



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UFSCar/UNESP**



**PAPEL DOS MECANISMOS MEDIADOS PELO FATOR DE
LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINA E PELO COMPLEXO
RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO-ÓXIDO NÍTRICO
NAS REAÇÕES ASSOCIADAS A ESTÍMULOS AVERSIVOS**

TARCISO TADEU MIGUEL

**ARARAQUARA
2010**



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UFSCar/UNESP**



**PAPEL DOS MECANISMOS MEDIADOS PELO FATOR DE
LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINA E PELO COMPLEXO
RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO-ÓXIDO NÍTRICO
NAS REAÇÕES ASSOCIADAS A ESTÍMULOS AVERSIVOS**

TARCISO TADEU MIGUEL

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Convênio entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr.

RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

**ARARAQUARA
2010**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M636p Miguel, Tarciso Tadeu
Papel dos mecanismos mediados pelo fator de liberação de corticotrofina e pelo complexo receptor N-metil-D-aspartato-óxido nítrico nas reações associadas a estímulos aversivos . / Miguel Tarciso Tadeu. – Araraquara, 2010.
209 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas UFCar/UNESP
Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza

. 1. Ansiedade. 2. Comportamento animal – Efeito de drogas. 3. Sistema nervoso central. 4. Fator de liberação de corticotrofina. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **DEUS** pelo dom da vida e compreensão do quanto importante é fazer as coisas com amor e dedicação:

“Ainda que falasse a língua dos homens e dos anjos, que tivesse uma fé capaz de mover montanhas, se não tiver o amor, de nada valeria”. *I Coríntios 13*.

Dedico também a **Jesus Cristo**, meu mestre que me guia pelas estradas da vida, à memória de meu pai **José Miguel** e à minha mãe **Honorina Ferreira Miguel** pelo amor e dedicação em todos os momentos da minha vida, principalmente quando eu mais precisava sempre me animava e me dava força para continuar a luta. Por sua causa nunca pensei em desistir.

AGRADECIMENTOS

À minha irmã **Roseli Aparecida Miguel** e meus irmãos **Antônio Ferreira Miguel** e **José Miguel Filho** pelo incentivo.

À minha cunhada **Ana Conceição de M. B. Miguel** e à minha linda sobrinha **Anna Elice Bertoldi Miguel**.

Ao Professor Doutor **Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pela orientação científica neste trabalho de maneira presente sempre atuando de modo a garantir minha formação. Sua orientação foi crucial para meu crescimento como pesquisador e como pessoa. Ricardo: meus sinceros agradecimentos além de respeito, admiração e amizade. Você é um exemplo a ser seguido! Não somente por sua competência, mas também pelo modo como você conduz sua vida profissional: um pesquisador de elevada competência e respeito sem, no entanto, deixar de ser acessível àqueles que convivem com você. Obrigado!

Ao Prof. Dr. **Klaus Miczek**, por sua orientação e amizade durante meu estágio de doutorado sanduíche no exterior, obrigado pela oportunidade e pelo respeito.

À Dra **Isabel Quadros**, pela amizade, apoio e socorro tanto na vida profissional como na vida pessoal no período do estágio de doutorado sanduíche. Isabel: não tenho palavras para agradecer por tudo que você me fez! Nunca esquecerei!

À **banca examinadora** pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Ao Professor Doutor **Laurival Antônio De Luca Júnior**, quem primeiro me orientou na Iniciação Científica no Depto de Fisiologia e Patologia, de modo que sua colaboração inicial foi muito importante para que eu me identificasse com a Ciência e desse prosseguimento à carreira acadêmica.

À Professora Doutora **Cleopatra da Silva Planeta**, pela amizade, competência e disposição em ajudar sempre que foi preciso. Professora Cleo: admiro você por essas e outras características que a fazem uma profissional de respeito.

Aos Professores: **Dra. Azair Liane Matos Canto de Souza, Dra. Maria do Carmo Longo, Dr. José Francisco Fracasso, Dr. Carlos César Crestani, José Salvador Lepera** pela amizade e apoio durante o período do desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Farmacologia da FCFar/UNESP, **Elizabeth Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupin Silva**, pela extrema competência sem deixar de lado a humildade e prontidão para ajudar, à vocês minha amizade e admiração.

Aos meus amigos de Araraquara e de República: aos irmãos de casa: **Rodrigo (Vampeta), Fábio (Quasy), Daniel (Sashimi) e Carlos**; à **República Várzea** (todos os moradores e ex-moradores e agregados com quem convivi e tenho muita amizade: sempre varzeano!), à **República Raparigas e Krakatoa, Layane e Argenti, Lilia e Marcelo, Jerusa e Thunder, Batata, Carol Brito, Milena, Naiana, Luciano, Medelin e Thais**.

Aos amigos da pós-graduação: **Richard, Daniela Borba, André, Graziela, Gabriel, Lucas Souza, Daniela, Juliana, Thais** pela amizade e convivência.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia **Fábio, Joyce, Alianda, Karina, Vanessa, Marcelo, Rodrigo, Roberta, Ana Paula, Paulão, Paulo Nogueira, Diego, Yara, Ana Cláudia, Tatiani, Renata, Bruna, Ligia, Thiago (Alfinete), Matheus (Capiáu), Alexandre, Ana Clara, Kelciane, Sheila, Marília, Ludmila** pela amizade e apoio dedicados.

Aos amigos extra-Araraquara: **Agatha, Eduardo (Fartura), Eduardo Antônio, Paula, Carla, Alessandra, Caqui e Lu, Beth e Tony, Jasmine e Brian, Aki, Akiko, Adam, Lara, Chris, Cristiano, Adriano e Letícia, Tia Cida, Madrinha Abadia e toda família, Thiago e Fernanda.**

Aos secretários **Alexandre e Mara**, pela assistência prestada na secretaria do PIPGCF.

À **Tirene** pela disponibilidade e competência nos serviços prestados na secretaria do PANT. Tirene: você é uma pessoa especial.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (**FAPESP** – processo 05/05171-1), pelo apoio financeiro.

A **Tufts University** pelo espaço físico e apoio financeiro.

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, UFSCar e UNESP/Araraquara.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara** da UNESP, pelo espaço físico laboratorial, equipamentos, e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

Ao **Laboratório de Comportamento Exploratório da USP/Ribeirão Preto (Professor Silvio Morato de Carvalho)**, por ceder-nos o programa de análise de comportamento X-Plo-Rat, e acessar-nos tecnicamente, quanto ao seu uso.

Miguel, T.T. Papel dos mecanismos mediados pelo fator de liberação de corticotrofina e pelo complexo receptor N-metil-D-aspartato-óxido nítrico nas reações associadas a estímulos aversivos. [Tese de Doutorado]. Araraquara: UFSCar/UNESP; 2010.

