6.

224. Almeida AP, Frabregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. Braz J Med Biol Res. 2000;33(6):709-13.

225. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. Regul Pept. 2000;91(1-3):45-62.

226. Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. Hypertension. 2001;37(2 Pt 2):703-9.

227. Jiang T, Gao L, Lu J, Zhang YD. ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. Curr Neuropharmacol. 2013;11(2):209-17.

228. Martins RTea. Receptores opioides até o contexto atual. Rev Dor. 2012;13(1):75-9.

229. Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. Nat Med. 2003;9(8):1003-8.

230. Pathan H, Williams J. Basic opioid pharmacology: an update. Br J Pain. 2012;6(1):11-6.

231. Tedford HW, Zamponi GW. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. Pharmacol Rev. 2006;58(4):837-62.

232. Wang HB, Zhao B, Zhong YQ, Li KC, Li ZY, Wang Q, et al. Coexpression of delta- and muopioid receptors in nociceptive sensory neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(29):13117-22.

233. Luscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. Nat Rev Neurosci. 2010;11(5):301-15.

234. Nockemann D, Rouault M, Labuz D, Hublitz P, McKnelly K, Reis FC, et al. The K(+) channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia. EMBO Mol Med. 2013;5(8):1263-77.

235. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, et al. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. J Biol Chem. 1995;270(51):30290-3.

ANEXO 1

Contents lists available at ScienceDirect

Neuropeptides



journal homepage: www.elsevier.com/locate/npep

The hemoglobin derived peptide LVV-hemorphin-7 evokes behavioral effects mediated by oxytocin receptors



Kellen Rosa da Cruz^a, Larissa Córdova Turones^a, Gabriel Camargo-Silva^a, Karina Pereira Gomes^a, Michelle Mendanha Mendonça^a, Pablinny Galdino^b, Christielly Rodrigues-Silva^c, Robson Augusto Souza Santos^d, Elson Alves Costa^b, Paulo Cesar Ghedini^c, Danielle Ianzer^a, Carlos Henrique Xavier^a,*

^a Laboratory of Cardiovascular Physiology and Therapeutics, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Laboratory of Pharmacology of Natural Products, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

c Laboratory of Pharmacology and Molecular Biochemistry, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^d Department of Physiology and Biophysics, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords: LVV-h7 Hemorphin Hemoglobin IRAP Oxytocin Anxiety Depression Stress

ABSTRACT

LVV-hemorphin-7 (LVV-h7) is bioactive peptide resulting from degradation of hemoglobin β -globin chain. LVVh7 is a specific agonist of angiotensin IV receptor. This receptor belongs to the class of insulin-regulated aminopeptidases (IRAP), which displays oxytocinase activity. Herein, our aims were to assess whether: i) LVV-h7 modifies centrally organized behavior and cardiovascular responses to stress and ii) mechanisms underlying LVV-h7 effects involve activation of oxytocin (OT) receptors, probably as result of reduction of IRAP proteolytic activity upon OT. Adult male Wistar rats (270-370 g) received (i.p.) injections of LVV-h7 (153 nmol/kg), or vehicle (0.1 ml). Different protocols were used: i) open field (OP) test for locomotor/exploratory activities; ii) Elevated Plus Maze (EPM) for anxiety-like behavior; iii) forced swimming test (FST) test for depression-like behavior and iv) air jet for cardiovascular reactivity to acute stress exposure. Diazepam (2 mg/kg) and imipramine (15 mg/kg) were used as positive control for EPM and FST, respectively. The antagonist of OT receptors (OTr), atosiban (1 and 0,1 mg/kg), was used to determine the involvement of oxytocinergic paths. We found that LVV-h7: i) increased the number of entries and the time spent in open arms of the maze, an indicative of anxiolysis; ii) provoked antidepressant effect in the FS test; and iii) increased the exploration and locomotion; iv) did not change the cardiovascular reactivity and neuroendocrine responses to acute stress. Also, increases in locomotion and the antidepressant effects evoked by LVV-h7 were reverted by OTr antagonist. We conclude that LVV-h7 modulates behavior, displays antidepressant and anxiolytic effects that are mediated in part by oxytocin receptors.

1. Introduction

LVV-hemorphin-7 (LVV-h7) (Leucine-Valine-Valine-Tyrosine-Proline-Tryptophan-Threonine-Glutamine-Arginine-Phenylalanine) is a peptide belonging to the hemorphins family that results from the degradation of β -globin (Nydahl et al., 2003; Sanderson et al., 1996). Seminal studies found that α and β -globins mRNAs are expressed in the brain of rat embryos, suggesting that central nervous system is able to synthetize them (Ohyagi et al., 1994). Later, Nydahl and colleagues detected brain hemorphins as a degradation product of these brainsynthetized globins (Nydahl et al., 2003).

The study of the LVV-h7 molecular structure revealed that its synthesis arises from the catalytic action of chymotrypsin-like enzyme upon β -globin chain (Glamsta et al., 1992). High molecular weight

E-mail address: carlosxavier@ufg.br (C.H. Xavier).

http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2017.09.002

Received 2 June 2017; Received in revised form 25 August 2017; Accepted 25 September 2017 Available online 28 September 2017 0143-4179/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; ACE 2, angiotensin converting enzyme 2; AT4, angiotensin IV; AT4r, Angiotensin IV receptor; ATS, Atosiban; BP, Blood pressure; cDNA, Ciclic desoxyribonucleic acid; DNA, Desoxyribonucleic acid; ECG, Electrocardiography; EPM, Elevated Plus Maze; FST, Forced swimming test; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phos-phate dehydrogenase; GMP, Guanosin 3', 5' – monophosphato ciclic; HR, Heart rate; i.p., Intraperitoneal; i.v., Intravenous; IRAP, Insulin regulated aminopeptidases; MAP, Mean arterial pressure; mRNAs, Messenger; NO, Nitric oxide; OF, Open Field; OT, Oxytocin; OTr, Oxytocin receptor; PAP, Pulsed arterial pressure; PCR, Polimerase chain reaction; PKG, Protein kinase G; SEM, Standard error mean; VHE, Vehicle

^{*} Corresponding author at: Esperança Avenue, Campus II (Samambaia), Laboratory of Cardiovascular Physiology and Therapeutics, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, ICBII, Room 224, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil.

aspartic proteinase enzyme can be responsible for producing LVV-h7 (Barkhudaryan et al., 1993). Additional assays with endogenous lysosomal proteases demonstrated that the aspartic proteinase enzymes, cathepsins D and L, play the catalytic function that generate LVV-h7 (Fruitier et al., 1999). Further studies showed that other enzymes could be involved in the synthesis of LVV-h7 in blood stream and specific tissues (Dejouvencel et al., 2010). In addition to being found in the blood, hemorphins are present in different organs and brain regions, such as hypothalamus, adrenal and pituitary glands (Barkhudaryan et al., 1993; Cerpa-Poljak et al., 1997; Chang et al., 1980; Glamsta et al., 1992; Karelin et al., 1994; Moeller et al., 1997; Piot et al., 1992; Sanderson et al., 1994; Yatskin et al., 1998).

In vitro studies showed high stability of LVV-h7 in human tissues and plasma (Lantz et al., 1991; Sanderson et al., 1996), whereas in vivo studies demonstrated that enzymes such as amastatin-sensitive aminopeptidase of extracellular fluid degrades this peptide (Nydahl et al., 2003). With regard to its mechanistic features, besides inhibiting the catalytic activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) (Fruitier-Arnaudin et al., 2002), LVV-h7 has been reported as a high affinity specific agonist of angiotensin IV (AT4) receptor (AT4r), a G-protein coupled receptor (Moeller et al., 1999; Moeller et al., 1997). Because of being a transmembrane enzyme and of presenting a catalytic domain, AT4r belongs to the class of insulin-regulated aminopeptidases (IRAP) that further displays peptideolytic activity (Keller et al., 1995). This catalytic activity may be allosterically inhibited in the presence of AT4r agonists, AT4 and LVV-h7 (Lew et al., 2003; Moeller et al., 1997).

In spite of the controversial results upon cardiovascular system (Cejka et al., 2004; Moisan et al., 1998; Yang et al., 2008), LVV-h7 central effects (Allen et al., 1998; Gomes et al., 2010; Moeller et al., 1998; Nydahl et al., 2003) may be mediated by oxytocin (OT) (Tomizawa et al., 2003). In view of the effects depicted in the literature and considering that agonists evoke allosteric inhibition that would reduce AT4r aminopeptidases and peptidolytic activities, it is worth hypothesizing that LVV-h7 may display important biological activities upon different systems, including cardiovascular, neuroendocrine and centrally-mediated effects. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether LVV-h7 would affect: i) the anxiety-like and depression-like behaviors; ii) locomotion/exploration; iii) cardiovascular and neuroendocrine reactivity to acute emotional stress. We also checked whether these effects exerted by LVV-h7 would depend on the activity of OT receptors (OTr) probably raised by increases in OT levels, as a result of reductions in the OT degradation by an allosteric inhibition of AT4r catalytic domain (Tsujimoto et al., 1992).

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted in Wistar rats (270–370 g). Procedures involving animals were in agreement with Giles (Giles, 1987). Experimental protocols were in agreement with standards animals use after approval by animal ethics committee of Federal University of Goiás, Brazil (Protocol 090/14). Animals were housed in individual cages (47 cm \times 31 cm \times 16 cm), in acclimatized rooms (temperature 22–24 °C) with light/dark cycle of 12/12 h and water and food open access (ad libitum).

2.2. Drugs and reagents

Diazepam (Sigma, St. Louis MO, USA) (2 mg/kg) was used as positive control, since it is well known for producing anxiolysis (Calcaterra and Barrow, 2014). Imipramine (Sigma, St. Louis MO, USA) (15 mg/kg) was the antidepressant used as positive control in depression-like behavior (Porsolt et al., 1978). The vehicle chosen was NaCl (0.9%). The dose of choice (153 nMol) for LVV-h7 (GenOne, Brazil) was based in a previous study performed by Ianzer et al. (Ianzer et al., 2006). Synthetic Oxytocin[®] (UCB-animal health) 50 μ g/kg (Mak et al., 2012) and the antagonist of oxytocin receptor Atosiban-Tractocile[®] (Ferring Pharmaceutics, Switzerland) at 1 and 0.1 mg/kg (Mak et al., 2012) were used to evaluate the involvement of oxytocinergic paths.

2.3. Elevated Plus Maze

This protocol was performed as described by Pinheiro et al. (2007) (Pinheiro et al., 2007). The Elevated Plus Maze (EPM) is a device elevated 50 cm above the ground consisting of two open arms (50×10 cm) without sidewalls, perpendicular to two closed arms of the same dimension. Closed arms are surrounded by sidewalls of 40 cm height. A small wall of 1 cm is coupled around the open arms to avoid the fall of the animals from equipment. Animals received i.p. injections of LVV-h7, vehicle (negative control; 0.9% NaCl) or diazepam (positive control; 2 mg/kg). EPM assessments were run 30 min after drug administration. The rats were placed on the closed arms), and were free to explore the apparatus for a 5 min recording time. The experiments were record and later analyzed. After each session, the animal returned to its home cage and the EPM was clean (10% alcohol) to avoid interference olfactory clues.

2.4. Locomotor/exploratory activity

To evaluate locomotor and exploratory activities we used the method described by Moreira et al. (Moreira and Guimaraes, 2005). Animals were placed in a round open field (OF), which is divided into quadrants (23 cm \times 15.5 cm) with identical areas. Animals received (i.p.) LVV-h7, vehicle (0.9% NaCl) or diazepam (2 mg/kg), and were assessed in the OF 30 min after drug administration. The rats were placed in the central quadrant of the OF and were free to explore the apparatus for 5 min. A video camera was fixed above the field to record behavior. At the end of the experiments, the recording files were analyzed. We assessed crossing, grooming, rearing, immobility time and time spent at center and periphery of the field. After each session, animal returned to its home cage and the field was clean (10% alcohol) to avoid interference of olfactory clues.

2.5. Forced swimming test

Forced swimming test (FST) was adapted from that model originally proposed by Porsolt et al. (Porsolt et al., 1977). In rats, a previous exposure to forced swim is required to discern antidepressant-like activity (Slattery and Cryan, 2012). Then, 24 h before test, rats were placed inside a PVC cylinder, 24 cm in diameter by 60 cm height, filled by a water column of 42 cm, at 25 ± 1 °C, for 15 min. After each use, cylinders were cleaned with 10% alcohol to avoid olfactory clues. Subsequently, animals received i.p. injections (0.1 ml) of drugs or vehicle [NaCl 0.9%; imipramine 15 mg/kg; LVV-h7 153nMol/kg; oxytocin 50 µg/kg; atosiban 1 mg/kg + LVV-h7 153 nMol/kg or atosiban 1 mg/kg + oxytocin 50 µg/kg], 24 h before test. At the second day (test), animals received second and third i.p. injections of vehicle or drugs 5 h and 1 h before the test, respectively. During the test, rats underwent forced swim for 6 min, which was recorded with a camera for later analysis.

2.6. Surgical procedures

2.6.1. Anesthesia

For surgical procedures, rats were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich, USA) at the dose of 250 mg/kg (i.p.). Supplements were given at lower doses (50 mg/kg i.p.) during the surgery, when necessary for maintaining of the anesthetic depth.

2.6.2. Electrode positioning for electrocardiogram

The method for implantation of electrocardiography (ECG) electrodes was similar to that firstly described (Sgoifo et al., 1996). After anesthesia, free endings of two electrodes previously fixed in a RJ45 phone plug were implanted: one was attached to the dorsal surface of the xiphoid process and the other was positioned in the cranial third of the mediastinum, behind the manubrium of the sternum, and fixed by wire in the sternocleidomastoid muscles. Plugs were connected to Powerlab (ADInstruments) acquisition system to record ECG R-R intervals from which HR was calculated.

2.6.3. Catheterization of femoral artery and vein

After the positioning of the electrode, an unilateral incision in the inguinal region was performed for dissection of the femoral vascularnervous bundle. Tygon 10 mm (2.5 cm for vein and 4 cm for artery) connected to Tygon 50 mm (15 cm) tubes were filled with 1% heparinized isotonic saline (Parinex*, Hipolabor, MG/Brazil). They were then implanted and secured by ligaments in the femoral vein and artery. Cannulation of the femoral artery allowed access to the abdominal aorta for recording blood pressure (BP) and venous cannula was used for drug injection. The free end of the cannula was sealed with a pin and exteriorized subcutaneously into the interscapular region. After the surgical procedure, rats received an intramuscular injection of the analgesic and antiinflammatory Flunixin* (1 mg/kg) (Chemitec, SP/ Brazil) and were housed in individual cages for 24 h recovery period.