RESUMO

Os confrontos dos animais com situações que induzem medo e ansiedade resultam em uma série de respostas comportamentais defensivas (ex. luta, fuga, imobilidade, vocalização, etc.), ativação neurovegetativa (ex. taquicardia, hipertensão, defecação, etc.), antinocicepção, além de influenciar o comportamento agressivo e aumentar a vulnerabilidade à dependência e recaída ao uso de drogas. Com base no potencial efeito ansiogênico dos neurotransmissores glutamato (via ativação do complexo receptor NMDA-óxido nítrico) e fator liberador de corticotrofina (via receptores CRF1 e CRF2), este estudo investigou o papel desses mediadores, através de injeções sistêmicas, na matéria cinzenta periaquedutal (MCP) ou no núcleo dorsal da rafe (NDR), nas respostas apontadas acima. Os seguintes modelos foram utilizados: labirinto em cruz elevado (LCE, ansiedade), injeção de formalina a 2,5% (nocicepção), conflito intruso-residente (agressão) e estresse de derrota social (dependência à cocaína). Os resultados indicaram: a) o efeito ansiogênico do agonista de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato; NMDA) na MCP foi antagonizado pela inibição da enzima de síntese de NO, b) os efeitos ansiogênico e antinociceptivo do CRF na MCP foram via ativação de receptores CRF1 (mas não CRF2) e independentes de NO, c) os efeitos aversivo e antinociceptivo do NO (via administração de um doador de NO) na MCP mostraram-se sensíveis ao bloqueio de receptores CRF1, d) a ativação de receptores CRF2 intra-NDR reduziu o comportamento agressivo induzido pelo conflito intruso-residente, e) o tratamento sistêmico com antagonista CRF1 bloqueou a sensibilização comportamental à cocaína e atenuou o aumento do consumo da mesma induzidos pelo estresse da derrota social.

Palavras-chaves: Ansiedade; comportamento animal - efeito de drogas; sistema nervoso central, fator de liberação de corticotrofina

Miguel, T.T. Role of mechanisms mediated by corticotropin-releasing factor and by N-methyl-D-aspartate receptor - nitric oxide complex in the reactions associated to aversive stimulus. [Doctorate thesis]. Araraquara: UFSCar/UNESP

ABSTRACT

Animal confrontation against fear/anxiety-induced situations results in a repertory of behavioral defensive responses (e.g., fight, flight, immobility, vocalization), neurovegetative activation (e.g., tachycardia, hypertension, defecation), antinociception, as well as affects aggressive behavior and increases animals vulnerability to addiction and relapse to drug take. Based on the potential anxiogenic effect elicited by glutamate (via activation of NMDA-nitric oxide receptor complex) and corticotropin releasing factor (via CRF1 and CRF2 receptors), this study investigated the effect of systemic, intra-periaqueductal gray (PAG) or intra-dorsal raphe nucleus (DRN) injections of these mediators on the above described responses. The following animal models were used: elevated plus maze (EPM, anxiety test), formalin 2.5% injection (nociceptive test), resident-intruder conflict (aggression test) and social defeat stress (to induce cocaine addiction). Results indicated that: a) the anxiogenic effect elicited by intra-PAG injection of glutamate NMDA (N-methyl-D-aspartate; NMDA) receptor agonist was antagonized by prior local infusion an NO synthase inhibitor, b) the anxiogenic and antinociceptive effects elicited by intra-PAG CRF were mediated by CRF1 (but not CRF2) receptor activation and did not depend on NO synthesis, c) the aversive and antinociceptive effects of NO production (induced by intra-PAG injection of a NO donor) were sensitive to CRF1 blockade, d) activation of the CRF2 receptor within the DRN attenuated aggressive behavior elicited by resident-intruder conflict, e) systemic treatment with CRF1 receptor antagonist inhibited cocaine behavioral sensitization and social-defeat stress-induced cocaine consumption.

Keywords: Anxiety; animal behavior - drug effects; central nervous system, corticotropin-releasing factor

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 Ansiedade e comportamentos defensivos: Histórico, conceitos e epidemiologia.....	13
1.2 Transtornos de ansiedade.....	17
1.2.1 Características gerais.....	17
1.2.2 Classificação.....	21
1.2.3 Substratos neurais envolvidos nos sistemas encefálico de defesa e de inibição comportamental – mediação dos transtornos de ansiedade.....	23
1.3 Antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade.....	27
1.3.1 Neurobiologia e aspectos gerais da dor.....	27
1.3.2 Antinocicepção induzida pelo medo.....	30
1.4 Modelos animais.....	32
1.5 Neurotransmissão: glutamato, óxido nítrico (NO) e fator de liberação de corticotrofina (CRF).....	35
CAPÍTULO 2.....	50
EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-MCP DE NMDA NA ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS NO LCE: AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO NITRÉRGICA.....	51
2.1 OBJETIVO.....	52
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
2.2.1 Sujeitos.....	52
2.2.2 Cirurgia e administração de drogas na MCP.....	52
2.2.3 Fármacos.....	53
2.2.4 Avaliação dos Comportamentos de Defesa.....	54
2.2.5 Histologia.....	54
2.2.6 Análise estatística.....	55
2.2.7 Delineamento Experimental.....	56
2.2.7.1 Experimento 2.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NMDA na MCP sobre a ansiedade.....	56
2.2.7.2 Experimento 2.B: Efeito do pré-tratamento com NPLA sobre a ação ansiogênica do NMDA na MCP.....	56
2.3 RESULTADOS.....	57

2.3.1 Sítio de injeção.....	57
2.3.2 Experimento 2.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NMDA na MCP sobre a ansiedade.....	58
2.3.3 Experimento 2.B: Efeito do pré-tratamento com NPLA sobre a ação ansiogênica do NMDA na MCP.....	59
2.4 DISCUSSÃO.....	62
CAPÍTULO 3.....	67
EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-MCP DE CRF NA ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS NO LCE E NA NOCICEPÇÃO: AVALIAÇÃO DA MEDIAÇÃO DOS SUBTIPOS DE RECEPTORES CRFérgicos E DA PARTICIPAÇÃO NITRÉRGICA.....	68
3.1 OBJETIVO.....	70
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.2.1 Sujeitos.....	71
3.2.2 Cirurgia e administração de drogas na MCP.....	71
3.2.3 Fármacos.....	71
3.2.4 Avaliação das reações de defesa - grupo ansiedade.....	72
3.2.5 Teste de Nocicepção - grupo nocicepção.....	72
3.2.5.1 Teste da formalina.....	72
3.2.6 Histologia.....	73
3.2.7 Análise Estatística.....	73
3.2.8 Delineamento Experimental.....	74
3.2.8.1 Experimento 3.A: Avaliação do efeito da microinjeção de CRF na MCP sobre a ansiedade e nocicepção.....	74
3.2.8.2 Experimento 3.B: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.....	75
3.2.8.3 Experimento 3.C: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF2 da MCP, com o pré-tratamento com ASV-30, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.....	76
3.2.8.4 Experimento 3.D: Avaliação da inibição da síntese de NO na MCP, com o pré-tratamento com NPLA, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.....	77
3.2.8.5 Experimento 3.E: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito antinociceptivo da exposição ao LCE aberto.....	78
3.3 RESULTADOS.....	78

3.3.1 Experimento 3A: Avaliação do efeito da microinjeção de CRF na MCP sobre a ansiedade e nocicepção.....	78
3.3.2 Experimento 3.B: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.....	81
3.3.3 Experimento 3.C: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF2 da MCP, com o pré-tratamento com ASV-30, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.....	84
3.3.4 Experimento 3.D: Avaliação da inibição da síntese de NO na MCP, com o pré-tratamento com NPLA, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.....	88
3.3.5 Experimento 3.E: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito antinociceptivo da exposição ao LCE aberto.	91
3.4 DISCUSSÃO.....	92
CAPÍTULO 4.....	104
EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-MCP DE NOC-9 SOBRE OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E NOCICEPÇÃO: AVALIAÇÃO DA MEDIAÇÃO CRFérgica.....	105
4.1 OBJETIVO.....	106
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	106
4.2.1 Sujeitos.....	106
4.2.2 Cirurgia e administração de drogas na MCP.....	106
4.2.3 Fármacos.....	107
4.2.4 Avaliação das reações de defesa.....	107
4.2.5 Teste de Nocicepção.....	108
4.2.5.1 Teste da formalina.....	109
4.2.6 Histologia.....	109
4.2.7 Análise Estatística.....	109
4.2.8 Delineamento Experimental.....	110
4.2.8.1 Experimento 4.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NOC-9 na MCP sobre os comportamentos defensivos e nocicepção.....	110
4.2.8.2 Experimento 4.B: Avaliação dos efeitos do bloqueio de receptores CRF1 com injeção intra-MCP de NBI 27914 (antagonista CRF1) sobre o efeito aversivo do NOC-9 na MCP.....	111
4.3 RESULTADOS.....	112
4.3.1 Experimento 4.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NOC-9 na MCP sobre os comportamentos defensivos e nocicepção.....	112