2.7. Cardiovascular parameters recording

The cannula inserted into the artery was coupled to a pressure transducer connected to an amplifier and to an analog-to-digital conversion system for data acquisition Powerlab 4/20 (ADInstruments – Australia). The implanted ECG electrode was connected to the Acquisition system. Through the LabChart Pro 7.2 software, the pulsed arterial pressure (PAP) oscillations were obtained, allowing for calculating the mean arterial pressure (MAP), and the R-R intervals of the electrocardiogram allowed to calculate the HR.

2.8. Evaluation of cardiovascular and neuroendocrine reactivity to stress

The evaluation of the cardiovascular reactivity to stress was as previously described (Xavier et al., 2009). The experimental model consists of keeping the animal in an acrylic container and subjecting it to stream of air. The air jet is directed to the rat's muzzle at a constant volume of 10 l/min.

The experiment was performed 24 h after the surgical procedures. The cardiovascular parameters were monitored until stabilization. The 10 min period just before starting procedures were considered as baseline. Subsequently, the arterial blood sample (0.5 ml) was made for posterior cortisol dosing; the same volume of isotonic saline was injected to recovery of blood volume. Then, the animal was stimulated to enter the container and a cover was placed on the back of the container to prevent animal escaping. After 10 min of restraint, LVV-h7 or vehicle was injected (i.v.). Following, the air pump (10 L/min) was started and air jet was offered for 10 min. Just after the end of the air jet, new arterial blood collection was made for subsequent dosing of cortisol (by chemiluminescence). Isotonic saline was injected in equivalent volume for replacement. The rat remained in the container for recovery during the subsequent 10 min period. At the end, the container was opened, thus allowing the animal to exit. The MAP and HR values were sampled every 2 min, throughout the registration period.

2.9. Relative quantification of β -globin mRNA

Total RNA was obtained from brain regions (hypophysis, prefrontal cerebral cortex, amygdala, hypothalamus and hippocampus) and bone marrow using TRIzol[™] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

according to the manufacturer's protocol. RNAs (1 µg) were submitted at transcriptase reverse technique with oligo (dT)₂₀ by using ThermoScript[™] RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reactions were accomplished in 20 µl of buffer containing 50 mM tris acetate (pH 8.4), 75 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 1 mM dNTP, 5 mM DTT, 40 U RNaseOUT, and 3 U ThermoScript reverse transcriptase at 55 °C for 1 h. cDNA quality was spectrophotometrically assessed with 260/280 wavelength; and then 1 µL each sample was utilized to amplification in a thermal cycler (Applied Biosvstems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Foster City, CA, USA). PCR was performed in 30 µL reaction buffer containing 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1.5 U Tag DNA polymerase (Invitrogen), 0.5 μM rat βglobin oligonucleotides 5'-ATGGCCTGAAACACTTGGACAACC-3'/5'-TGGTGGCCCAACAACAATCACAATC-3' (forward/reverse) (GenBank NM_033234; He et al., 2010); and 0.2 µM primers for rat GAPDH, housekeeping gene as internal control, 5'-GTGATGGGTGTGAACCAC-GA-3'/5'-ACTTGGCAGGTTTCTCCAGG-3' (forward/reverse) (GenBank X02231).

PCR analyses for investigation of cDNA level β -globin were performed in triplicate. Amplification linear stage in each sample was reached by cycling conditions of 2 min at 94 °C, 28 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at melting temperature and 1 min at 72 °C, and final extension for 3 min at 72 °C. Melting temperature of primers was 60 °C and 59 °C for β -globin and internal control, respectively. DNA products were loading onto 1.5% agarose gel stained 0.5 µg/mL ethidium bromide. Electrophoretic images were obtained after gel exposition at ultraviolet light and photodocumented by device ImageQuant[™]LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK). Pictures were scanned and optical density of bands quantified by ImageJ vesion 1.50i (NIH, USA). Data for each tissue the mRNA level β -globin was normalized against GAPDH band signal from each respective sample.

2.10. Statistics

The results were expressed as mean \pm SEM. Unpaired Student's *t*-test or Analysis of Variance (one-way) was used when appropriate (GraphPad Prism 6.0 Software). The level of significance was fixed at p < 0.05.

3. Results

The results obtained from the EPM are showed in Fig. 1. Compared to vehicle, LVV-hemorphin-7 and oxytocin increased the time spent in open arms and consequently reduced the time spent in closed arms. As expected, diazepam also increased the time spent in open arms and decreased the time in the closed arms (Fig. 1A and B). The risk assessment, counted as the time spent in the center of the EPM, did not differ among vehicle, LVV-h7 and oxytocin. Diazepam provoked anxiolytic effect and reduced the risk analysis when compared to negative control (vehicle) (Fig. 1E).

There were no differences between diazepam and LVV-h7 in the time spent in open and closed arms, as well as, in the number of entries in open arms, which strongly indicates that LVV-h7 is able to provoke anxiolysis. When compared to the vehicle treated group, LVV-h7, diazepam e oxytocin significantly increased the number of entries in the open arms (Fig. 1C). The changes observed in the number of entries and time in the arms of the maze evoked by LVV-h7 demonstrate an anxiolytic effect and meet the results of the OF paradigm: the decapeptide increased the time spent in the center and decreased in the periphery (Fig. 2A and B), when compared to vehicle. LVV-H7 also increased the grooming (Fig. 2F).

Intriguingly, the antagonism of oxytocin receptors by atosiban potentiated the increase in the time spent in the open arms and the decreased in the time spent in the closed arms promoted by LVV-h7 (Fig. 1A and B), without affecting the number of entries in the open arms (Fig. 1C). The increase in time spent at the center and the



Fig. 1. Anxiolytic-like effect evaluation in Elevated Plus Maze (EPM). (A) Time spent in the open arms; (B) time spent in the closed arms; (C) number of entries in the open arms; (D) number of entries in the closed arms; (E) time spent in the center of the EPM (risk assessment); (F) total entries. Control (vehicle) NaCl 0.9%, n = 9; diazepam 2 mg/kg, n = 6; LVV-h7 153 nMol/kg, n = 7; oxytocin 50 µg/kg, n = 10; ATS (atosiban 0.1 mg/kg) + LVV-h7 153 nMol/kg, n = 5). Results are expressed as means ± SEM. * vs vehicle; &vs LVV-h7; # vs OT (p < 0.05).

reduction in the time spent at the periphery of the OF promoted by LVV-h7 were reverted by the previous treatment of atosiban (Fig. 2A and B). These results suggest that the anxiolytic-like but not locomotion effects promoted by LVV-h7 are independent on the activation of oxytocin receptors.

The number of entries in the closed arms and the total number of entries (entries in open and closed arms) of the EPM are indexes of locomotion (de Rezende Pinto GMK et al., 2011), which was significantly increased in the group treated with LVV-h7 and diazepam, when compared to the control (Fig. 1F). These results are in agreement with those findings of immobility time and the number of crossings among squares of OF. Diazepam did not change the number of crossings and immobility time in the OF. The immobility time was significantly reduced by the treatment with LVV-h7 and by oxytocin, in comparison with control group (Fig. 2C and D). It indicates that LVV-h7 (153 nMol/kg) changes the locomotion of rats.

While the number of rearing was unaltered by diazepam, it was increase in the group treated with LVV-h7 (Fig. 2E). The results from EPM and OF demonstrate that LVV-h7 causes an increase in the

locomotion/exploration of rats (as evidenced by the increase in the number of entries in the closed arms and total number of entries in the EPM, by the increase in the number of crossings, by reduction in immobility time and by the increase in rearing episodes in the OF).

Atosiban reverted the increase in the number of rearing evoked by LVV-h7 (Fig. 2E), but did not change the number of crossings (Fig. 2A). Similarly, the reduction in the immobility time promoted by the LVV-h7 was unaffected by the co-treatment with atosiban (Fig. 2D). The grooming was reduced in the group previously treated with atosiban (Fig. 2F). These results suggest that only the changes in the exploration promoted by LVV-h7 depend on the activation of oxytocin receptors.

The results of depression-like behavior are presented in Fig. 3. As expected, the immobility time during forced swimming test was reduced in the group treated with the antidepressant imipramine (positive control), which was also evident in the groups injected with LVVh7 and oxytocin, when compared to vehicle. The reduction in immobility time in the FST indicates an antidepressant-like effect evoked by LVV-h7. Interestingly, the antagonism of OTr with atosiban (1 mg/kg) not only reverted the response evoked by LVV-h7 FST, but also

K.R. da Cruz et al.



Fig. 2. Locomotor/exploratory activities in the Open Field (OF). (A) Time spent in the central region; (B) time spent in the periphery; (C) crossings; (D) immobility time; (E) rearing; (F) grooming. Control (vehicle) NaCl 0.9%, n = 11; diazepam 2 mg/kg, n = 7; LVV-h7 153 nMol/kg, n = 10; oxytocin 50 µg/kg, n = 6; ATS (atosiban 0.1 mg/kg) + LVV-h7 153 nMol/kg, n = 6; ATS (atosiban 0.1 mg/kg) + (oxytocin 50 µg/kg, n = 7). Results expressed as means \pm SEM. * vs vehicle; &vs LVV-h7; # vs OT (p < 0.05).

increased the immobility time (Fig. 3). These results demonstrate the involvement of oxytocin receptors in the antidepressant-like effect promoted by LVV-h7.

The evaluation of cardiovascular reactivity to acute stress exposure demonstrated that the treatment with LVV-h7 was not able to alter the amplitudes of pressor response (Fig. 4A) and positive chronotropism (Fig. 4B) evoked by restraint and air jet paradigms. Moreover, acute stress exposure increased the plasma cortisol levels, as expected. However, the treatment with LVV-h7 did not alter the increases in plasma cortisol levels in response to this acute emotional stress (Fig. 5).

The β -globin transcripts were found in all brain regions collected. Relative level of transcripts showed significant differences among samples. mRNA density was higher in bone marrow when compared with other tissues (p < 0.001) (Fig. 6). Hypophysis presented higher levels of β -globin mRNA when compared with cortex, amygdala, hypothalamus and hippocampus (p < 0.001). β -globin relative expression in bone marrow represented a positive control of tests.

4. Discussion

Our main findings, obtained in EPM and OF, indicate that LVV-h7 is able to evoke anxiolytic-like effect and to increase locomotion/exploration. Moreover, outcomes from FST show an antidepressant-like effect evoked by LVV-h7. Studies have shown that LVV-h7 is a specific agonist of AT4r (Gomes et al., 2010; Nydahl et al., 2003). In vitro data indicated that LVV-h7 binds to the AT4r receptor, competing with AT4. In the brainstem, AT4r binding pattern was found to be identical between LVV-h7 and AT4 (Moeller et al., 1997). AT4r ligands other than AT4 may be considerably more stable with regard to enzymatic degradation (Axen et al., 2006). The AT4 receptor is classified as an IRAP and is composed by a catalytic domain with aminopeptidases activity (Albiston et al., 2001; Chai et al., 2004). The aminopeptidases activity exerted by the IRAP catalytic site of AT4r (de Gasparo et al., 1995) is capable of degrading several neuropeptides such as vasopressin and oxytocin (Lew et al., 2003). Actions of AT4r agonists may prolong halflife of neuropeptides, thus allowing to them achieving central AT4r



Fig. 3. Immobility time during forced swimming test (FST). Control (vehicle) NaCl 0.9%, n = 7; imipramine 15 mg/kg, n = 4; LVV-h7 153nMol/kg, n = 6; oxytocin 50 µg/kg, n = 4; ATS (atosiban 1 mg/kg) + LVV-h7 153 nMol/kg, n = 4; ATS (atosiban 1 mg/kg) + (oxytocin 50 µg/kg, n = 4). Results expressed as means \pm SEM. * vs vehicle; & vs LVV-h7; # vs OT (p < 0.05).

(Vauquelin et al., 2002). In vivo study detected increases in oxytocin concentration in the central nucleus of the amygdala following administration of AT4 (Beyer et al., 2010). Evidences for reductions in the catalytic/aminopeptidases activity in the presence of AT4 and LVV-h7 (De Bundel et al., 2009; Moeller et al., 1997) support the idea that the catalysis of several molecules is inhibited during activation of AT4r. In the light of these evidences, it is worth hypothesizing that LVV-h7 would reach its central effects by reducing the degradation of endogenous peptides such as oxytocin.

Oxytocin is a nonapeptide widely known for mediating social interaction (Insel and Fernald, 2004), reduce fear, anxiety (Lee et al., 2009; McCarthy et al., 1996), depressive behavior (Lee et al., 2009; McQuaid et al., 2014) and responses to stress (Jezova et al., 1995) in



Fig. 5. Plasma cortisol levels before (basal) and after acute stress exposure (Air jet) of animals injected with vehicle (control – NaCl 0.9% saline, n = 6) or LVV-h7 (153 nMol/kg, n = 8). Results are expressed as means \pm SEM. * vs vehicle basal; & vs LVV-h7 basal. (p < 0.05).

humans and experimental models (Kirsch et al., 2005; Kormos and Gaszner, 2013). Recently, it was identified that oxytocin blocks the effect of corticotropin-releasing hormone (CRH) on cortical cells by releasing corticotropin-releasing-hormone-binding protein (CRHBP), exerting an anxiolytic-like effect (Li et al., 2016). In addition, oxytocin is known for inhibiting neurons of amygdala, which reduces fear and anxiety behaviors (Kirsch et al., 2005). Recent study reported that an-xiolytic-like effect exerted by oxytocin was reverted by GABA_A receptor antagonist (bicuculline) (Smith et al., 2016). Therefore, oxytocinergic mechanisms may control behavior through different paths and targets.

It has been demonstrated that peripheral and central injections of LVV-h7 evoke anti-hyperalgesia of at the spinal level, as revealed by paw withdrawal test (Cheng et al., 2012). The anti-hyperalgesic effect promoted by LVV-h7, as demonstrated by increases in latencies time during paw withdrawal test, may depend on activation of oxytocin



Fig. 4. Cardiovascular reactivity to acute stress trial. Panels A and C show mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) variations over the course of the experiment. Panels B and D show mean maximal changes in MAP and HR obtained during air jet stress. Control/VHE (vehicle) 0.9%, n = 6; LVV-h7 153nMol/kg, n = 8. Results expressed as means \pm SEM. (p < 0.05).