4.3.2 Experimento 4.B: Avaliação dos efeitos do bloqueio de receptores CRF1 com injeção intra-MCP de NBI 27914 (antagonista CRF1) sobre o efeito aversivo do NOC-9 na MCP.....	113
4.4 DISCUSSÃO.....	117
CAPÍTULO 5.....	123
COMPORTAMENTO AGRESSIVO EM CAMUNDONGOS: ESTUDO DA MEDIAÇÃO DO RECEPTOR CRF2 NO NÚCLEO DORSAL DA RAPE.....	124
5.1 COMPORTAMENTO AGRESSIVO E ANSIEDADE.....	125
5.2 COMPORTAMENTO AGRESSIVO E CRF.....	130
5.3 OBJETIVO.....	132
5.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	133
5.4.1 Sujeitos.....	133
5.4.2 Autoadministração de álcool.....	133
5.4.3 Confronto Residente-Intruso e Agressão intensificada pelo álcool.....	134
5.4.4 Cirurgia e administração de fármacos no Núcleo Dorsal da Rafe.....	135
5.4.5 Fármacos.....	136
5.4.6 Avaliação do Comportamento Agressivo.....	136
5.4.7 Delineamento experimental.....	136
5.4.7.1 Experimento 5.A: Avaliação do efeito da microinjeção de Urocortina II (agonista CRF2) no NDR sobre o comportamento agressivo.....	136
5.4.7.2 Experimento 5.B: Avaliação do efeito da microinjeção de Astressin 2B (antagonista CRF2) no NDR sobre o comportamento agressivo.....	137
5.4.8 Histologia.....	137
5.4.9 Análise Estatística.....	138
5.5 RESULTADOS.....	138
5.6 DISCUSSÃO.....	140
CAPÍTULO 6.....	147
ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL E AUTOADMINISTRAÇÃO DE COCAÍNA: ESTUDO DA MEDIAÇÃO CRFérgica.....	148
6.1 COCAÍNA.....	148
6.2 ANSIEDADE, ESTRESSE SOCIAL E DEPENDÊNCIA.....	149
6.3 OBJETIVO.....	155
6.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	155
6.4.1 Sujeitos.....	155

6.4.2 Fármacos.....	156
6.4.3 Estresse de derrota social.....	156
6.4.3.1 Residentes - desenvolvimento de dominância.....	156
6.4.3.2 Sessões de estresse de derrota social e prévio tratamento com CP 154,526.....	157
6.4.4 Sensibilização Comportamental a Cocaína.....	158
6.4.5 Cirurgia para implantação de cateter na veia jugular.....	159
6.4.6 Autoadministração.....	160
6.4.6.1 Aquisição e manutenção.....	161
6.4.6.2 Razão progressiva.....	161
6.4.6.3 Livre-acesso à cocaína durante 24 horas - “Binge”.....	162
6.4.7 Análise Estatística.....	162
6.5 RESULTADOS.....	163
6.5.1 Expressão da sensibilização comportamental.....	163
6.5.2 Auto-administração de cocaína - razão progressiva.....	165
6.5.3 Livre-acesso à cocaína durante 24 horas - “Binge”.....	166
6.6 DISCUSSÃO.....	167
CAPÍTULO 7.....	176
CONCLUSÕES GERAIS DO ESTUDO.....	177
CAPÍTULO 8.....	181
REFERÊNCIAS.....	182
APÊNDICE.....	210

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ANSIEDADE E COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS: HISTÓRICO, CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA.

Os confrontos dos animais com situações aversivas que induzem medo e ansiedade resultam na expressão de uma série de respostas comportamentais denominadas respostas defensivas (luta, fuga, imobilidade, vocalização, etc.) bem como na ativação autonômica (taquicardia, hipertensão, defecação, etc.). Tais reações são geralmente acompanhadas de inibição da resposta a estímulos nociceptivos, denominado antinocicepção (KELLY, 1986; RODGERS, 1995).

O estudo sistemático da ansiedade e do medo tomou grande impulso a partir dos trabalhos originais de Charles Darwin publicados no seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872, Apud ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). A partir de então, a abordagem evolucionária proposta por Darwin tem permeado muitas das teorias sobre a função e a importância que as emoções desempenham para as diferentes espécies. Por esta abordagem, o homem, tendo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes suas emoções, possibilitando que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais fossem traçadas (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Com base nesses achados, postula-se que medo e ansiedade são emoções decorrentes das respostas dos animais frente a estímulos aversivos que lhes apresentem perigo ou ameaça à sobrevivência. Tais estímulos, como por exemplo, o ataque de um predador ou alguns confrontos co-específicos, podem

resultar na exibição de um repertório de respostas comportamentais e autonômicas, denominadas reações de defesa, coordenadas pela ativação de determinadas áreas encefálicas que juntamente compõem o sistema encefálico de defesa, com objetivo de manter e proteger a vida. Outros estímulos ambientais, tais como altura excessiva, iluminação intensa, tempestades, incêndio, exposição a lugares novos, também são caracterizados como aversivos e podem eliciar tais reações, que são compostas por comportamentos de fuga e/ou ataque defensivo (luta), esquiva ativa e inibitória, congelamento (*freezing*), avaliação de risco bem como pela ativação autonômica como, por exemplo: taquicardia, vasoconstrição, aumento da pressão arterial e outras manifestações (BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD; BLANCHARD, 2003).

Estas reações, somadas às alterações endógenas como liberação de hormônios e neurotransmissores [ex., adrenalina, CRF/ACTH (hormônio adrenocorticotrófico)/cortisol, glutamato, etc.)], sinalizam que o organismo está preparado para responder àquela ameaça, seja fugindo ou enfrentando-a, dependendo da natureza da ameaça e a estratégia adotada. Esse preparo abrange a exibição das reações acima citadas, sendo todas elas ferramentas importantes para preservação da vida.

Embora tais alterações sejam importantes quando exibidas diante de um contexto ou situação aversivos, tornam-se mal-adaptadas em condições que não oferecem perigo nem hostilidade ao indivíduo. Em se tratando da espécie humana, estas respostas defensivas eliciadas irão dar origem aos transtornos de ansiedade (BLANCHARD et al., 2001; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004)

Neste contexto, em um breve histórico, Pichot (1996) coloca que os termos latinos correspondentes à angústia e ansiedade derivam do verbo grego *agkho*, que significa “eu aperto, eu estreito”. Deste, surgem no latim os verbos *ango* e *anxio*, que significam aperto, constrição física e tormento. Estes, por sua vez, originaram os termos atualmente empregados em medicina nas línguas modernas. No português, como no francês surgem dois termos técnicos “angústia” e “ansiedade”. No inglês, somente é utilizado o termo *anxiety* onde o termo *anguish* tem uso literário sem significação técnica. No alemão, utiliza-se o termo *angst*, o que implica uma interessante possibilidade semântica que é a possível aplicação tanto para angústia como para medo; tal semelhança neste termo alemão é alvo de muita discussão em nossa área de pesquisa no que diz respeito a essa junção ou dicotomia dos termos ansiedade x medo como expressão da ativação de estruturas cerebrais.