Fig. 6. Analysis of β -globin mRNA relative abundance by semi-quantitative polymerase chain reaction in the hypophysis, prefrontal cerebral cortex, amygdala, hypothalamus, hippocampus and bone marrow. Data represent densitometric measurement ratio between target transcript and internal control (GAPDH) obtained from electrophoretic image of three independent experiments. Results expressed as means \pm SEM. $\#^{\#\#}p < 0.001$ when compared with bone marrow; $*^{**}p < 0.001$ when compared with bone marrow; $*^{**}p < 0.001$ when compared with bone marrow; $*^{**}p < 0.001$ when compared with bone marrow.

receptor because this effect was reverted in the presence of atosiban (Lok-Hi Chow et al., 2013). This meets the idea that the activation of AT4r probably inhibits the oxytocinases activity and arises the LVV-h7 as promising molecule, since it probably produces behavioral effects and interferes with central oxytocin metabolism, by concomitantly acting upon AT4r/IRAP – as an agonist – and as an allosteric enzymatic inhibitor.

In this study, we verified that anxiolytic-like effect promoted LVVh7 is independent on activation of oxytocin receptors. Such effect may be consequence of intracellular signaling triggered by the binding of LVV-h7 to AT4r. Agonism of AT4r increases intracellular NO and cGMP levels (Coleman et al., 1998; Patel et al., 1998) suggesting that the NO/ GMPc/PKG pathway is involved in intracellular AT4r receptor signaling. In fact, the increase in the intracellular concentration of NO is directly proportional to cGMP levels, which activates PKG and increases K⁺ efflux, promoting neuronal hyperpolarization (Cunha et al., 2010; Cury et al., 2011). It is possible that this occurs in regions composing the limbic system, so that the agonism of AT4r by LVV-h7 would inhibit neural pathways underlying anxiety through neuronal hyperpolarization mediated by the NO/cGMP/PKG pathway. This would allow for a prominent anxiolytic-like effect.

AT4r activation increases intracellular Ca²⁺ levels (Chansel et al., 1998; Handa et al., 1999). At the level of the neuronal endings, this boosts the release of neurotransmitters (Jackman and Regehr, 2017), including dopamine and serotonin in regions that are part of limbic system, substantia nigra and hippocampus. Such central regions express AT4r (Chai et al., 2000a, 2000b; Chai et al., 2004; von Bohlen und Halbach, 2003). Therefore, the increased release of monoamines mediated by AT4r activation may be the mechanism through which LVV-h7 reaches anxiolytic-like and antidepressant-like effects. In addition, LVV-h7 displays opioid activity at central level (Glamsta et al., 1991; Gomes et al., 2010; Piot et al., 1992) and its behavioral effects may also be related to the activation of these receptors. In fact, LVV-h7 is known as an μ -opioid agonist (Gomes et al., 2010; Piot et al., 1992). Preclinical and clinical studies found that agonists of opioid receptors promoted anxiolysis and antidepressant effects (Nummenmaa and Tuominen, 2017). Therefore, the activation of opioid receptors, especially the μ -opioid subtype, may be an additional mechanism involved in the effects evoked by LVV-h7.

In vitro studies have shown that LVV-h7 is highly stable in plasma and in human tissues (Lantz et al., 1991; Sanderson et al., 1996). It has been showed that LVV-h7 is able to potentiate bradykinin effects by 10 min following its intravenous injection (Ianzer et al., 2006). Additionally, it has been demonstrated in spontaneously hypertensive rats that the effects of LVV-h7 are long lasting, found up to 180 min after its intraperitoneal injection (Cejka et al., 2004). As previously stated, LVVh7 is also an ACE inhibitor (Fruitier-Arnaudin et al., 2002; Lantz et al., 1991: Zhao et al., 1994). Inhibition of conversion of angiotensin I to angiotensin II favors the formation of angiotensin 1–7 through the increased availability of substrates for ACE2 (Donoghue et al., 2000; Vickers et al., 2002) and reduces angiotensin 1-7 catalysis by the Nterminus site of the ACE (Danielle Gomes Passos-Silva and R.A.S.S., 2015). Angiotensins modify behavior by reducing anxiety and depression (Bild and Ciobica, 2013; Kangussu et al., 2013; Kangussu et al., 2017; Moura Santos et al., 2017). Similarly, ACE inhibition with captopril promoted anxiolysis (Costall et al., 1990). Thus, another hypothesis to be confirmed is that LVV-h7 reduces anxiety and depression behaviors by inhibiting ACE or through other angiotensinergic mechanisms.

Current data shows that the OTr is involved in the antidepressantlike effect and also in the changes in the exploration promoted by LVVh7. Oxytocin receptors are metabotropic receptors coupled to the Gq protein (Strakova and Soloff, 1997), which activates the phospholipase C pathway within the cell and triggers increases in the levels of intracellular Ca⁺² (Kimura et al., 1994). Intracellular calcium, in turn, activates the enzyme nitric oxide synthase, raising NO levels by Ca⁺²calmodulin complex (Nathan and Xie, 1994). Consequently, NO pathway signaling, including increased GMPc and activation of PKG (Cunha et al., 2010; Cury et al., 2011) would promote an inhibitory postsynaptic potential, due to hyperpolarization evoked by the opening of K⁺ channels at neuronal membrane. In this regard, through the activation of oxytocin receptors due to the possible increase in the central levels of oxytocin, LVV-h7 could inhibit the activity of neurons involved in depression-like behavior and locomotion drive.

Brain regions processing cognitive functions and memory formation, likely known for their notorious cholinergic activity, are able to express receptors belonging to IRAP class (Chai et al., 2000a, 2000b; Chai et al., 2004; von Bohlen und Halbach, 2003). Previous investigation showed that LVV-h7 and AT4 evoke a considerable potentiation of cholinergic activity in the hippocampus of rats, which is reached through activation of AT4r (Lee et al., 2001). Although acetylcholine release in the hippocampus is involved in learning, memory and other central processes (Hasselmo, 2006), exact OTr-independent mechanisms exerted by LVV-h7 to reach behavioral effects remains uncovered.

Recently, it was proposed that non-classical neuropeptides derive from intracellular proteins that are degraded by proteases. Although their releasing mechanisms have not yet been fully elucidated, these neuropeptides bind to membrane receptors and/or other cellular targets (Gelman and Fricker, 2010). Targets for non-classical neuropeptides may coincide with those linked to the activity of non-classical neurotransmitters [for a detailed review, please see (Gelman and Fricker, 2010)]. Following on from this proposition, hemorphins - including LVV-h7 - may fit within Gelman and Fricker's concept as non-classical neuropeptides (Gelman and Fricker, 2010) since they result from the degradation of β-globin chains of hemoglobin by cytosolic proteases. The expression of mRNA encoding the hemoglobin chains has been described in brain homogenate, primary culture of neurons and in the amygdala (Beyer et al., 2010; He et al., 2010; Richter et al., 2009). In our study, mRNA encoding β-globin was found in hypophysis, medial prefrontal cortex, amygdala, hippocampus and hypothalamus that are brain areas well known for controlling physiological responses to aversion and defensive behaviors (Fontes et al., 2011; Fontes et al.,

Neuropeptides 66 (2017) 59–68

2014). Considering that β -globin can be expressed in these brain regions, it is not unlike to propose that globin fragments, as LVV-h7, may play a role in the control of several centrally mediated functions. Undoubtedly, however, peculiarities on the synthesis and expression of these peptides and their precursors still need to be deepened, with special regard to the central areas involved in the behavioral organization.

The pressor effects, positive chronotropism and the increases in cortisol levels by stress were not altered by treatment with LVV-h7. In spite to the evidences that the effects promoted by the LVV-h7 would result from the increased bioavailability of oxytocin, which so far supports the mechanistic hypothesis of our behavioral findings (inactivation of AT4r/IRAP aminopeptidases activity by LVV-h7), we suggest that stress-evoked cardiovascular and neuroendocrine responses predominated over the inhibitory effects promoted by oxytocin. The studies that assessed cardiovascular effects are quite controversial, used different rat strains and different experimental conditions (Cejka et al., 2004; Moisan et al., 1998; Yang et al., 2008). The activation of oxytocin receptors at central levels is known for improving the sensitivity of baroreflex at rest (Lozic et al., 2014). However, during stress, the responses controlled by baroreflex are different: concomitant increases in blood pressure and heart rate are found (Dampney, 2004; Dampney et al., 2002; Fontes et al., 2014). So, the way that OT receptors contribute to the control of cardiovascular system at rest and during stress may differ.

Previous reports showed different results on the involvement of OT paths in the neuroendocrine control. For example, it was showed that the concentrations of ACTH and corticosterone, hallmarks of stress, were not influenced by atosiban treatment (Babic et al., 2015). In this study, we demonstrated that part of the behavioral effects promoted by LVV-h7 are not mediated by oxytocin receptors. Therefore, it is possible that LVV-h7 may have targets other than AT4r, such as opioid receptors and ACE. It is possible that the levels of LVV-h7 that act through AT4r/ IRAP are not being able to reduce the degradation of central OT in an amplitude enough to inhibit cardiovascular and neuroendocrine responses to stress. Also, different from the models reported in the literature, airjet stress might be a maximal stimulus, so that LVV-h7 would not influence the range of these responses. The increases in oxytocin levels, likely described for reducing blood pressure, tachycardia and baroreceptor reflex modulation (Vela et al., 2010; Wsol et al., 2009), would be insufficient to suppress the activity of cardiovascular and neuroendocrine pathways recruited by the stress model that we chose in the present study. Although studies have shown an overlapping among central pathways governing behavioral, neuroendocrine and cardiovascular responses to stress, anxiety and arousal (Pacak, 2000; van den Buuse et al., 2001), current findings show that LVV-h7 is able to modify behavior, and this response is, at least in part, dependent on oxytocin receptors.

We conclude that LVV-h7, a bioactive peptide derived from the β globin chain of hemoglobin, modifies the behavior of rats. It was noticeable that both anti-depressant effect and increased locomotion/exploration evoked by LVV-h7 are dependent on the activation of oxytocin receptors, probably resulting from changes in oxytocinase activity of AT4r. In contrast, anxiolytic-like effects promoted by LVV-h7 are achieved through mechanisms other than those OTr-dependents. Despite LVV-h7–AT4r–OTr axis represent a promising pathway to interfere with behavior; future experiments are needed to uncover the additional (non-oxytocinergic) mechanisms involved in the central effects of LVV-h7.

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Submission declaration

The authors declare that the present work has not been published previously (except in the form of an abstract or as a part of an academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication has approved by all authors and, tacitly or explicitly, by the responsible authorities of the facilities in which the work was performed, and that, if accepted, the present work will not be published elsewhere in print or electronically in the same form in English or in any other language without the written consent of the copyright-holder.

Acknowledgments

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (473536/2013-7); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). DOCFix CAPES/FAPEG 2014. Kellen Cruz, Larissa Turones, Gabriel Camargo and Michelle Mendonça are recipients of CAPES fellowship at the Post-Graduation Program in Biological Sciences. Danielle Ianzer is recipient of DCR CNPq/FAPEG.

References

- Albiston, A.L., McDowall, S.G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F.A., Simpson, R.J., Connolly, L.M., Chai, S.Y., 2001. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. J. Biol. Chem. 276, 48623–48626.
- Allen, A.M., Moeller, I., Jenkins, T.A., Zhuo, J., Aldred, G.P., Chai, S.Y., Mendelsohn, F.A., 1998. Angiotensin receptors in the nervous system. Brain Res. Bull. 47, 17–28.
- Axen, A., Lindeberg, G., Demaegdt, H., Vauquelin, G., Karlen, A., Hallberg, M., 2006. Cyclic insulin-regulated aminopeptidase (IRAP)/AT4 receptor ligands. J. Pept. Sci. 12, 705–713.
- Babic, S., Pokusa, M., Danevova, V., Ding, S.T., Jezova, D., 2015. Effects of atosiban on stress-related neuroendocrine factors. J. Endocrinol. 225, 9–17.
- Barkhudaryan, N., Kellermann, J., Galoyan, A., Lottspeich, F., 1993. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. FEBS Lett. 329, 215–218.
- Beyer, C.E., Dwyer, J.M., Platt, B.J., Neal, S., Luo, B., Ling, H.P., Lin, Q., Mark, R.J., Rosenzweig-Lipson, S., Schechter, L.E., 2010. Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation. Psychopharmacology 209, 303–311.
- Bild, W., Ciobica, A., 2013. Angiotensin-(1-7) central administration induces anxiolyticlike effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. J. Affect. Disord. 145, 165–171.
- Calcaterra, N.E., Barrow, J.C., 2014. Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium). ACS Chem. Neurosci. 5, 253–260.
- Cejka, J., Zelezna, B., Velek, J., Zicha, J., Kunes, J., 2004. LVV-hemorphin-7 lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats: radiotelemetry study. Physiol. Res. 53, 603–607.
- Cerpa-Poljak, A., Lahnstein, J., Mason, K.E., Smythe, G.A., Duncan, M.W., 1997. Mass spectrometric identification and quantification of hemorphins extracted from human adrenal and pheochromocytoma tissue. J. Neurochem. 68, 1712–1719.
- Chai, S.Y., B., M., Clune, E.F., Matsacos, D.J., Mustafa, T., Lee, J.H., SG, McDowall, Paxinos, G., Mendelsohn, F.A., Albiston, A.L., 2000a. Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. J. Chem. Neuroanat. 21, 331.
- Chai, S.Y., Bastias, M.A., Clune, E.F., Matsacos, D.J., Mustafa, T., Lee, J.H., McDowall, S.G., Paxinos, G., Mendelsohn, F.A., Albiston, A.L., 2000b. Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. J. Chem. Neuroanat. 20, 339–348.
- Chai, S.Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S.Y., Mendelsohn, F.A., Jenkins, T.A., Albiston, A.L., 2004. The angiotensin IV/AT4 receptor. Cell. Mol. Life Sci. 61, 2728–2737.
- Chang, R.C., Huang, W.Y., Redding, T.W., Arimura, A., Coy, D.H., Schally, A.V., 1980. Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami. Biochim. Biophys. Acta 625, 266–273.
- Chansel, D., Czekalski, S., Vandermeersch, S., Ruffet, E., Fournie-Zaluski, M.C., Ardaillou, R., 1998. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. Am. J. Phys. 275, F535–542.
- Cheng, B.C., Tao, P.L., Cheng, Y.Y., Huang, E.Y., 2012. LVV-hemorphin 7 and angiotensin IV in correlation with antinociception and anti-thermal hyperalgesia in rats. Peptides 36, 9–16.
- Coleman, J.K., Krebs, L.T., Hamilton, T.A., Ong, B., Lawrence, K.A., Sardinia, M.F., Harding, J.W., Wright, J.W., 1998. Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV binding sites and angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats. Peptides 19, 269–277.
- Costall, B., Domeney, A.M., Gerrard, P.A., Horovitz, Z.P., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Tomkins, D.M., 1990. Effects of captopril and SQ29,852 on anxiety-related

Neuropeptides 66 (2017) 59-68

behaviours in rodent and marmoset. Pharmacol. Biochem. Behav. 36, 13-20.