Os transtornos de ansiedade começaram a ser clinicamente considerados quando Beard, em 1869, usou o termo “neurastenia” para descrever pacientes com graus moderados de ansiedade e depressões leves. A partir de então, Da Costa, em 1871, relatou uma síndrome entre os militares da Guerra Civil americana, a qual chamou de Síndrome do Coração Irritável, cujo conceito era mais restrito e se aproximaria mais das futuras descrições de transtornos de ansiedade. Foi em 1895, que Freud usou pela primeira vez o termo neurose de ansiedade, postulando que os conflitos intrapsíquicos gerariam a ansiedade, que seria a base de todas as neuroses. Kraepelin descreveu, em 1896, sintomas ansiosos que surgem em situações aversivas como incêndios, acidentes e catástrofes (*apud* FIGUEIREDO, 2004).

Mais recentemente, em 1985, Pichot (*apud* FIGUEIREDO, 2004) descreve a ansiedade como um estado emocional desagradável, que em geral consiste fenomenologicamente de três condições essenciais: sentimento ou sensação de perigo iminente, atitude de expectativa em relação a esse perigo e ainda um sentimento de desorganização ou desamparo diante do perigo. Contudo, entende-se que não se consegue descrever um inequívoco estado patológico devido à complexidade e subjetividade do entendimento desses transtornos.

De acordo com Bernik e Minuttentag (2004), devido à grande importância médico-social dos transtornos de ansiedade, torna-se interessante uma análise econômica destas doenças. Os quadros de ansiedade dentro do contexto dos transtornos mentais, sempre foram considerados problemas menores, geralmente associados a um prognóstico mais benigno. No mundo inteiro, as psicoses e o transtorno bipolar eram mais merecedores dos poucos recursos disponíveis para saúde mental. Apenas na década de 80, período em que os transtornos de ansiedade passaram a ser diagnosticados dissociados do genérico termo “psiconeuroses”, foi possível obter melhorias na caracterização clínica, prognóstico e tratamento desses transtornos.

Os transtornos de ansiedade são as formas mais comuns de todos os transtornos mentais e resultam em considerável prejuízo funcional e sofrimento (BERNIK; MINUTTENTAG, 2004). A cada ano, 44 milhões de americanos, entre 15 e 54 anos, apresentam algum tipo de transtorno psiquiátrico. Mais de um terço desses indivíduos, cerca de 15,7 milhões de pessoas, sofre de transtorno de ansiedade. Dados do Estudo Epidemiológico por Área (*Epidemiologic Catchment Area – ECA*) nos Estados Unidos confirmam a alta frequência populacional de

transtornos de ansiedade, 23% incluindo-se todos os transtornos, inclusive fobias. O *National Comorbidity Survey* (NCS) mais recente (2005) utilizou os critérios do DSM-IV americano e confirmou que os transtornos de ansiedade são os transtornos psiquiátricos mais prevalentes na população, com índices estimados de 28,8% ao longo da vida e uma prevalência de 18,1% em 12 meses, na população geral. Ainda de acordo com estes levantamentos, as mulheres americanas, em geral, possuem probabilidade significativamente maior de desenvolver a maioria dos transtornos de ansiedade quando comparadas aos homens. No Brasil, infelizmente os dados epidemiológicos são escassos e antigos. Dentre eles estão os de Mari e Jorge (1997) que também apontam as mulheres como as mais acometidas (9% ao ano) pelos transtornos de ansiedade que os homens (4,3% ao ano). A alta prevalência dos transtornos de ansiedade torna esse grupo de patologias um problema de saúde pública, que envolve as lideranças governamentais, gerando custos sociais elevados aos cofres públicos e grande prejuízo nos índices de qualidade de vida da população atingida, provocando impacto pessoal, social e econômico negativos.

1.2 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A ansiedade é uma das causas mais comuns que levam os pacientes a procurar auxílio médico ou psiquiátrico (HETEM, 2004). Em geral, há uma combinação de sintomas somáticos e psíquicos (ver Tabelas 1 e 2). Devido à

grande quantidade de sintomas físicos da ansiedade, muitas vezes o paciente acaba procurando o clínico geral e não o psiquiatra. Levantamentos realizados com médicos que atuam nos serviços de assistência primária mostraram que a ansiedade é o problema psiquiátrico mais frequentemente encontrado em sua prática.

O diagnóstico de transtorno de ansiedade é predominantemente clínico, baseado na presença de sintomas e sinais na história pregressa. É de suma importância essa avaliação clínica, pois o conjunto dos sintomas de ansiedade pode fazer parte de uma reação normal, ser causado por alguma doença ou induzido por alguma substância; ser epifenômeno de outro transtorno psiquiátrico, ou ainda finalmente, ser a manifestação de algum transtorno de ansiedade propriamente dito (HETEM, 2004). No caso de ser caracterizado como a principal manifestação do quadro clínico, denomina-se ansiedade primária. Se for consequência de outras doenças psiquiátricas ou de outra etiologia, denomina-se ansiedade secundária e a tendência é que desapareça com a cura da doença que originou (GRAEFF, 1999).

Em muitos casos podemos apresentar sintomas de ansiedade provocados por alguma situação ou antecipação a determinado evento de relevância para nossa vida, como por exemplo, uma entrevista de emprego, uma prova ou ainda em situações normais na vida e no cotidiano que podem gerar expectativas. Estes acontecimentos podem ser causas de uma ansiedade normal, não prejudicando o desempenho de um indivíduo, pelo contrário, podem configurar como um agente de motivação. Neste caso, a ansiedade seria um motivador para o bom desempenho nas tarefas consideradas difíceis e/ou desafiadoras. No entanto, a

exacerbação na sensação e percepção desses sintomas ou prolongamento do período em que eles se apresentam podem ser indicativos da manifestação de algum transtorno de ansiedade. Cabe ressaltar que cada indivíduo possui um limiar, e quando o nível de ansiedade ultrapassa esse limiar, ela passa a ser considerada patológica (HETEM, 2004).

Nem sempre é fácil distinguir entre a ansiedade normal e aquela patológica, considerada doença. A diferenciação baseia-se na intensidade das manifestações e sintomas, na sua duração, na proporcionalidade da relação entre o evento desencadeante e a reação de ansiedade, e no grau de limitação ocasionado. Quando a ansiedade é intensa, persistente e desproporcional às possíveis causas aparentes e ainda acaba por interferir na qualidade de vida e no rendimento do indivíduo, esta é considerada patológica e, portanto, merecedora de uma atenção e intervenção médica.

Tabela 1 - Manifestações psíquicas dos transtornos de ansiedade.

⇒ Agressividade	⇒ Apreensão
⇒ Desejo de escapar de certas situações	⇒ Despersonalização
⇒ Desrealização	⇒ Ideação suicida
⇒ Impulsividade	⇒ Irritabilidade
⇒ Nervosismo	⇒ Medo de ficar louco ou fora de si
⇒ Medo de perder o controle	⇒ Medo de morrer
⇒ Pânico	⇒ Prejuízo da atenção/concentração
⇒ Preocupações desnecessárias e exageradas	⇒ Sensação de desassossego, mal estar
⇒ Sensação de estar “no limite”	⇒ Sensação de estar “ligado”, “estimulado”
⇒ Sensação de medo, de estar assustado	⇒ Sensação de perigo iminente/Tensão

Adaptado de Hetem (2004)