- Cunha, T.M., Roman-Campos, D., Lotufo, C.M., Duarte, H.L., Souza, G.R., Verri Jr., W.A., Funez, M.I., Dias, Q.M., Schivo, I.R., Domingues, A.C., Sachs, D., Chiavegatto, S., Teixeira, M.M., Hothersall, J.S., Cruz, J.S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2010. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/
- nNOS/NO/KATP signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 4442–4447. Cury, Y., Picolo, G., Gutierrez, V.P., Ferreira, S.H., 2011. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. Nitric Oxide 25, 243–254.
- Dampney, R., 2004. Medullary pathways regulating sympathetic outflow: the need for more lateral thinking. Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys. 286, R446–448.
- Dampney, R.A., Coleman, M.J., Fontes, M.A., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y.W., Polson, J.W., Potts, P.D., Tagawa, T., 2002. Central mechanisms underlying short- and longterm regulation of the cardiovascular system. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 29, 261–268.
- Danielle Gomes Passos-Silva, E.B., R.A.S.S., 2015. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. Trends Pharmacol. Sci. 36, 310–320.
- De Bundel, D., Smolders, I., Yang, R., Albiston, A.L., Michotte, Y., Chai, S.Y., 2009. Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow. Neurobiol. Learn. Mem. 92, 19–26.
- Dejouvencel, T., Feron, D., Rossignol, P., Sapoval, M., Kauffmann, C., Piot, J.M., Michel, J.B., Fruitier-Arnaudin, I., Meilhac, O., 2010. Hemorphin 7 reflects hemoglobin proteolysis in abdominal aortic aneurysm. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30, 269–275.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S., 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ. Res. 87, E1–9.
- Fontes, M.A., Xavier, C.H., de Menezes, R.C., Dimicco, J.A., 2011. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. Neuroscience 184, 64–74.
- Fontes, M.A., Xavier, C.H., Marins, F.R., Limborco-Filho, M., Vaz, G.C., Muller-Ribeiro, F.C., Nalivaiko, E., 2014. Emotional stress and sympathetic activity: contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. Brain Res. 1554, 49–58.
- Fruitier, I., Garreau, I., Lacroix, A., Cupo, A., Piot, J.M., 1999. Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: hemorphins. FEBS Lett. 447, 81–86.
- Fruitier-Arnaudin, I., Cohen, M., Bordenave, S., Sannier, F., Piot, J.M., 2002. Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity. Peptides 23, 1465–1470.
- de Gasparo, M., H., A., Alexander, W., Catt, K.J., Chiu, A.T., Drew, M., et al., 1995. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. Hypertension 25, 924–927. Gelman, J.S., Fricker, L.D., 2010. Hemopressin and other bioactive peptides from cvto-
- solic proteins: are these non-classical neuropeptides? AAPS J. 12, 279–289. Giles, A.R., 1987. Guidelines for the use of animals in biomedical research. Thromb. Haemost. 58, 1078–1084.
- Glamsta, E.L., Marklund, A., Hellman, U., Wernstedt, C., Terenius, L., Nyberg, F., 1991. Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. Regul. Pept. 34, 169–179.
- Glamsta, E.L., Meyerson, B., Silberring, J., Terenius, L., Nyberg, F., 1992. Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1060–1066.
- Gomes, I., Dale, C.S., Casten, K., Geigner, M.A., Gozzo, F.C., Ferro, E.S., Heimann, A.S., Devi, L.A., 2010. Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. AAPS J. 12, 658–669.
- Handa, R.K., Harding, J.W., Simasko, S.M., 1999. Characterization and function of the bovine kidney epithelial angiotensin receptor subtype 4 using angiotensin IV and divalinal angiotensin IV as receptor ligands. J. Pharmacol. Exp. Ther. 291, 1242–1249.
- Hasselmo, M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr. Opin. Neurobiol. 16, 710–715.
- He, Y., Hua, Y., Lee, J.Y., Liu, W., Keep, R.F., Wang, M.M., Xi, G., 2010. Brain alpha- and beta-globin expression after intracerebral hemorrhage. Transl Stroke Res 1, 48–56.
- Ianzer, D., Konno, K., Xavier, C.H., Stocklin, R., Santos, R.A., de Camargo, A.C., Pimenta, D.C., 2006. Hemorphin and hemorphin-like peptides isolated from dog pancreas and sheep brain are able to potentiate bradykinin activity in vivo. Peptides 27, 2957–2966.
- Insel, T.R., Fernald, R.D., 2004. How the brain processes social information: searching for the social brain. Annu. Rev. Neurosci. 27, 697–722.
- Jackman, S.L., Regehr, W.G., 2017. The mechanisms and functions of synaptic facilitation. Neuron 94, 447–464.
- Jezova, D., Skultetyova, I., Tokarev, D.I., Bakos, P., Vigas, M., 1995. Vasopressin and oxytocin in stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 771, 192–203.
- Kangussu, L.M., Almeida-Santos, A.F., Bader, M., Alenina, N., Fontes, M.A., Santos, R.A., Aguiar, D.C., Campagnole-Santos, M.J., 2013. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. Behav. Brain Res. 257, 25–30.
- Kangussu, L.M., Almeida-Santos, A.F., Moreira, F.A., Fontes, M.A.P., Santos, R.A.S., Aguiar, D.C., Campagnole-Santos, M.J., 2017. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1-7): role of the mas receptor. Behav. Brain Res. 331, 193–198.
- Karelin, A.A., Philippova, M.M., Karelina, E.V., Ivanov, V.T., 1994. Isolation of endogenous hemorphin-related hemoglobin fragments from bovine brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202, 410–415.
- Keller, S.R., Scott, H.M., Mastick, C.C., Aebersold, R., Lienhard, G.E., 1995. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4

vesicles. J. Biol. Chem. 270, 23612-23618.

- Kimura, T., Makino, Y., Saji, F., Takemura, M., Inoue, T., Kikuchi, T., Kubota, Y., Azuma, C., Nobunaga, T., Tokugawa, Y., et al., 1994. Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. Eur. J. Endocrinol. 131, 385–390.
- Kirsch, P., Esslinger, C., Chen, Q., Mier, D., Lis, S., Siddhanti, S., Gruppe, H., Mattay, V.S., Gallhofer, B., Meyer-Lindenberg, A., 2005. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. J. Neurosci. 25, 11489–11493.
- Kormos, V., Gaszner, B., 2013. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. Neuropeptides 47, 401–419.
- Lantz, I., Glamsta, E.L., Talback, L., Nyberg, F., 1991. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. FEBS Lett. 287, 39–41.
- Lee, J., Chai, S.Y., Mendelsohn, F.A., Morris, M.J., Allen, A.M., 2001. Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. Neuropharmacology 40, 618–623.
- Lee, H.J., Macbeth, A.H., Pagani, J.H., Young III, W.S., 2009. Oxytocin: the great facilitator of life. Prog. Neurobiol. 88, 127–151.
- Lew, R.A., Mustafa, T., Ye, S., McDowall, S.G., Chai, S.Y., Albiston, A.L., 2003. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). J. Neurochem. 86, 344–350.
- Li, K., Nakajima, M., Ibanez-Tallon, I., Heintz, N., 2016. A cortical circuit for sexually dimorphic oxytocin-dependent anxiety behaviors. Cell 167 (60–72), e11.
- Lok-Hi Chow, P.-L.T., Chen, Jin-Chung, Liao, Ruey-Ming, En-Pei Chang, E.Y.-K.H., 2013. A possible correlation between oxytocin-induced and angiotensin IV-induced antihyperalgesia at the spinal level in rats. Peptides 39, 21–28.
- Lozic, M., Greenwood, M., Sarenac, O., Martin, A., Hindmarch, C., Tasic, T., Paton, J., Murphy, D., Japundzic-Zigon, N., 2014. Overexpression of oxytocin receptors in the hypothalamic PVN increases baroreceptor reflex sensitivity and buffers BP variability in conscious rats. Br. J. Pharmacol. 171, 4385–4398.
- Mak, P., Broussard, C., Vacy, K., Broadbear, J.H., 2012. Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat. J. Psychopharmacol. 26, 532–542.
- McCarthy, M.M., McDonald, C.H., Brooks, P.J., Goldman, D., 1996. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. Physiol. Behav. 60, 1209–1215.
- McQuaid, R.J., McInnis, O.A., Abizaid, A., Anisman, H., 2014. Making room for oxytocin in understanding depression. Neurosci. Biobehav. Rev. 45, 305–322.
- Moeller, I., Lew, R.A., Mendelsohn, F.A., Smith, A.I., Brennan, M.E., Tetaz, T.J., Chai, S.Y., 1997. The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. J. Neurochem. 68, 2530–2537.
- Moeller, I., Chai, S.Y., Smith, I., Lew, R., Mendelsohn, F.A., 1998. Haemorphin peptides may be endogenous ligands for brain angiotensin AT4 receptors. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 25, S68–71.
- Moeller, I., Albiston, A.L., Lew, R.A., Mendelsohn, F.A., Chai, S.Y., 1999. A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [3H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT4 receptor. J. Neurochem. 73, 301–308.
- Moisan, S., Harvey, N., Beaudry, G., Forzani, P., Burhop, K.E., Drapeau, G., Rioux, F., 1998. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu-Val-Valhemorphin-7, a fragment of hemoglobin beta-chain in rats. Peptides 19, 119–131.

Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., 2005. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. Eur. J. Pharmacol. 512, 199–205.

- Moura Santos, D., Ribeiro Marins, F., Limborco-Filho, M., de Oliveira, M.L., Hamamoto, D., Xavier, C.H., Moreira, F.A., Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J., Peliky Fontes, M.A., 2017. Chronic overexpression of angiotensin-(1-7) in rats reduces cardiac reactivity to acute stress and dampens anxious behavior. Stress 20, 189–196.
- Nathan, C., Xie, Q.W., 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell 78, 915-918.
- Nummenmaa, L., Tuominen, L., 2017. Opioid system and human emotions. Br. J. Pharmacol.
- Nydahl, K.S., Pierson, J., Nyberg, F., Caprioli, R.M., Andren, P.E., 2003. In vivo processing of LVV-hemorphin-7 in rat brain and blood utilizing microdialysis combined with electrospray mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 838–844.
- Ohyagi, Y., Yamada, T., Goto, I., 1994. Hemoglobin as a novel protein developmentally regulated in neurons. Brain Res. 635, 323–327.
- Pacak, K., 2000. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Physiol. Res. 49 (Suppl. 1), S11–17.
- Patel, J.M., Martens, J.R., Li, Y.D., Gelband, C.H., Raizada, M.K., Block, E.R., 1998. Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. Am. J. Phys. 275, L1061–1068.
- Pinheiro, S.H., Zangrossi Jr., H., Del-Ben, C.M., Graeff, F.G., 2007. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. An. Acad. Bras. Cienc. 79, 71–85.
- Piot, J.M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G., Thomas, D., 1992. Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 101–110.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature 266, 730–732.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur. J. Pharmacol. 47, 379–391.
- de Rezende Pinto GMK, Wladimir Bocca Vieira, Valero, Valderez Bastos, Lapchik, C.B.A., Porcionatto, Marimélia, 2011. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. Demogr. Res. 1, 102–120.
- Richter, F., Meurers, B.H., Zhu, C., Medvedeva, V.P., Chesselet, M.F., 2009. Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains. J. Comp. Neurol. 515, 538–547.
- Sanderson, K., Thornwall, M., Nyberg, G., Glamsta, E.L., Nyberg, F., 1994. Reversed-
K.R. da Cruz et al.

phase high-performance liquid chromatography for the determination of haemorphin-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. J. Chromatogr. A 676, 155–160.

- Sanderson, K., Andren, P.E., Caprioli, R.M., Nyberg, F., 1996. In vitro metabolism of LVVhemorphin-7 in human plasma studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography and micro-electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A 743, 207–212.
- Sgoifo, A., Stilli, D., Medici, D., Gallo, P., Aimi, B., Musso, E., 1996. Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. Physiol. Behav. 60, 1397–1401.
- Slattery, D.A., Cryan, J.F., 2012. Using the rat forced swim test to assess antidepressantlike activity in rodents. Nat. Protoc. 7, 1009–1014.
- Smith, A.S., Tabbaa, M., Lei, K., Eastham, P., Butler, M.J., Linton, L., Altshuler, R., Liu, Y., Wang, Z., 2016. Local oxytocin tempers anxiety by activating GABAA receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus. Psychoneuroendocrinology 63, 50–58.Strakova, Z., Soloff, M.S., 1997. Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat
- myometrium during labor: Gi receptor interaction. Am. J. Phys. 272, E870-876. Tomizawa, K., Iga, N., Lu, Y.F., Moriwaki, A., Matsushita, M., Li, S.T., Miyamoto, O.,
- Itano, T., Matsui, H., 2003. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. Nat. Neurosci. 6, 384–390.
- Tsujimoto, M., Mizutani, S., Adachi, H., Kimura, M., Nakazato, H., Tomoda, Y., 1992. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. Arch. Biochem. Biophys. 292, 388–392.
- van den Buuse, M., V.A.S., Fluttert, M., De Kloet, E.R., 2001. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. Psychophysiology 38, 490–499.
- Vauquelin, G., Michotte, Y., Smolders, I., Sarre, S., Ebinger, G., Dupont, A.,

- Vanderheyden, P., 2002. Cellular targets for angiotensin II fragments: pharmacological and molecular evidence. J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. 3, 195–204.
- Vela, C., Diaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Narvaez, M., Covenas, R., Narvaez, J.A., 2010. Involvement of oxytocin in the nucleus tractus solitarii on central cardiovascular control: interactions with glutamate. J. Physiol. Pharmacol. 61, 59–65.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J. Biol. Chem. 277, 14838–14843.
- von Bohlen und Halbach, O., 2003. Angiotensin IV in the central nervous system. Cell Tissue Res. 311, 1–9.
- Wsol, A., Cudnoch-Je drzejewska, A., Szczepanska-Sadowska, E., Kowalewski, S., Dobruch, J., 2009. Central oxytocin modulation of acute stress-induced cardiovascular responses after myocardial infarction in the rat. Stress 12, 517–525.
- Xavier, C.H., Nalivaiko, E., Beig, M.I., Menezes, G.B., Cara, D.C., Campagnole-Santos, M.J., Fontes, M.A., 2009. Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. Neuroscience 164, 1360–1368.
- Yang, R., Smolders, I., De Bundel, D., Fouyn, R., Halberg, M., Demaegdt, H., Vanderheyden, P., Dupont, A.G., 2008. Brain and peripheral angiotensin II type 1 receptors mediate renal vasoconstrictor and blood pressure responses to angiotensin IV in the rat. J. Hypertens. 26, 998–1007.
- Yatskin, O.N., Philippova, M.M., Blishchenko, E., Karelin, A.A., Ivanov, V.T., 1998. LVVand VV-hemorphins: comparative levels in rat tissues. FEBS Lett. 428, 286–290.
- Zhao, Q., Sannier, F., Garreau, I., Guillochon, D., Piot, J.M., 1994. Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 216–223.