Tabela 2 - Manifestações somáticas dos transtornos de ansiedade

➔ Cardiovasculares	- Aumento da Pressão Arterial - Taquicardia - Palpitações - Extra-sístoles - Dor/desconforto torácico
➔ Gastrointestinais	- Boca seca - Náuseas e vômitos - Diarréia - Alterações do apetite - Desconforto epigástrico
➔ Geniturinários	- Aumento do número de micções - Hesitação e/ou urgência miccional - Amenorréia
➔ Otoneurológicos	- Dor de cabeça - Tonturas - Tremor - Hiper-reflexia - Parestesias - Sensação de instabilidade - Reflexo de sobressalto exagerado - Midríase/Visão borrada - Zumbido no ouvido
➔ Perturbações do sono	- Insônia de conciliação - Sono entrecortado e/ou pouco repousante
➔ Respiratórios	- Sensação de falta de ar/sufocamento - Taquipnéia - Encurtamento dos movimentos respiratórios
➔ Sexuais	- Diminuição da libido - Impotência - Ejaculação precoce - Frigidez
➔ Tensão motora	- Tremor - Fasciculações - Tensão muscular - Inquietação - Dor muscular/Sensação de fraqueza
➔ Vasomotores	- Extremidades frias - Calafrios e/ou ondas de calor - Rubor - Sudorese

Adaptado de Hetem (2004)

1.2.2 CLASSIFICAÇÃO

A classificação dos transtornos de ansiedade surgiu tardiamente dentro da classificação de transtornos mentais por dois motivos principais, sendo um o não reconhecimento como entidades clínicas distintas e um segundo motivo é que as primeiras classificações oficiais de que se tem notícia se destinavam basicamente a registrar os pacientes internados em instituições psiquiátricas, sendo que os sintomas ansiosos, quando descritos, eram relacionados à depressão grave (FIGUEIREDO, 2004).

Historicamente, a primeira classificação de transtornos mentais ocorreu nos Estados Unidos onde, no censo de 1840, continha apenas uma categoria para todas as doenças mentais que era a idiotia e insanidade. Já em 1880, sete categorias foram catalogadas: mania, melancolia, monomania, paresia, demência, dipsomania e epilepsia (FIGUEIREDO, 2004).

A partir de então, sucessivas alterações na classificação foram acontecendo com objetivo de melhorar e particularizar cada transtorno. Mesmo havendo muita discrepância e desentendimento entre os profissionais da psiquiatria, houve inegável evolução no processo de classificação. Visando amenizar tais discrepâncias e padronizar a classificação, foram adotados alguns critérios operacionais pela Organização Mundial de Saúde através da revisão do Código Internacional de Doenças (CID), e pela Associação Psiquiátrica Americana (APA), através da elaboração do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (*Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders – DSM*), publicado em 1952. Atualmente, temos versões mais atualizadas como o CID-10 e o DSM-IV,

publicado em 1994, revisado em 2000 (DSM-IV-R). O DSM-V está em preparação e a perspectiva é que seja publicado em 2011.

A Tabela 3 abaixo apresenta a classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM-IV, publicado em 1994.

Tabela 3 - Classificação dos transtornos de Ansiedade

Transtorno de Pânico sem Agorafobia
Transtorno de Ansiedade Generalizada
Transtorno de Pânico com Agorafobia
Agorafobia sem histórico de Transtorno do Pânico
Fobia Social
Fobia Específica
Transtorno Obsessivo-Compulsivo
Transtorno de Estresse Pós-traumático
Transtorno de Estresse Agudo
Transtorno de Ansiedade SOE (sem outra especificação)
Transtorno de Ansiedade devido a uma condição médica geral
Transtorno de Ansiedade induzido por substância

Adaptado de Hetem (2004)

Em uma visão evolutiva, os transtornos de ansiedade enfatizados neste trabalho são vistos como patologias do sistema encefálico de defesa humano (ver item 1.2.3. abaixo), e, desta forma, a investigação das reações de defesa através de ensaios em mamíferos, como os roedores, torna-se de alta relevância para o entendimento e compreensão dos seus mecanismos neurobiológicos subjacentes (BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF, 1990; GRAEFF, 2002; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

1.2.3 SUBSTRATOS NEURAIS ENVOLVIDOS NOS SISTEMAS ENCEFÁLICO DE DEFESA E DE INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL – MEDIAÇÃO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Embora haja numerosos estudos relacionando comportamentos defensivos com o medo e a ansiedade, o entendimento da função e importância das vias neurais envolvidas na interação entre essas respostas, bem como da analgesia, ainda necessita maiores esclarecimentos.

O hipotálamo, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e a amígdala são reconhecidos como importantes estruturas do sistema encefálico de defesa, mediando reações de fuga e luta, ativação autonômica e analgesia, participando diretamente das reações características de ansiedade e medo (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BEHBEHANI, 1995; BRANDÃO et al., 2003; CARRIVE et al., 1997, 2003; FANSELOW, 1991; GRAEFF et al., 1993; LANG; BRADLEY; CUTHBERT, 1998; LOVICK, 2000). Atualmente, é aceito que os colículos inferiores e superiores também possuem importante papel no sistema encefálico de defesa (BRANDÃO et al., 2003; CASTILHO; BRANDÃO, 2001; COIMBRA et al., 1996; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; LAMPREA et al., 2002; PANDOSSIO; MOLINA; BRANDÃO, 2000). Essa hipótese pode ser corroborada pelo fato de que a prévia estimulação elétrica do colículo inferior produz sensibilização de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade que se baseia na aversão natural de roedores a espaços abertos (PELLOW et al., 1985). Usando o LCE, Pandóssio e colaboradores (2000) demonstraram que a

estimulação elétrica do colículo inferior provocou redução no número de entradas e permanência nos braços abertos do aparelho. Além disso, Castilho, Avanzi e Brandão (1999) demonstraram que a estimulação do colículo inferior foi capaz de provocar antinocicepção, ratificando seu envolvimento nas reações de defesa.

Reações de fuga têm também sido descritas após a estimulação elétrica ou química do Hipotálamo Medial (HM) de ratos (LAMMERS et al., 1988; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Além disso, Bailey e DiMicco (2001) relataram um aumento da concentração plasmática de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) após a estimulação química do hipotálamo dorsomedial, sendo também neste sítio verificadas alterações cardiovasculares como aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (DE NOVELLIS et al., 1995). Com isso, propõe-se mediação hipotalâmica nas reações de defesa, neuroendócrina e autonômica exibidas frente a estímulos aversivos.

Com relação à amígdala, sabe-se que esta estrutura prosencefálica desempenha função crítica em vários componentes das respostas defensivas como congelamento, sobressalto, analgesia e mudanças na frequência cardíaca. Corroborando essa informação, lesões dos núcleos central, lateral e basolateral da amígdala resultaram na interrupção dessas respostas (ROSEN; SCHULKIN, 1998). McNaughton e Corr (2004) postularam que o estado de ansiedade seria elaborado principalmente por estruturas do chamado sistema de inibição comportamental (SIC) que abrange o sistema septo-hipocampal e amígdala, entre outras estruturas, enquanto o estado de medo envolveria estruturas mais caudais, como por exemplo, o hipotálamo medial e a matéria cinzenta periaquedutal. Dentre as

estruturas mais caudais, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), mais especificamente a sua porção dorsal (MCPd), tem sido identificada como um dos principais substratos da aversão no sistema nervoso central (GRAEFF, 2004). Além disso, muitas evidências indicam ser a MCP um componente crucial do sistema inibitório descendente da dor, uma vez que as estimulações elétrica ou química dessa área atenuam a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (FIELDS; BASBAUM, 1999). Além disso, devido a estimulação química ou elétrica da MCPd provocar vigorosas respostas somatomotoras, acompanhadas de simpatoexcitação e antinocicepção (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BEHBEHANI, 1995; LOVICK, 2000; MORGAN; WHITNEY; GOLD, 1998), relaciona-se a estimulação desta estrutura àquela evidenciada diante de situações aversivas ou ameaçadoras proximais (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

A MCP é uma estrutura que circunda o aqueduto mesencefálico e se organiza longitudinalmente ao longo do mesencéfalo, podendo ser dividida em um corte radial em 4 regiões: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (KEAY; BANDLER, 2001). A MCP recebe fibras aferentes de neurônios nociceptivos da medula espinhal e envia projeções para núcleos talâmicos que processam a dor. A subdivisão dorsal da MCP (MCPd), que inclui as regiões dorsomedial e dorsolateral, está também envolvida no processamento do medo/ansiedade (BEHBEHANI, 1995). Além disso, a MCP estabelece conexões recíprocas com a amígdala e sua lesão resulta em alterações do estado de medo e ansiedade produzidos pela estimulação elétrica ou química da amígdala. Da mesma forma, lesões na amígdala reduzem comportamentos relacionados com medo/ansiedade e

antinocicepção (BEHBEHANI, 1995). A MCP recebe também maciça quantidade de projeções do hipotálamo, que constitui uma estação polissináptica envolvida no controle das funções sensoriais e autonômicas (SAWCHENKO et al., 1996).