ANEXO 2

Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Behavioral effects evoked by the beta globin-derived nonapeptide LVV-H6

Kellen Rosa da Cruz^a, Danielle Ianzer^a, Larissa Córdova Turones^a, Lilian Liz Reis^a, Gabriel Camargo-Silva^a, Michelle Mendanha Mendonça^a, Elder Sales da Silva^a, Gustavo Rodrigues Pedrino^a, Carlos Henrique de Castro^a, Elson Alves Costa^b, Carlos H. Xavier^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil ^b Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords: LVV-h6 Hemoglobin Hemorphin Opioid Oxytocin Anxiety Depression

Emotional stress

ABSTRACT

LVV-hemorphin-6 (LVV-h6) is bioactive peptide and is a product of the degradation of hemoglobin. Since LVVh6 effects are possibly mediated by opioid or AT4/IRAP receptors, we hypothesized that LVV-h6 would modify behavior. We evaluated whether LVV-h6 affects: i) anxiety-like behavior and locomotion; ii) depression-like behavior; iii) cardiovascular and neuroendocrine reactivity to emotional stress. Male Wistar rats (\pm 300 g) received LVV-h6 (153 nmol/kg i.p.) or vehicle (NaCl 0.9% i.p.). We used: i) open field (OF) test for locomotion; ii) elevated plus maze (EPM) for anxiety-like behavior; iii) forced swimming test (FST) for depression-like behavior and iv) air jet for cardiovascular and neuroendocrine reactivity to stress. Diazepam (2 mg/kg i.p.) and imipramine (15 mg/kg i.p.) were used as positive control for EPM and FST, respectively. To evaluate the LVV-h6 mechanisms, we used: the antagonist of oxytocin (OT) receptors (atosiban - ATS 1 and 0.1 mg/kg i.p.); the inhibitor of tyrosine hydroxylase (Alpha-methyl-p-tyrosine - AMPT 200 mg/kg i.p.) to investigate the involvement of catecholaminergic paths; and the antagonist of opioid receptors (naltrexone - NTX 0.3 mg/kg s.c.). We found that LVV-h6: i) evoked anxiolytic-like effect; ii) evoked antidepressant-like effect in the FST; and iii) did not change the locomotion, neuroendocrine and cardiovascular responses to stress. The LVV-h6 anxiolytic-like effect was not reverted by ATS and AMPT. However, the antidepressant effects were reverted only by NTX. Hence, our findings demonstrate that LVV-h6 modulates anxiety-like behavior by routes that are not oxytocinergic, catecholaminergic or opioid. The antidepressant-like effects of LVV-h6 rely on opioid pathways.

1. Introduction

LVV-hemorphine-6 (LVV-h6) is a nonapeptide corresponding to the 32–40 fragment of the β -globin (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg) that results from the action of chymotrypsin-like enzymes [37]. LVV-h6 was isolated and identified in the pituitary gland [37], lung and heart of healthy humans [90]. Interestingly, LVV-h6 levels are elevated in the brain of patients with Alzheimer's disease [1]. The binding of LVV-h6 to μ - and σ -opioid receptors results in significant analgesic actions [37]. It was also found that LVV-h6 is able to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) activity [49], which suggests a role in the cardiovascular homeostasis.

Recently, we showed that LVV-h7, a decapeptide corresponding to the fragment 32–41 of β -globin human (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe), promoted anxiolytic-like and antidepressant-like effects [27]. Although there is a noticeable similarity when comparing the

primary structure between the deca- and the nonapeptide, LVV-h6 lacks a phenylalanine in the C-terminus position [38]. The decapeptide (LVVh7) is an agonist of angiotensin IV (Ang IV) receptor (AT4), a receptor with a catalytic domain that belongs to the class of insulin-regulated aminopeptidases (IRAP), capable of degrading several molecules, including oxytocin (OT) [11,41,53,58,83]. The activation of AT4/IRAP by the agonists Ang IV and LVV-h7 could inhibit the catalytic domain and reduce the oxytocinase activity [11,6061].

AT4/IRAP is expressed in brain regions such as the prefrontal, insular and entorhinal cortices, substantia *nigra*, hypothalamus and amygdala [22,39], dorsal root ganglia and spinal cord, with greater ventricular expression [23]. In the human brain, the AT4/IRAP was found in Meynert basal nuclei, in the hippocampus and neocortex [21]. Therefore, it is possible that LVV-h6 and LVV-h7 play a role in the control of several physiological functions, probably reaching central AT4/IRAP and other targets to exert analgesic [38] and behavioral

https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.03.002

Received 1 October 2018; Received in revised form 4 February 2019; Accepted 12 March 2019 Available online 16 March 2019

0196-9781/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.







^{*} Corresponding author at: Systems Neurobiology Laboratory, Esperança Avenue – Campus II (Samambaia), Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences (ICB II – Room 224), Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

E-mail address: carlosxavier@ufg.br (C.H. Xavier).

effects [27]. Recently, we reported that the behavioral effects evoked by LVV-h7 depend on oxytocin receptors (OTr). This result suggests that the agonism of central AT4/IRAP by LVV-h7 increases OTr activation, probably resulting from increases central OT levels [27].

Studies have revealed Ang IV as a competitive inhibitor of IRAP, since it binds to this receptor and modifies the catalytic activity [53]. A synthetic analog of LVV-h7 without the amino acid Valine at position 3 (desVal3-LVV-h7) was unable to interact with the receptor/enzyme. These findings demonstrated that: i) N-terminal portion of LVV-h7 interacts with AT4/IRAP; ii) valine is crucial for the effects of LVV-h7 [52]. A synthetic peptide with the last four amino acid residues (Thr-Gln-Arg-Phe) from the C-terminal portion of LVV-h7 did not modify the binding affinity of the decapeptide for IRAP [52]. In addition, modifications at the terminal C-8 terminus did not promote significant changes in the Ang IV affinity for AT4/IRAP [72]. Val-Tyr-Pro-Trp-Thr is the minimum sequence required to display a suitable affinity for IRAP [52], which is comprised in both LVV-h6 and LVV-h7. Since LVV-h7 evokes behavioral effects that are related to the agonism of central AT4/IRAP, as consequence, such effects are partially dependent on OTr [27], we hypothesized that LVV-h6 would evoke behavioral effects potentially mediated by opioid receptors or by AT4/IRAP. Considering that both LVV-h6 and LVV-h7 have the minimal amino acid residue sequence required for presenting high affinity to AT4/IRAP, the main aim of this study was to test whether LVV-h6 would affect: i) anxietylike behavior and locomotion/exploration; ii) depression-like behavior; iii) cardiovascular and neuroendocrine reactivity to acute emotional stress. We also checked whether LVV-h6 effects would be similar to those reported for LVV-h7 [27], mediated by OTr activation that result from reductions in oxytocin degradation by an allosteric inhibition upon AT4/IRAP catalytic domain [83]. These possible effects would rely on: i) opioid pathway, since LVV-h6 presents affinity for the opioid receptors [3738]; ii) catecholaminergic pathway, in regards to their modulatory effects upon behavior [5].

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted in adult male Wistar rats (\pm 300 g). Procedures involving animals were in agreement with Gilles et al. [36] and with standards for animals use after approval by animal ethics committee of Federal University of Goiás, Brazil (Protocol 090/14). Animals were housed in individual cages (47 cm x 31 cm x 16 cm), in acclimatized rooms (temperature 22–24 °C) with light/dark cycle of 12/12 h and water and food open access (*ad libitum*).

2.2. Drugs and reagents

Diazepam (Sigma, St. Louis MO, USA) (2 mg/kg), known for producing anxiolysis, was used as positive control in the elevated plus maze (EPM) [19]. Imipramine (Sigma, St. Louis MO, USA) (15 mg/kg) was the antidepressant used as positive control in the forced swimming tests (FST) [67]. The vehicle chosen was NaCl (0.9%). The dose of choice (153 nMol) for LVV-h6 (GenOne, Brazil) was based in our previous study [27]. The involvement of oxytocinergic pathway was checked by using the antagonist Atosiban (ATS) (Tractocile[®] - Ferring Pharmaceutics, Switzerland) at dose of 1 mg/kg during FST [55] and of 0.1 mg/kg during EPM and open field (OF) tests. The inhibitor of tyrosine hydroxylase enzyme, Alpha-methyl-p-tyrosine (AMPT - (Sigma, St. Louis MO, USA) was used at dose 200 mg/kg [92] to check the involvement of catecholaminergic pathways. The antagonist of opioid receptors, naltrexone (NTX) was used at dose of 0.3 mg/kg (s.c.) [34] to evaluate the participation of opioid pathway in the LVV-h6 effects.

2.3. Elevated plus maze

This protocol was performed as described by Pinheiro and coworkers [65]. The Elevated Plus Maze (EPM) device is elevated 50 cm above the ground and has two open arms (50 \times 10 cm) without sidewalls, perpendicular to two closed arms of the same dimension. Closed arms are surrounded by sidewalls of 40 cm high. A small border (1 cm) surrounds the open arms. Animals received i.p. injections of LVV-h6 (see supplementary Fig. 1A), vehicle (negative control - 0.9% NaCl) or diazepam (positive control - 2 mg/kg). EPM assessments were performed 30 min after drug administration. To evaluate the involvement of oxytocinergic pathway. ATS was injected 1 h before LVV-h6 or vehicle. To evaluate the involvement of catecholaminergic pathway. AMPT was injected 1 h before LVV-h6 or vehicle (see supplementary Fig. 1B). To investigate the involvement of opioid pathway, NTX was injected (s.c.) 10 min before LVV-h6 or vehicle (see supplementary Fig. 1C). Animals were placed individually on the central platform of the maze (with the head directed towards one of the closed arms) and were free to explore the apparatus for a 5 min. The experiments were recorded for later analyses. We assessed the time spent and the number of entries in the open arms, in the closed arms and in the center of the EPM. Between trials, the EPM was cleaned with ethanol (10%) to avoid that olfactory clues from one experiment would interfere with the subsequent test.

2.4. Locomotor/exploratory activity

To evaluate locomotor and exploratory activities we used the method described by Moreira et al. [62]. Animals were placed individually in a round open field (OF) [44] immediately after exploring the EPM (see Supplementary Fig. 1). The OF is divided into quadrants with identical areas (356 cm²). The rats were placed in the center of the OF and were free to explore the apparatus for 5 min. A video camera was fixed above the field to record behavior throughout the experiment. At the end, the recorded files were analyzed. We assessed the number of crossing, grooming and rearing episodes. We also counted the immobility time and the time spent at center and at the periphery of OF. After each session (EPM-OF), animal returned to its home cage and the field was cleaned with ethanol (10%) to prevent olfactory clues interference.

2.5. Forced swimming test

This protocol was adapted from the model originally proposed by Porsolt et al. [68]. In rats, previous exposure to forced swim is required to reveal antidepressant-like activity [76]. The protocol took two consecutive days (see Supplementary Fig. 2). On the first day (pre-test), the rats were placed inside a PVC cylinder (Polyvinyl Chloride), 24 cm in diameter by 60 cm in height, filled by a water column of 42 cm in height, at 25 ± 1 °C, for 15 min and remained in a drying period during the next 15 min. Subsequently, animals received injections (0.1 mL) of drugs or vehicle (NaCl 0.9% i.p.; Imipramine 15 mg/kg i.p.; LVV-h6 153 nMol/kg i.p.) 24 h before the test (see Supplementary Fig. 2). Following the test, animals were returned to their home cage. Cylinders were cleaned with ethanol (10%) to prevent olfactory clues interference.

On the second day (test), animals received second injections of vehicle or LVVh6 at 5 h and the third injection at 1 h before the test (see Supplementary Fig. 2). ATS (0.1 mg/kg i.p.) and AMPT (200 mg/kg i.p.) were injected 1 h before the third injection of vehicle (i.p.) or LVV-h6 (i.p.) (see Supplementary Fig. 2B). NTX (0.3 mg/kg s.c.) was injected at 10 min before [34] the third injection of vehicle (i.p.) or LVV-h6 (i.p.) (see Supplementary Fig. 2C). During the test, rats underwent forced swim for 6 min, which was recorded for later analyses (see Supplementary Fig. 2). The immobility time was taken from the last 4 min of the FST [67].

2.6. Surgical procedures

2.6.1. Anesthesia

For surgical procedures, rats were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich, USA) at a dose of 250 mg/kg (i.p.). Supplements were given at lower dose (50 mg/kg i.p.) during the surgery, when necessary to keep the anesthetic depth, as previously described [27].

2.6.2. Electrode positioning for electrocardiogram

The method for implantation of electrocardiography (ECG) electrodes was similar to that firstly described by Sgoifo [75]. After anesthesia, free endings of two electrodes previously fixed in a RJ45 phone plug were implanted: one was attached to the dorsal surface of the xiphoid process and other was positioned in the cranial third of the mediastinum, posterior to the manubrium of the sternum, and fixed by moorings in the sternocleidomastoid muscles. Plugs were connected to Powerlab (ADInstruments) acquisition system to record ECG R-R intervals from which the heart rate (HR) was calculated.

2.6.3. Catheterization of femoral artery and vein

After the positioning of the electrode, a unilateral incision in the inguinal region was performed for dissection of the femoral vascularnervous bundle. Tygon 10 mm (2.5 cm for vein and 4 cm for artery) connected to Tygon 50 mm (15 cm) tubes were filled with 1% heparinized isotonic saline (Parinex*, Hipolabor, MG / Brazil). They were then implanted in the femoral vein and artery and fixed by surgical sutures. Cannulation of the femoral artery allowed for recording pressure from abdominal aorta and a venous cannula was used for drug injection. The free end of the cannula was sealed with a metal pin and exteriorized subcutaneously into the interscapular region. After the surgical procedure, rats received intramuscular injection of the analgesic and anti-inflammatory Flunixin* (1 mg/kg) (Chemitec, SP / Brazil) and were housed in individual cages for 24 h recovery period.