Deste modo, a MCP é um importante sítio de processamento de estímulos aversivos e, como consequência, está diretamente relacionada na expressão de comportamentos defensivos, na ativação autonômica e na inibição da nocicepção. Assim, o interesse pelo estudo dos mecanismos subjacentes a essas respostas pode ser visto através do emprego, dentre outras, das técnicas de estimulação elétrica e química dessa estrutura mesencefálica. Dentre os principais agentes químicos utilizados para estimular a MCP, aquele envolvendo o emprego de agonistas glutamatérgicos é uma das ferramentas mais usuais. As ações do glutamato são mediadas por receptores metabotrópicos e três subtipos de receptores ionotrópicos – AMPA (ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico), cainato e NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato – HERESCO-LEVY, 2003; HUNTLEY VICKERS; MORRISON, 1994; SEEBURG, 1993). Neste sentido, uma densa quantidade de estudos anteriores demonstrou que microinjeções intra-MCPd de glutamato e seus agonistas produzem reação de fuga (BANDLER, 1988; BANDLER; CARRIVE, 1988), enquanto a administração de antagonistas de receptores de NMDA e não NMDA atenua o comportamento defensivo em ratos submetidos ao LCE (GUIMARÃES et al., 1991; MATHEUS; GUIMARÃES, 1997).

1.3 ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO/ANSIEDADE

1.3.1 NEUROBIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DA DOR

A dor consiste em uma sensação desagradável e possui a função de alertar o organismo quanto à lesão potencial ou real de tecido(s) cutâneo e visceral. Constitui-se em um dos processos de primordial importância para a sobrevivência do indivíduo. Deste modo, a dor é uma resposta imediata a estímulos nocivos aos tecidos. Uma das suas funções básicas é ativar os circuitos neurais responsáveis pelos comportamentos de defesa dos organismos de modo a lhes preservar a vida, evitando o contato com os estímulos que lhes possam causar dano ou injúria tissular. Segundo Brandão (2004), a dor é uma experiência universal da espécie humana; todos sabem o que significa, mas devido a sua subjetividade as definições encontradas não são completamente satisfatórias. No entanto, a Associação Internacional para o Estudo da Dor descreve-a como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou de fato, ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano” (apud PRADO, 1999).

O estímulo doloroso ou nociceptivo é reconhecido por receptores sensoriais especializados, chamados de nociceptores, nocirreceptores ou receptores nociceptivos. Esses receptores são morfologicamente diferenciados e estão localizados nas terminações (periferia) das fibras nervosas, constituindo as porções terminais dos axônios de neurônios sensoriais, chamados aferentes

primários ou neurônios de primeira ordem, cujos corpos celulares se situam nos gânglios sensitivos espinhais ou no nervo trigêmeo. Eles são sensíveis a estímulos nociceptivos e a substâncias químicas endógenas liberadas, como exemplos a prostaglandina, a serotonina, a bradicinina e outras substâncias, em resposta a uma lesão ou irritação, sendo por elas ativados, transmitindo o impulso para neurônios seguintes, chamados neurônios de segunda ordem, na medula espinhal em uma região denominada corno dorsal (BRANDÃO, 2004).

Os aferentes primários são fibras sensoriais classificadas em diferentes tipos, também capazes de perceber outras sensações (tato, calor, frio, eletricidade, dor). Quanto às fibras responsáveis pela condução da informação dolorosa, temos as fibras A-delta ($A\delta$) que são mielinizadas, com diâmetro de 2-6 μm , responsáveis pela condução rápida da dor (12-30 m/s), e as fibras C, que são amielinizadas e de menor calibre (0,4-1,2 μm de diâmetro), responsáveis pela condução lenta da dor (0,5-2 m/s). A ativação da fibra $A\delta$ provoca uma sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, enquanto a ativação de fibras C promove uma sensação de queimação e sem localização precisa (LE BARS et al., 2001). Essa diferenciação pode se dever ao fato de que as fibras $A\delta$ respondem com maior frequência de disparos, promovendo mais informações discriminativas para o Sistema Nervoso Central (RAJA et al., 2006).

Segundo Millan (1999), no corno dorsal da medula, para onde os aferentes primários conduzem a informação dolorosa, ocorrem sinapses com os neurônios de segunda ordem, realizada por meio de transmissores químicos, sendo o

glutamato e a substância P os mais estudados. Ambos se ligam a seus receptores pós-sinápticos específicos, ativando os neurônios de segunda ordem.

A condução do impulso doloroso continua até atingir os centros da dor no cérebro através de vários caminhos, mas dois que estão entre os principais e mais estudados, são o trato neoespinotalâmico e o trato paleoespinotalâmico. O primeiro, filogeneticamente mais novo, é de condução rápida e cursa lateralmente no tronco encefálico enviando projeções para o tálamo ventrobasal e daí diretamente para o córtex sensorial. A sua sensação é bem localizada, não ultrapassando a duração do estímulo desencadeador. Temos como exemplo desta condução, a dor cutânea superficial. O segundo trato, filogeneticamente mais antigo, é de condução mais lenta, devido às muitas sinapses realizadas e cursa medialmente no tronco encefálico. Possui importantes conexões na substância ativadora reticular ascendente (SARA) e matéria cinzenta periaquedutal enviando projeções difusas para o tálamo, córtex e estruturas do sistema límbico, que é responsável pelo componente emocional que a dor em certas situações pode exprimir. A sensação é pobremente localizada e em geral sua duração ultrapassa a do estímulo desencadeador (MILLAN, 1999; PRADO, 1999).

Brandão (2004) enfatiza que a maior parte dos neurônios envolvidos no processamento da informação dolorosa pertence a áreas filogeneticamente antigas como as paredes mediais e caudais dos ventrículos, o tálamo, o hipotálamo e a substância ativadora reticular ascendente do tronco encefálico. Algumas dessas áreas são também dotadas de circuitos neurais responsáveis pelo alívio da dor. A participação destas áreas antigas do ponto de vista evolutivo, na recepção e condução da informação nociceptiva bem como no controle ou

inibição da dor sugere que compartilhamos esta propriedade com muitas espécies animais e que, portanto, as propriedades fisiológicas deste sistema podem ser estudadas experimentalmente em animais. Esta localização também sugere que a manutenção destes sistemas nociceptivo e analgésico no homem tenha sido decorrente de um processo evolutivo e adaptativo.