2.7. Cardiovascular parameters recording

The cannula inserted into the artery was coupled to a pressure transducer, connected to an amplifier and to an analog-to-digital conversion system for data acquisition Power lab 4/20 (AD Instruments – Australia). The implanted ECG electrode was connected to the Acquisition system. Through the Lab Chart Pro 7.2 software, the pulsed arterial pressure (PAP) oscillations were obtained, which allowed for calculating the mean arterial pressure (MAP). Heart rate (HR) was calculated from R-R intervals of the electrocardiogram.

2.8. Evaluation of cardiovascular and neuroendocrine reactivity to stress

The evaluation of the cardiovascular reactivity to stress was as previously described [89] (see Supplementary Fig. 3). The experimental model consists of keeping the animal in an acrylic container and subjecting it to stream of air. The air jet was directed to the rat's muzzle at a constant volume of 10 L/min.

The experiment was performed 24 h after the surgical procedures. The cardiovascular parameters were monitored until stabilization. The last 10 min before starting procedures were considered as baseline. Subsequently, the arterial blood sample (0.5 ml) was made for posterior corticosterone dosing (by chemiluminescence method); The blood withdrawn was replaced by an equivalent volume of isotonic saline. Then, the animal was stimulated to enter the container and a cover was placed on the back of the container to prevent the animal from escaping. After 10 min of restraint, LVV-h6 or vehicle was injected (i.v.). Following, the air pump (10 L/min) was started and air jet was offered for 10 min. Just after the end of the air jet, another blood sample was withdrawn for later evaluation of corticosterone levels. Isotonic saline was injected in equivalent volume for replacement. The rat remained in

the container for additional 10 min. At the end, the container was opened, thus allowing the animal to exit. The MAP and HR values were sampled every 2 min, throughout registration period.

2.9. Statistics

The results were expresses as mean \pm SEM. Analyses of variance with Tukey post hoc test were applied (Graph Pad Prism 6.0 Software). Neuroendocrine reactivity to stress (basal vs. air jet within same group) was analyzed by paired Student *t*-test Comparisons of the maximal changes in corticosterone levels and in cardiovascular reactivity to stress between control and LVV-h6 were done by using unpaired Student *t*-test The level of significance was fixed at p < 0.05.

3. Results

3.1. Anxiolytic-like effect and locomotor/exploratory activities

Compared to vehicle, LVV-hemorphin-6 increased the time and the number of entries in the open arms and reduced the time spent in closed arms of the maze. As expected, diazepam (positive control) also increased the time spent and the number of entries in the open arms and decreased the time in the closed arms (Fig. 1A, C and B).

The time spent in the center of the EPM, did not differ among vehicle and LVV-h6, whereas it was reduced by diazepam when compared to negative control (vehicle) (Fig. 1E). These results indicate that LVV-h6 is able to evoke anxiolytic-like effects and agree with those from the OF: LVV-h6 increased the time spent in the center and did not change the time in the periphery (Fig. 2A and B), when compared to vehicle.

The number of entries in the closed arms and the total number of entries (entries in open and closed arms) of the EPM indicate locomotion [88], which did not differ between LVV-h6 and vehicle (Fig. 1D and F). These results meet the number of crossings episodes from the OF (Fig. 2C). Diazepam did not change the number of crossings and immobility time in the OF (Fig. 2C and D). LVV-h6 did not evoke any grooming effect when compared to vehicle (Fig. 2F). The immobility time and the number of rearing did not change significantly by the treatment with LVV-h6 in comparison with control group (Fig. 2D and E). This indicates that LVV-h6 does not change the locomotion/exploration of rats.

3.1.1. Evaluation of oxytocinergic pathway involvement in the anxiolytic-like effects evoked by LVV-h6

The evaluation of the anxiolytic-like effect provoked by LVV-h6 and its relationship with the activity of OTr are shown in Figs. 1 (EPM) and 2 (OF). The antagonism of OTr with ATS (0.1 mg/kg) was not able to revert the response evoked by LVV-h6 in the: i) EPM parameters – time spent and number of entries in the open arms (Fig. 1A and C) and time in the closed arms (Fig. 1B); ii) OF parameters – time in the central region (Fig. 2A). Altogether, these outcomes from EPM and OF indicate that the anxiolytic-like effect promoted by LVV-h6 does not rely on OTr. The time spent in the center of the EPM did not differ between vehicle and LVV-h6, but it was increased when the OTr were blocked with ATS in animals injected with LVV-h6 (Fig. 1E).

The antagonism of OTr with ATS did not change the response evoked by LVV-h6 in the number of entries in the closed arms and in the number of total entries in the EPM (Fig. 1D e F). In the OF, crossings, rearing and the grooming episodes were unaffected by LVV-h6, and in the group treated previously with ATS, there was no significant difference (Figs. 1D, F, 2 C, E and F). Interestingly, ATS potentiated the reduction in the immobility time in the OF evoked by LVV-h6 (Fig. 2D). These results suggest that LVV-h6 does not change the locomotion/ exploration of rats and, in general, this response did not change with the antagonism of OTr. ■ Vehicle □ Diazepam □ LVVh6



Fig. 1. Anxiolytic-like effect evaluation in Elevated Plus Maze (EPM). (A) Time spent in the open arms; (B) time spent in the closed arms; (C) number of entries in the open arms; (D) number of entries in the closed arms; (E) time spent in the center of the EPM; (F) total entries; Control (vehicle) NaCl 0.9%; diazepam 2 mg/kg; LVV-h6 153 nMol/kg; ATS (0.1 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg; ATS (0.1 mg/kg) + vehicle); AMPT (200 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg; AMPT (200 mg/kg) + vehicle); NTX (0.3 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg; NTX (0.3 mg/kg) + vehicle). n = 5-12. Results are expressed as means \pm SEM. * vs vehicle; [#] vs. LVV-h6 + vehicle; [&] vs. AMPT + vehicle; ⁺ vs. NTX + vehicle. (p < 0.05). ATS, atosiban; AMPT, Alpha-methyl-p-tyrosine; NTX naltrexone.



Fig. 2. Locomotor/exploratory activities in the Open Field (OF). (A) Time spent in the central region; (B) time spent in the periphery; (C) crossings; (D) immobility time; (E) rearing; (F) grooming. Control (vehicle) NaCl 0.9%; diazepam 2 mg/kg; LVV-h6 153 nMol/kg; ATS (0.1 mg/kg) + vehicle); ATS (0.1 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg; AMPT (200 mg/kg) + vehicle; AMPT (200 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg; NTX (0.3 mg/kg) + vehicle); NTX (0.3 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg. n = 6-11. The results are expressed as means \pm SEM. * vs vehicle; [#] vs. LVV-h6 + vehicle; [&] vs. AMPT + vehicle; ⁺ vs. NTX + vehicle. (p < 0.05). ATS, atosibar; AMPT, Alpha-methyl-p-tyrosine; NTX naltrexone.

3.1.2. Evaluation of catecholaminergic pathway involvement in the anxiolytic-like effect evoked by LVV-h6

The effects provoked by LVV-h6 and its relationship with catecholaminergic pathways are showed in Figs. 1 (EPM) and 2 (OF). The inhibition of catecholaminergic biosynthetic pathways by alpha-methylp-tyrosine (AMPT, 200 mg/kg) potentiated the increases in the time spent in the open arms and the decreased the time in the closed arms of EPM (Fig. 1A and B). AMPT did not change the response promoted by LVV-h6 in the number of entries in the open arms of the maze (Fig. 1C) and in the time spent in the center of the OF (Fig. 2A). These results indicate that the catecholaminergic pathways is not responsible for the anxiolytic-like effect promoted by LVV-h6, but somehow it is able of potentiate this effect. The time spent in the center of the EPM was not changed by LVV-h6 and this response was not altered by the inhibition of catecholaminergic biosynthetic pathway with AMPT (Fig. 1E).

AMPT did not change the responses evoked by LVV-h6 in the number of entries in the closed arms and in the total number of entries in the EPM (Fig. 1D and F). Crossing episodes and the immobility time in the OF were not changed by the previous administration of AMPT (Fig. 2C and D). Interestingly, the catecholaminergic depletion by AMPT reduced the response evoked by LVV-h6 in the number of grooming episodes. Such reductions reached values below those found following vehicle injections (Fig. 2F). The inhibition of catecholamine synthesis by AMPT did not change the rearing episodes evoked by LVV-h6 (Fig. 2E). LVV-h6 does not change the locomotion/exploration of rats and this response was not modified by AMPT.

3.1.3. Evaluation of opioid pathway involvement in the anxiolytic-like effect evoked by LVV-h6

Since the anxiolytic-like effects caused by LVV-h6 do not seem to rely on oxytocin and catecholaminergic pathways, we decided to investigate whether the opioid pathways are involved. By keeping in mind that LVV-h6 is an agonist of μ -opioid receptors [37], the findings obtained by testing this hypothesis are demonstrated in Figs. 1 (EPM) and 2 (OF). The blockade of opioid receptors with NTX (0.3 mg/kg s.c.) potentiated the increases in the time spent and the number of entries in the open arms (Fig. 1A and C, respectively) and potentiated the decreased in the time spent in the closed arms of the maze (Fig. 1B). NTX did not alter the range of the changes in the time spent at center and at periphery of the OF (Fig. 2A and B). The previous injection of NTX did not modify the time spent in the center that was evoked by LVV-h6 in the EPM (Fig. 1E). These results indicate that opioid pathways are not involved in the anxiolytic-like effect promoted by LVV-h6.

The antagonism of opioid receptors did not change the response evoked by LVV-h6 in the number of entries in the closed arms and the total number of entries in the EPM (Fig. 1D e F). The crossing and the grooming episodes in the OF did not differ between vehicle and LVV-h6. While the crossing was increased, grooming episodes and the immobility time were reduced by the cotreatment with NTX, (Fig. 2C, D and F). Additionally, the changes in the number of crossing episodes and the immobility time in the OF seem to be a direct effect of NTX, as seen in the group treated with NTX and vehicle (Fig. 2C). NTX did not modify the rearing episodes evoked by LVV-h6 (Fig. 2E). These results suggest that LVV-h6 does not affect the locomotion/exploration of rats and this response was not changed by NTX.

3.2. Antidepressant-like effect evoked by LVV-h6

The results of depression-like behavior are presented in Fig. 3. As expected, the immobility time during forced swimming test was reduced in the group treated with the antidepressant imipramine (positive control), which was also seen in the group injected with LVVh6, when compared to vehicle. The reduction in immobility time in the FST indicates that LVVh6 evoked an antidepressant-like effect.



Fig. 3. Immobility time during forced swimming test (FST). Control (vehicle) NaCl 0.9%; imipramine 15 mg/kg; LVV-h6 153 nMol/kg; ATS (1 mg/kg) + vehicle; ATS (1 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg;); AMPT (200 mg/kg) + vehicle; AMPT (200 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg; NTX (0.3 mg/kg) + vehicle; NTX (0.3 mg/kg) + LVV-h6 153 nMol/kg. n = 4–11 Results expressed as means \pm SEM. * vs vehicle; [#] vs LVV-h6 + vehicle; [&] vs. AMPT + vehicle; ⁺ vs. NTX + vehicle. (p < 0.05). ATS, atosiban; AMPT, Alpha-methyl-p-tyrosine; NTX naltrexone.

3.2.1. Evaluation of oxytocinergic pathway involvement in the antidepressant-like effect evoked by LVV-h6

The antagonism of OTr with ATS did not modify the amplitude of the responses evoked by LVV-h6 in the immobility time during FST (Fig. 3). Therefore, this result demonstrate that the OTr are not involved in the antidepressant-like effect promoted by LVV-h6.

3.2.2. Evaluation of catecholaminergic pathway involvement in the antidepressant-like effect evoked by LVV-h6

The catecholaminergic depletion by inhibiting tyrosine hydroxylases enzyme with AMPT did not change the antidepressant-like effects (reduction in the immobility time in the FST) evoked by LVV-h6 (Fig. 3). These results indicate that antidepressant-like effect promoted by LVV-h6 is independent of the catecholaminergic pathway.

3.2.3. Evaluation of opioid pathway involvement in the antidepressant-like effect evoked by LVV-h6

In spite of an apparent direct effect of NTX (NTX + vehicle) upon depression-like behavior, the antidepressant-like effect promoted by LVV-h6 was reverted by blockade of opioids receptors with NTX (Fig. 3). These results indicate that antidepressant-like effect promoted by LVV-h6 depends somehow on opioid receptors.

3.3. Cardiovascular reactivity and neuroendocrine responses to acute stress exposure

The magnitude of the pressor (Fig. 4A and B) and of the positive chronotropic (Fig. 4C and D) responses evoked by restraint and air jet stresses were not changed by the previous treatment with LVV-h6. Also, the amplitude of the increases in corticosterone levels (Fig. 4E) evoked by acute stress exposure was not altered by LVV-h6.

4. Discussion

Our main findings from the EPM and OF indicate that LVV-h6 evokes anxiolytic-like, while outcomes from FST showed an antidepressant-like effect of this peptide. The structure of this nonapeptide is very similar to another hemoglobin-derived peptide, LVV-h7, which also exerts anxiolytic and antidepressant effects. We recently reported that these behavioral effects evoked by LVV-h7 rely on OTr [27], presumably as result of inhibition of AT4/IRAP catalytic site [11,41,53,58,83]. The inhibition of this catalysis occurs while LVV-h7 binds to AT4/IRAP [53,606,1]. Therefore, it is likely that LVV-h6 would also modulate anxiety and depression behaviors through AT4–OTr axis, by inhibiting the catalytic activity of AT4 upon oxytocin. In view of the Α



Fig. 4. Cardiovascular and neuroendocrine reactivity to acute stress emotional. Panels A and C show mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) variations over the course of the experiment. Panels B and D show mean maximal changes in MAP and HR obtained during air jet stress. Panel E show plasma corticosterone levels before (basal) and after acute stress exposure (Air jet) of animals injected with vehicle (control – NaCl 0.9%, n = 6) or LVV-h6 (153 nMol/ kg, n = 4). Results are expressed as means \pm SEM. * vs. vehicle basal; [#] vs. LVV-h6 basal. (p < 0.05).

structural similarity with LVV-h7 [38], current results on the contribution of AT4-OTr axis to the effects of LVV-h6 suggest that the nonapeptide may be able to exhibit a degree of inhibition upon oxytocinase activity of AT4/IRAP, probably increasing the bioavailability of central oxytocin.