Diante destas evidências, a dor não pode simplesmente se resumir a um episódio unicamente sensorial. Flor e Turk (2006) descreveram a dor como um componente maior que uma sensação ou sintoma de alguma doença, envolvendo respostas emocionais, cognitivas e comportamentais, bem como processos de aprendizado. Além disso, Brandão (2004) descreve a dor como um fenômeno envolvendo dois componentes: um componente perceptivo-discriminativo, similar a qualquer outro processo sensorial, discriminável no tempo, espaço e quanto à intensidade, e um componente aversivo-cognitivo-motivacional (ou reacional), compreendendo uma série de comportamentos defensivos que incluem desde a retirada reflexa do membro atingido até respostas emocionais complexas do tipo fuga/luta, em geral, acompanhados de fortes sensações subjetivas de desconforto e intensa motivação para aliviar a dor.

1.3.2 ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO

Existem evidências sugestivas que o medo induzido por estímulos aversivos condicionados ou incondicionados pode também levar a inibição da resposta de dor. Bolles e Fanselow (1980) argumentaram que comportamentos defensivos e respostas nociceptivas são atividades incompatíveis, uma vez que

os cuidados dispensados à recuperação da injúria sofrida poderiam prejudicar a exibição de respostas defensivas apropriadas nos momentos de aversão, colocando em perigo o escape da situação que poderá comprometer a vida. Com efeito, uma série de estudos tem mostrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por uma variedade de estímulos externos ou ambientais, exercendo importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (FANSELOW, 1991; FARDIN; OLIVERAS; BESSON, 1984a, 1984b; Terman et al., 1984). Nessas condições, a antinocicepção poderia ser considerada como parte das reações de defesa dos animais (BOLLES; FANSELOW, 1980; CONCEIÇÃO et al., 1992; FANSELOW, 1991; SIEGFRIED; FRISCHKNECHT; NUNES-DE-SOUZA, 1990).

Nas últimas três décadas, houve substancial convergência de pesquisas objetivando a investigação dos mecanismos neurais responsáveis por inibir a transmissão da informação nociceptiva. A maioria delas destacou a participação de estruturas como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), hipotálamo, os núcleos ventro-mediais do bulbo rostral, núcleo magno da rafe, núcleo paragigantocelular, núcleo parabraquial e núcleo do trato solitário, colocando-os como pertencentes ao sistema inibitório descendente (SID), uma vez que sua estimulação resulta na inibição da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (BEHBEHANI, 1995; FIELDS; BASBAUM, 1999; MILLAN, 2002). O SID é composto por um feixe de neurônios que partem das regiões superiores passando pela MCP e pelos núcleos ventro-mediais do bulbo rostral (entre eles o núcleo magno da rafe - NMR) terminando com sinapses inibitórias no corno dorsal da medula espinhal, onde inibem ou retardam a informação ascendente da dor,

resultando em diminuição da resposta nociceptiva. Neste sentido, lesões no NMR abolem ou atenuam significativamente a analgesia mediada pela MCP (BEHBEHANI, 1995).

1.4 MODELOS ANIMAIS

O estudo das reações de defesa tem levado a um crescente interesse pelo desenvolvimento de modelos animais voltados à investigação de estados emocionais potencialmente associados a desordens psiquiátricas. Ademais, a demanda por novos modelos tem sido também motivada por diversos entraves éticos, metodológicos e econômicos decorrentes do estudo em humanos de determinados processos psicofisiológicos e psicopatológicos. Dessa forma, torna-se absolutamente clara a enorme contribuição dos testes em animais ao entendimento do funcionamento cerebral em diversos distúrbios mentais/emocionais (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Neste sentido, tem-se o Labirinto em cruz elevado (LCE), amplamente utilizado como importante ferramenta para estudar comportamentos que expressam ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1990; PELLOW et al., 1985). Além disso, o LCE pode ser utilizado como acessório ao entendimento da emocionalidade e das bases biológicas de comportamentos co-relacionados como nocicepção, aprendizado e memória, neurobiologia da adição de drogas e recaída, bem como síndrome de abstinência (CAROBREZ; BERTÓGLIO, 2005).

O LCE é um modelo animal de ansiedade e foi originalmente descrito por Pellow et al. (1985), usando ratos como sujeitos experimentais, sendo

posteriormente validado para camundongos (LISTER, 1987; STEPHENS et al., 1986). Sucintamente, o LCE padrão (LCEp) é um aparelho composto de uma plataforma elevada do solo contendo dois braços fechados com paredes laterais unidos perpendicularmente a dois braços abertos desprovidos de paredes laterais. Esse aparelho é usado para avaliar os níveis de esquiva que roedores (exemplos, ratos e camundongos) exibem diante de uma situação aversiva, caracterizada pelos braços abertos do aparelho. Nessa condição, as estruturas pertencentes ao sistema de defesa do animal são ativadas (DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993). Os níveis de ansiedade são avaliados pela esquiva aos braços abertos (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), enquanto a atividade locomotora é avaliada pela frequência absoluta de entradas nos braços fechados (PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994). O LCE tem sido amplamente utilizado para avaliar o potencial ansiolítico ou ansiogênico de vários compostos farmacológicos e como auxílio para entender os mecanismos subjacentes aos comportamentos relacionados à ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994).

Estudos anteriores demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE provoca reações comportamentais características da resposta de medo e antinocicepção, avaliada pelo teste da retirada da cauda (do inglês: "tail flick test") (LEE; RODGERS, 1990). Em estudos posteriores, esses autores demonstraram que a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE é sensível a ansiolíticos clássicos como o diazepam e a buspirona (LEE; RODGERS, 1991; RODGERS;

LEE; SHEPHERD, 1992) e não responde ao tratamento sistêmico com naltrexona (LEE; RODGERS, 1990), um antagonista opióide.

Os mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade têm sido alvo de muitas investigações, levando para tal fim o emprego de modelos animais originalmente desenvolvidos para o estudo desses estados emocionais. Neste sentido, alguns investigadores passaram a usar o labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliar se o estado emocional desencadeado pela experiência no aparelho também altera a nocicepção (CONCEIÇÃO et al., 1992; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009; LEE; RODGERS, 1990; MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005, 2009; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; TAUKULIS; GOGGIN, 1990).

A interação entre medo/ansiedade e antinocicepção é estudada também em nosso laboratório e recentes resultados mostraram que a exposição de camundongos aos LCE padrão, fechado (semelhante ao padrão, porém com todos os braços protegidos por paredes) ou aberto (também semelhante ao LCE padrão, porém com todos os braços sem paredes) resulta em diferentes graus das respostas nociceptivas. Enquanto a exposição ao LCE padrão não altera consistentemente a resposta nociceptiva, a exposição ao LCE aberto resulta em antinocicepção de alta magnitude (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005). Tais resultados sugerem que a situação de conflito gerada pela exposição ao LCE padrão não é suficiente para ativar mecanismos inibitórios da dor. Entretanto, quando expostos a uma situação de perigo iminente e inescapável, como o LCE aberto, a antinocicepção é evidenciada.

1.5 NEUROTRANSMISSÃO: GLUTAMATO, ÓXIDO NÍTRICO (NO) E FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINA (CRF)

Como descrito anteriormente, estudos prévios envolvendo a neurotransmissão glutamatérgica com ansiedade e comportamentos de defesa demonstraram que microinjeções de agonistas de glutamato na MCPd são eficazes em produzir reações comportamentais de defesa bem como aumento da expressão de proteína Fos, um marcador funcional da atividade neuronal (BANDLER, 1988; BANDLER; CARRIVE, 1988; FERREIRA-NETTO; BORELLI; BRANDÃO, 2005), enquanto antagonistas de receptores NMDA e não NMDA exercem efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE (GUIMARÃES et al., 1991; HALL; BEHBEHANI, 1998; MATHEUS; GUIMARÃES, 1997; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2002).