Oxytocin is released from the hypothalamic-hypophyseal axis (HPA) also in response to physical and emotional stresses [71] and is an important player during different pro-social behaviors and positive emotions such as empathy, trust and others. Neurobiological aspects

underlying these behaviors are a complex puzzle and involve oxytocinergic and monoaminergic systems [28,80,87]. OTr are found in areas controlling behaviors [47] and reduces fear and anxiety [44,59]. Besides reducing the consolidation of traumatic memories [24], decreases depressive-like behavior [84] and stress-induced responses, oxytocin also inhibits HPA activity [59,87] and recruits a negative feedback loop on HPA axis, which reduces the levels of corticotrophin releasing hormone by activating gabaergic sources and GABA_A receptors in paraventricular hypothalamus [59]. In spite of the ample evidences that oxytocinergic pathways may suppress HPA, in this study LVV-h6 did not alter the range of the neuroendocrine reactivity to acute emotional stress. The hypothesis then arisen is that this nonapeptide may preserve the ability of settling neuroendocrine responses evoked by acute stress. In clinical studies, an increase in basal levels of oxytocin was reported in men and women diagnosed with depression, as a possible compensatory mechanism that reduces the symptoms by modulating the negative emotional and cognitive components of depression and anxiety [59]. In addition, treatment with selective inhibitors of serotonin (5-HT) reuptake were able to increase plasma oxytocin [7,30,74,84]. It suggests that 5-HT increases within the synaptic clefts may stimulate oxytocinergic system, recruiting a positive feedback loop in serotonergic pathways. Interestingly, oxytocin increases the potential of 5-HT binding to 5-HT_{1A} receptors [59] and may also stimulate post-synaptic release of catecholamines [3,69]. Noradrenaline, well known for being associated with mood disorders [48,78], stimulates oxytocin release from hypothalamus [8]. Therefore, a positive correlation among oxytocin, serotonin and catecholamines becomes feasible [59].

It is undoubted that cathecolamines play a modulatory role upon behavior [5]. Increases in noradrenergic neurotransmission promote some depressive and anxiogenic symptoms. Much of the catecholaminergic neurons are located in the Locus Coeruleos (LC) and organize different functions, including emotional behavior. [7778,81]. LC seems to exert antagonistic effects in prosencephalic regions modulating behavior [26]. Lesions in dorsal LC increases fear and anxiety induced by novelty paradigm in rats [57]. Contradictorily, damages in the dorsal noradrenergic group of LC increase the antidepressant-like effect promoted by the noradrenaline reuptake inhibition [26]. On the other hand, when the lesions surrounded ventral portions, this antidepressive effect was completely absent [26], which suggests that LC modulates behavioral responses according to its active region. Memory after emotional experiences depends on noradrenergic inputs to amygdala [32,43], a brain region responsible for organizing fear and anxiety behaviors such as avoidance and freezing [6]. Increases in norepinephrine concentrations in the amygdala [86], changes in circulating hormone levels [2] and in the activity of autonomic supplies [12] are found in response to an emotional experience [70]. The plausibility of the hypotheses that these brain areas and catecholaminergic synapses would be potentially involved in the behavioral effects evoked by LVV-h6 is further supported by our current report: mRNA for beta globin fragments was found in medial prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, hypothalamus and hypophysis [27].

Catecholamines other than noradrenalin may be involved in the neurobiology of anxiety and depression, learning process and motivational behaviors [5]. The role of dopamine in depressive behavior is quite ambiguous: while dopamine increases in the frontal cortex may promote depressive behavior, the reduction of dopaminergic activity in this brain region may evoke antidepressant-like effect [29]. Anti-depressant-like effects promoted by dopamine seem to depend on dopaminergic receptors subtype 2 (D2), which are able to reduce depressive-like behavior after stress exposure [3,29,35]. Whether LVV-h6 exerts a putative effect on dopaminergic pathways, with special regard to those relying on D2, remain to be investigated.

Since the seminal reports, hemorphins are known for exerting antinociceptive and anti-hyperalgesic effects [23,38] mediated by opioid receptors [14,3738,66]. Following on from investigating the involvement of OTr and catecholaminergic pathways in the behavioral effects evoked by LVV-h6, our next step was to test the contribution of opioid receptors. The opioid system controls different physiological functions [13], including mood status [9]. Central endogenous opioids are released after well-being situations such as food intake, positive feelings and social acceptance [18]. Opioid receptors are broadly expressed in central and peripheral nervous systems [50]. The exogenous opioid morphine reduced anxiety in patients with posttraumatic stress disorders [17,42]. While the treatment with the agonist buprenorphine reduced cortisol levels, it did not affect anxiety levels in healthy patients [10]. In addition, blockade of opioid receptors promoted dysphoria and potentiated negative feelings triggered by sudden loss [56,64]. The involvement of opioid system in brain areas controlling defense reactions is also showed following administration of morphine, which inhibited the excitatory post-synaptic currents in the lateral amygdala of rats [91].

Kappa-opioid receptors (KOR) play a role in depression, anxiety [46,63], social interaction [1516]. Activation of KOR during stressful experiences induces long-term behavioral changes [4]. KOR are involved in the anti-reward response [85] and participate in the stressinduced psychopathology [45]. µ-opioid receptors (MOR) is another receptor that is strongly involved in rewarding process [82,85]. The activation of MORs reduces neuronal activity in brain areas organizing defense reactions [73]. Delta-opioid receptors (DOR), in turn, seem to be involved in contextual learning and reward system [54]. The increases in anxiety-like and depression-like behaviors displayed by DOR knockout mice suggests DOR's contribution to the mood status [33,73]. To evaluate whether the behavioral effects promoted by LVV-h6 would depend opioid system, we blocked the opioid receptors with NTX. The anxiolytic-like effect evoked by LVV-h6 was potentiated in animals previously injected with NTX. In the light of the modulatory effects played by opioid system upon behavior, we suggest that NTX prominently blocked the effects of LVV-h6 upon DOR. Further experiments are necessary to better describe the role of every opioid receptors subtype in the behavioral effects evoked from LVV-h6.

Although NTX itself increased the immobility time in FST, the antidepressant-like effect promoted by LVV-h6 was completely reverted by NTX. Opioid receptors also regulate the activity of monoaminergic neurons [54]. In fact, the antidepressant-like effects of tricyclic antidepressants are reverted by naloxone [31,54], a nonspecific antagonist of opioid receptors that is similar to that tested in our experiments. The activation of MORs at the ventral tegmental area, increases the activity of dopaminergic neurons and the release of 5-HT in the dorsal nucleus of raphe. Both mechanisms result from the inhibition of gabaergic interneurons by MORs [54]. Notwithstanding the inactivation of inhibitory mechanisms that allows recruiting monoaminergic sources, the expression of MORs in noradrenergic neurons raises a direct effect upon noradrenaline release [54]. Nevertheless, the activation of KORs inhibits the release of dopamine in the nucleus accumbens, promoting depressive behavior and mood reduction [45,79]. Indeed, opioid receptors (mu, kappa and delta) were expressed in hippocampus and modulate the neurogenesis triggered by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [54]. Converse to these neurotrophic evidences, MORs activity in the hippocampus seems to reduce survival and proliferation of neurons [25,40]. Blockade of KOR and activation of DOR promoted antidepressant-like effects [54]. The hippocampal mRNA levels of BDNF were higher after administration of enkephalins and of specific DOR agonists. These effects were reverted by DOR and MOR antagonists [54], thus revealing a contribution of opioid receptors to the effects mediated by BDNF, the main neurotrophic factor in charge of the antidepressant effect of many drugs [20]. Despite being likely to hypothesize that LVV-h6 would reach long-term behavioral effects by promoting neurotrophism mediated by opioid receptors, this remains to be unraveled by future attempts.

Our results demonstrate that LVV-h6 modulates anxiety-like and depression-like behaviors. These effects were very similar to those reported for LVV-h7 in our prior study [27]. LVV-h6 and LVV-h7 display a substantial structural similarity in their amino acid sequences: the difference is that LVV-h6 lacks a Phe in its C-terminus position [38]. Lee and coworkers demonstrated that the deletion of this last amino acid residue (Phe10 from the C-terminal position of LVV-h7) was unable to produce pronounced changes in the binding affinity for AT4/IRAP receptor [51]. However, our *in vivo* findings demonstrate that the behavioral effects evoked from LVV-h6 did not rely on OTr and this is a probable consequence of this Phe absence, which impair the inhibition of the catalytic site of AT4/IRAP. A classic example that would provide

further support to the hypotheses raised from these structure-activity clues, may be taken from the renin-angiotensin system. Same Phe removal results from the action of the angiotensin converting enzyme subtype 2, which converts angiotensin II to angiotensin-(1–7). The counterregulatory and mostly opposite effects displayed by these two peptides are consequence of Angiotensin II affinity for AT1 and AT2 receptors, whereas angiotensin-(1–7) binds preferentially to Mas receptor [93]. Therefore, small changes in the primary structure of the peptide may modify binding affinity and specificity, as seen in the comparison of the behavioral effects and of the mechanisms between LVV-h6 and LVV-h7.

5. Conclusion

We conclude that LVV-h6, a bioactive nonapeptide derived from the hemoglobin, modifies the anxiety-like and depressant-like behaviors of rats. The anxiolytic-like effect evoked by LVV-h6 does not depend on oxytocinergic, catecholaminergic or opioid systems, therefore, pathways other than these are underlying the effects of LVV-h6 upon anxiety. The antidepressant-like effect promoted by LVV-h6, in turn, depend on opioid pathways. Future experiments are needed to reveal the additional mechanisms (non-oxytocinergic, non-catecholaminergic and non-opioid) involved in the behavioral effects of LVV-h6, mainly the anxiolytic-like effect.

Support

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Universal406393/2018-4; PQ 308156/2018-8); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). DOCFixCAPES/FAPEG 2014. Kellen Cruz, Larissa Turones, Gabriel Camargo and Michelle Mendonça are recipients of CAPES PhD fellowship at the Post-Graduation Program in Biological Sciences. Lilian Liz was recipient of PIBIC/CNPq (2017–2018) honors fellowship. Danielle Ianzer was recipient of DCR CNPq/FAPEG.

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Submission declaration

The authors declare that the present work has not been published previously (except in the form of an abstract or as a part of an academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication has approved by all authors and, tacitly or explicitly, by the responsible authorities of the facilities in which the work was performed, and that, if accepted, the present work will not be published elsewhere in print or electronically in the same form in English or in any other language without the written consent of the copyright-holder.

Acknowledgment

We thank Dr. James Fajemiroye for proofreading the article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.03.002.

References

 A. Poljak, C.A. McLean, P. Sachdev, H. Brodaty, G.A. Smythe, Quantification of hemorphins in Alzheimer's disease brains, J. Neurosci. Res. 75 (March (5)) (2004) 704–714.

- [2] A. Adachi, N. Shimizu, Y. Oomura, M. Kobashi, Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract, Neurosci. Lett. 46 (1984) 215–218.
- [3] Y. Ago, S. Hasebe, N. Hiramatsu, H. Hashimoto, K. Takuma, T. Matsuda, Psychopharmacology of combined activation of the serotonin1A and sigma1 receptors, Eur. J. Pharmacol. 809 (2017) 172–177.
- [4] Alexia V. Williamsa AL-M, Crystal V. Armstronga, Stephanie Ramos-Maciela, Vanessa A. Miniea, Brian C. Trainora, Acute inhibition of kappa opioid receptors before stress blocks depressionlike behaviors in California mice, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 86 (2018) 166–174.
- [5] G. Aston-Jones, J.D. Cohen, An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance, Annu. Rev. Neurosci. 28 (2005) 403–450.
- [6] O. Babaev, C. Piletti Chatain, D. Krueger-Burg, Inhibition in the amygdala anxiety circuitry, Exp. Mol. Med. 50 (2018) 18.
- [7] G. Bagdy, K.T. Kalogeras, Stimulation of 5-HT1A and 5-HT2/5-HT1C receptors induce oxytocin release in the male rat, Brain Res. 611 (1993) 330–332.
- [8] S.L. Bealer, W.R. Crowley, Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats, Am. J. Physiol. 274 (1998) E453–8.
- [9] Berrocoso E.1 S-BP, J. Garzón, J.A. Mico, Opiates as antidepressants, Curr. Pharm. Des. 15 (2009) 1612–1622.
- [10] A.K. Bershad, J.H. Jaffe, E. Childs, H. de Wit, Opioid partial agonist buprenorphine dampens responses to psychosocial stress in humans, Psychoneuroendocrinology. 52 (2015) 281–288.
- [11] C.E. Beyer, J.M. Dwyer, B.J. Platt, S. Neal, B. Luo, H.P. Ling, et al., Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation, Psychopharmacology (Berl.) 209 (2010) 303–311.
- [12] D. Bhaskaran, C.R. Freed, Changes in arterial blood pressure lead to baroreceptormediated changes in norepinephrine and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat nucleus tractus solitarius, J. Pharmacol. Exp. Ther. 245 (1988) 356–363.
- [13] R.J. Bodnar, Endogenous opiates and behavior: 2009, Peptides. 31 (2010) 2325–2359.
- [14] V. Brantl, C. Gramsch, F. Lottspeich, R. Mertz, K.H. Jaeger, A. Herz, Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins, Eur. J. Pharmacol. 125 (1986) 309–310.
- [15] M.R. Bruchas, B.B. Land, J.C. Lemos, C. Chavkin, CRF1-R activation of the dynorphin/kappa opioid system in the mouse basolateral amygdala mediates anxiety-like behavior, PLoS One 4 (2009) e8528.
- [16] M.R. Bruchas, A.G. Schindler, H. Shankar, D.I. Messinger, M. Miyatake, B.B. Land, J.C. Lemos, C.E. Hagan, J.F. Neumaier, A. Quintana, R.D. Palmiter, C. Chavkin, Selective p38a MAPK deletion in serotonergic neurons produces stress resilience in models of depression and addiction, Neuron. 71 (2011) 498–511.
- [17] R.A. Bryant, M. Creamer, M. O'Donnell, D. Silove, A.C. McFarlane, A study of the protective function of acute morphine administration on subsequent posttraumatic stress disorder, Biol. Psychiatry 65 (2009) 438–440.
- [18] P.R. Burghardt, A.E. Rothberg, K.E. Dykhuis, C.F. Burant, J.K. Zubieta, Endogenous opioid mechanisms are implicated in obesity and weight loss in humans, J. Clin. Endocrinol. Metab. 100 (2015) 3193–3201.
- [19] N.E. Calcaterra, J.C. Barrow, Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium), ACS Chem. Neurosci. 5 (2014) 253–260.
- [20] E. Castren, T. Rantamaki, The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity, Dev. Neurobiol. 70 (2010) 289–297.
- [21] S.Y. Chai, M.A. Bastias, E.F. Clune, D.J. Matsacos, T. Mustafa, J.H. Lee, et al., Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography, J. Chem. Neuroanat. 20 (2000) 339–348.
- [22] S.Y. Chai, R. Fernando, G. Peck, S.Y. Ye, F.A. Mendelsohn, T.A. Jenkins, et al., The angiotensin IV/AT4 receptor, Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 2728–2737.
- [23] B.C. Cheng, P.L. Tao, Y.Y. Cheng, E.Y. Huang, LVV-hemorphin 7 and angiotensin IV in correlation with antinociception and anti-thermal hyperalgesia in rats, Peptides 36 (2012) 9–16.
- [24] H. Cohen, Z. Kaplan, N. Kozlovsky, Y. Gidron, M.A. Matar, J. Zohar, Hippocampal microinfusion of oxytocin attenuates the behavioural response to stress by means of dynamic interplay with the glucocorticoid-catecholamine responses, J. Neuroendocrinol. 22 (2010) 889–904.
- [25] T.P. Cominski, C.E. Turchin, M.S. Hsu, M.A. Ansonoff, J.E. Pintar, Loss of the mu opioid receptor on different genetic backgrounds leads to increased bromodeoxyuridine labeling in the dentate gyrus only after repeated injection, Neuroscience 206 (2012) 49–59.
- [26] J.F. Cryan, M.E. Page, I. Lucki, Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test, Eur. J. Pharmacol. 436 (2002) 197–205.
- [27] K.R. da Cruz, L.C. Turones, G. Camargo-Silva, K.P. Gomes, M.M. Mendonca, P. Galdino, et al., The hemoglobin derived peptide LVV-hemorphin-7 evokes behavioral effects mediated by oxytocin receptors, Neuropeptides 66 (2017) 59–68.
- [28] S.S. Daftary, C. Boudaba, J.G. Tasker, Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus, Neuroscience 96 (2000) 743–751.
- [29] E. Dailly, F. Chenu, C.E. Renard, M. Bourin, Dopamine, depression and antidepressants, Fundam. Clin. Pharmacol. 18 (2004) 601–607.
- [30] T.R. de Jong, J.G. Veening, B. Olivier, M.D. Waldinger, Oxytocin involvement in SSRI-induced delayed ejaculation: a review of animal studies, J. Sex. Med. 4 (2007) 14–28.

- [31] J.L. Devoize, F. Rigal, A. Eschalier, J.F. Trolese, M. Renoux, Influence of naloxone on antidepressant drug effects in the forced swimming test in mice, Psychopharmacology (Berl.) 84 (1984) 71–75.
- [32] B. Ferry, J.L. McGaugh, Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task, Neurobiol. Learn. Mem. 72 (1999) 8–12.
- [33] D. Filliol, S. Ghozland, J. Chluba, M. Martin, H.W. Matthes, F. Simonin, et al., Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses, Nat. Genet. 25 (2000) 195–200.
- [34] R. Frussa-Filho, H. Barbosa-Junior, R.H. Silva, C. Da Cunha, C.F. Mello, Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments, Psychopharmacology (Berl.) 147 (1999) 168–173.
- [35] A.A. Gershon, T. Vishne, L. Grunhaus, Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response, Biol. Psychiatry 61 (2007) 145–153.
- [36] A.R. Giles, Guidelines for the use of animals in biomedical research, Thromb. Haemost. 58 (1987) 1078–1084.
- [37] E.L. Glamsta, A. Marklund, U. Hellman, C. Wernstedt, L. Terenius, F. Nyberg, Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland, Regul. Pept. 34 (1991) 169–179.
- [38] I. Gomes, C.S. Dale, K. Casten, M.A. Geigner, F.C. Gozzo, E.S. Ferro, et al., Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules, AAPS J. 12 (2010) 658–669.
- [39] Halbach vBu, Angiotensin IV in the central nervous system, Cell Tissue Res. 311 (2003) 1–9.
- [40] G.C. Harburg, F.S. Hall, A.V. Harrist, I. Sora, G.R. Uhl, A.J. Eisch, Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons, Neuroscience 144 (2007) 77–87.
- [41] J.J. Herbst, S.A. Ross, H.M. Scott, S.A. Bobin, N.J. Morris, G.E. Lienhard, et al., Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes, Am. J. Physiol. 272 (1997) E600–6.
- [42] T.L. Holbrook, GM, J.L. Dye, K. Quinn, A.L. Dougherty, Morphine use after combat injury in Iraq and post-traumatic stress disorder, N. Engl. J. Med. 362 (2010) 110–117.
- [43] I. Izquierdo, C. da Cunha, R. Rosat, D. Jerusalinsky, M.B. Ferreira, J.H. Medina, Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat, Behav. Neural Biol. 58 (1992) 16–26.
- [44] J. Jores, S. Wagner, L. Rumer, J. Eichberg, C. Laturnus, P. Kirsch, et al., Description of a 111-kb pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic E. Coli (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype 0103:H2, Int. J. Med. Microbiol. 294 (2005) 417–425.
- [45] A.T. Knoll, W.A. Carlezon Jr., Dynorphin, stress, and depression, Brain Res. 1314 (2010) 56–73.
- [46] A.T. Knoll, E.G. Meloni, J.B. Thomas, F.I. Carroll, W.A. Carlezon Jr., Anxiolyticlike effects of k-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats, J. Pharmacol. Exp. Ther. 323 (2007) 838–845.
- [47] P. Kremarik, M.J. Freund-Mercier, M.E. Stoeckel, Oxytocin and vasopressin binding sites in the hypothalamus of the rat: histoautoradiographic detection, Brain Res. Bull. 36 (1995) 195–203.
- [48] R. Kuhn, The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride), Am. J. Psychiatry 115 (1958) 459–464.
- [49] I. Lantz, E.L. Glamsta, L. Talback, F. Nyberg, Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity, FEBS Lett. 287 (1991) 39–41.
- [50] J. Le Merrer, J.A. Becker, K. Befort, B.L. Kieffer, Reward processing by the opioid system in the brain, Physiol. Rev. 89 (2009) 1379–1412.
- [51] J.M.T. Lee, S.G. McDowall, F.A. Mendelsohn, M. Brennan, R.A. Lew, A.L. Albiston, S.Y. Chai, Structure-activity study of LVV-hemorphin-7: angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase, J. Pharmacol. Exp. Ther. 305 (2003) 205–211.
- [52] J. Lee, T. Mustafa, S.G. McDowall, F.A. Mendelsohn, M. Brennan, R.A. Lew, et al., Structure-activity study of LVV-hemorphin-7: angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase, J. Pharmacol. Exp. Ther. 305 (2003) 205–211.
- [53] R.A. Lew, T. Mustafa, S. Ye, S.G. McDowall, S.Y. Chai, A.L. Albiston, Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP), J. Neurochem. 86 (2003) 344–350.
- [54] P.E. Lutz, B.L. Kieffer, Opioid receptors: distinct roles in mood disorders, Trends Neurosci. 36 (2013) 195–206.
- [55] P. Mak, C. Broussard, K. Vacy, J.H. Broadbear, Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat, J. Psychopharmacol. 26 (2012) 532–542.
- [56] A.F. Martin del Campo, R.G. McMurray, G.M. Besser, A. Grossman, Effect of 12-hour infusion of naloxone on mood and cognition in normal male volunteers, Biol. Psychiatry 32 (1992) 344–353.
- [57] S.T. Mason, H.C. Fibiger, Current concepts. I. Anxiety: the locus coeruleus disconnection, Life Sci. 25 (1979) 2141–2147.
- [58] H. Matsumoto, T. Rogi, K. Yamashiro, S. Kodama, N. Tsuruoka, A. Hattori, et al., Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 46–52.
- [59] R.J. McQuaid, O.A. McInnis, A. Abizaid, H. Anisman, Making room for oxytocin in understanding depression, Neurosci. Biobehav. Rev. 45 (2014) 305–322.
- [60] I. Moeller, A.L. Albiston, R.A. Lew, F.A. Mendelsohn, S.Y. Chai, A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [3H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via

the AT4 receptor, J. Neurochem. 73 (1999) 301-308.

- [61] I. Moeller, R.A. Lew, F.A. Mendelsohn, A.I. Smith, M.E. Brennan, T.J. Tetaz, et al., The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain, J. Neurochem. 68 (1997) 2530–2537.
- [62] F.A. Moreira, F.S. Guimaraes, Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice, Eur. J. Pharmacol. 512 (2005) 199–205.
- [63] P. Huang, TY, J.V. Aldrich, J. Tunis, C. Perry, L.Y. Liu-Chen, Two short-acting kappa opioid receptor antagonists (zyklophin and LY2444296) exhibited different behavioral effects from the long-acting antagonist norbinaltorphimine in mouse anxiety tests, Neurosci. Lett. 615 (2016) 15–20.
- [64] P. Petrovic, B. Pleger, B. Seymour, S. Kloppel, B. De Martino, H. Critchley, et al., Blocking central opiate function modulates hedonic impact and anterior cingulate response to rewards and losses, J. Neurosci. 28 (2008) 10509–10516.
- [65] S.H. Pinheiro, H. Zangrossi Jr., C.M. Del-Ben, F.G. Graeff, Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents, An. Acad. Bras. Cienc. 79 (2007) 71–85.
- [66] J.M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricart, D. Thomas, Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate, Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 (1992) 101–110.
- [67] R.D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre, Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments, Eur. J. Pharmacol. 47 (1978) 379–391.
- [68] R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre, Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, Nature 266 (1977) 730–732.
- [69] H.P. Rang, J.M. Ritter, FR, G. Henderson, Rang e Dale: Farmacologia, 8 ed., (2016) Rio de Janeiro.
- [70] J.A. Ricardo, E.T. Koh, Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat, Brain Res. 153 (1978) 1–26.
- [71] G. Sanders, J. Freilicher, S.L. Lightman, Psychological stress of exposure to uncontrollable noise increases plasma oxytocin in high emotionality women, Psychoneuroendocrinology 15 (1990) 47–58.
- [72] M.F. Sardinia, J.M. Hanesworth, L.T. Krebs, J.W. Harding, AT4 receptor binding characteristics: D-amino acid- and glycine-substituted peptides, Peptides. 14 (1993) 949–954.
- [73] C. Saulo, S.E.K. Ribeiro, Yolanda R. Smith, Christian S. Stohler, Jon-Kar Zubieta, Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and A-opioid receptors, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29 (2005) 1264–1280.
- [74] J.A. Saydoff, P.A. Rittenhouse, L.D. van de Kar, M.S. Brownfield, Enhanced serotonergic transmission stimulates oxytocin secretion in conscious male rats, J. Pharmacol. Exp. Ther. 257 (1991) 95–99.
- [75] A. Sgoifo, D. Stilli, D. Medici, P. Gallo, B. Aimi, E. Musso, Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats, Physiol. Behav. 60 (1996) 1397–1401.
- [76] D.A. Slattery, J.F. Cryan, Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents, Nat. Protoc. 7 (2012) 1009–1014.
- [77] E.A. Stone, Y. Lin, Y. Sarfraz, D. Quartermain, The role of the central noradrenergic system in behavioral inhibition, Brain Res. Rev. 67 (2011) 193–208.
- [78] G.M. Sullivan, J.D. Coplan, J.M. Kent, J.M. Gorman, The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias, Biol. Psychiatry 46 (1999) 1205–1218.
- [79] A.L. Svingos, C. Chavkin, E.E. Colago, V.M. Pickel, Major coexpression of kappaopioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles, Synapse 42 (2001) 185–192.
- [80] L.W. Swanson, H.G. Kuypers, The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods, J. Comp. Neurol. 194 (1980) 555–570.
- [81] S.T. Szabo, C. de Montigny, P. Blier, Modulation of noradrenergic neuronal firing by selective serotonin reuptake blockers, Br. J. Pharmacol. 126 (1999) 568–571.
- [82] P.L. Tenore, Psychotherapeutic benefits of opioid agonist therapy, J. Addict. Dis. 27 (2008) 49–65.
- [83] M. Tsujimoto, S. Mizutani, H. Adachi, M. Kimura, H. Nakazato, Y. Tomoda, Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase, Arch. Biochem. Biophys. 292 (1992) 388–392.
- [84] K. Uvnas-Moberg, E. Bjokstrand, V. Hillegaart, S. Ahlenius, Oxytocin as a possible mediator of SSRI-induced antidepressant effects, Psychopharmacology (Berl.) 142 (1999) 95–101.
- [85] S. Wee, G.F. Koob, The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse, Psychopharmacology (Berl.) 210 (2010) 121–135.
- [86] C.L. Williams, D. Men, E.C. Clayton, The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala, Behav. Neurosci. 114 (2000) 1131–1144.
- [87] R.J. Windle, N. Shanks, S.L. Lightman, C.D. Ingram, Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats, Endocrinology 138 (1997) 2829–2834.
- [88] M.K.V.B.V.-L, TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: APLICAÇÕES E CONTRIBUIÇÕES NO ESTUDO DE DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS EM MODELOS ANIMAIS, RESBCAL 1 (2011) 102–120.
- [89] C.H. Xavier, E. Nalivaiko, M.I. Beig, G.B. Menezes, D.C. Cara, M.J. Campagnole-Santos, et al., Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus, Neuroscience 164 (2009) 1360–1368.
- [90] O.N. Yatskin, M.M. Philippova, E. Blishchenko, A.A. Karelin, V.T. Ivanov, LVV- and VV-hemorphins: comparative levels in rat tissues, FEBS Lett. 428 (1998) 286–290.
- [91] J.J.1 Zhang, LX, L.C. Yu, Influences of morphine on the spontaneous and evoked

excitatory postsynaptic currents in lateral amygdala of rats, Physiol. Res. 65 (2016)

- 165–169.[92] T.T. Zhang, R. Xue, L. Zhu, J. Li, Q.Y. Fan, B.H. Zhong, et al., Evaluation of the analgesic effects of ammoxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, Acta Pharmacol. Sin. 37 (2016) 1154–1165.
- [93] R.A.S. Santos, W.O. Sampaio, A.C. Alzamora, D. Motta-Santos, N. Alenina, M. Bader, M.J. Campagnole-Santos, The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7), Physiol Rev. 98 (1) (2018) 505–553, https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016.