Existem evidências sugestivas de que a ação ansiogênica dos aminoácidos excitatórios (AAEs – dentre os quais, o principal é o glutamato) está relacionada com a síntese de óxido nítrico (NO), possivelmente induzida quando receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988), mas também AMPA, Cainato e metabotrópicos (OKADA, 1992; SOUTHAM; EAST; GARTHWAITE, 1991; WOOD et al., 1990), são ativados. Estas evidências são corroboradas por estudos demonstrando que a administração sistêmica de L-NAME (FARIA et al., 1997) ou intra-MCP, de L-NAME (N ω -nitro-L-arginina-metil-éster) e L-NOARG (N ω -nitro-L-arginina), inibidores não seletivos da óxido nítrico sintase (NOS), enzima de síntese do NO,

presente na MCP (ONSTOTT; MAYER; BEITZ, 1993; VINCENT; KIMURA, 1992), atenua a ansiedade avaliada no LCE em ratos (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 1997, 2001; GUIMARÃES et al., 1994). Além disso, Miguel e Nunes-de-Souza (2006) observaram que os efeitos comportamentais como saltos, corrida e imobilidade, bem como antinociceptivo provocados pela injeção intra-MCP de NMDA (agonista de receptores de mesmo nome; dose 0,04 nmol/0,1 µl) foram completamente bloqueados pela injeção do inibidor específico da enzima NOSn, o NPLA (N^{ω} -propil-L-arginina), no mesmo sítio.

Ainda neste sentido, Guimarães e colaboradores (2005) demonstraram que a microinjeção intra-MCPd de um sequestrador de NO, o 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido (Carboxi-PTIO), atenua a ansiedade em ratos expostos ao LCE. Por outro lado, reforçando ainda mais o envolvimento do NO com as ações glutamatérgicas, foi observado que microinjeções de doadores de NO na MCP dorsal, como o cloreto de 3-morfolinossilnomina (SIN-1) e dietilamina do óxido nítrico (DEA/NO), provocam reações de fuga em ratos (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000b). Ainda neste contexto, injeções de AP-7 e NBQX, antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA/Cainato, respectivamente, inibiram a resposta de fuga eliciada pelo SIN-1 na MCPd (MOREIRA et al., 2004).

Tomadas em conjunto, tais evidências são sugestivas de que o NO pode interferir na modulação de respostas defensivas na MCPd, sendo possível que esteja envolvido na modulação do medo/ansiedade desencadeado pela ativação de receptores NMDA na MCP.

O óxido nítrico é um gás inorgânico incolor, radical livre de vida curta, representado pela fórmula NO (nitrogênio e oxigênio), que possui um elétron desemparelhado em sua órbita externa, o que o torna quimicamente reativo, tendendo a reagir com outras moléculas (GUIX et al., 2005). Bastante presente no organismo, é considerado um neurotransmissor atípico por suas características físico-químicas particulares (GALLY et al., 1990). Sendo altamente difusível, atravessa membranas biológicas facilmente e não é armazenado em vesículas sendo produzido quando necessário e rapidamente degradado, devido a sua meia-vida curta de poucos segundos.

O NO é produzido sob ação de uma enzima, a NOS, através de uma reação entre o oxigênio molecular e L-arginina (desaminação oxidativa de seu grupo guanidina), tendo como co-fator a molécula de fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH - LOHSE; FORSTERMANN; SCHMIDT, 1998; MAYER et al., 1991), produzindo, além de NO, uma molécula de L-citrulina (bastante utilizada como método indireto de investigação da produção de NO). O NO é rapidamente degradado podendo ser oxidado a íon nitroso (NO^+) ou reduzido a íon nitróxido (NO^- - DAWSON; DAWSON, 1996a; 1996b). Além disso, pode se ligar a biomoléculas circulantes como tióis, resíduos de cisteína, ânions superóxido e hemoglobina (YUN; DAWSON; DAWSON, 1997). O NO forma complexos com ânions para formar peroxinitritos (ONOO^-), que se decompõem em outros radicais livres como íons hidróxido e NO_2 . Esses radicais livres parecem participar da morte neuronal decorrente de processos isquêmicos e estresse oxidativo (RADI et al., 1991).

O NO está presente em vários tipos de células como neurônios, células endoteliais dos vasos e macrófagos. Existem três isoformas (isômeros) da NOS: a NOS I ou NOS_n, presente nos neurônios, a NOS II ou NOS_i, induzida, alguns a chamam de imunológica, presente nos macrófagos, neutrófilos e outras células que atuam na resposta a estímulos patológicos (defesa do organismo) e a NOS III ou NOS_e, presente nas células endoteliais. As isoformas I e III são do tipo constitutiva e dependem da presença de cálcio intracelular (cálcio + calmodulina – MUNGRUE et al., 2003). A atuação de agonistas NMDA é pontuada como um estímulo importante para a ativação deste tipo de enzima, sobretudo a NOS_n, devido ao influxo de cálcio que proporciona, enquanto o NO produzido pelas células endoteliais participa do processo de relaxamento dos vasos, diminuição da pressão arterial e inibe a adesão e agregação plaquetárias. A isoforma II é, como o próprio nome diz, induzida e o cálcio neste momento não é tão importante como para as outras isoformas (EBADI; SHARMA, 2003). Esta enzima é ativada perante estímulos patogênicos como invasão microbiana, onde há presença de lipopolissacarídeos e liberação de citocinas, entre elas, o fator de necrose tumoral, interleucina 1 e interferon γ (FORSTERMANN et al., 1995; IADECOLA et al., 1995; MAYER; ANDREW, 1998; STUEHR; GRIFFITH, 1992). Estudos como o de Elfering e colaboradores (2002), demonstraram a existência de uma NOS mitocondrial, presente no interior dessa organela, porém pouco é conhecido sobre suas funções.

As três principais isoformas apresentam os mesmos domínios catalíticos, sendo um domínio oxigenase N-terminal e outro redutase C-terminal. No domínio

oxigenase estão localizados os sítios de ligação para o grupamento heme, para a BH_4 e para a L-arginina, enquanto no domínio redutase estão os sítios de ligação para o dinucleotídeo adenina flavina (FAD), mononucleotídeo flavina (FMN) e para o NADPH (STUEHR, 1999). O domínio oxigenase fica ligado ao redutase por um sítio de reconhecimento para Ca^{++} - calmodulina (GHOSH; STUEHR, 1995; LI; POULOS, 2005; MCMILLAN; MASTERS, 1995; RICHARDS; MARLETTA, 1994). A ligação do complexo cálcio-calmodulina a NOS é essencial para que ocorra a ativação da enzima abrindo um canal para a transferência de elétrons do domínio redutase para o oxigenase, ativando esse domínio onde está ligada a L-arginina (ABU-SOUD; STUEHR, 1993; GUIX et al., 2005). Por isso, o cálcio é necessário para essa transformação, com exceção das isoenzimas NOSi onde o complexo permanece ligado à enzima mesmo sob concentrações muito baixas do íon cálcio (CHO et al., 1992; SALERNO et al., 1997).

Pelo fato de o NO não ser armazenado, liberado e inativado pelos mecanismos sinápticos convencionais, sua regulação ocorre basicamente pela sua biossíntese. Entre muitos, o mais importante regulador da atividade da NOSn é o cálcio intracelular livre, que, em concentração suficiente, forma o complexo Ca^{++} -calmodulina, necessário para atividade da enzima (KNOWLES et al., 1989; SHENG et al., 1992). Outra regulação da NOSn é realizada através da PKA (proteína quinase dependente de AMPc) que diminui sua atividade (BREDT; FERRIS; SNYDER, 1992; BRUÑE; LAPETINA, 1991; NAKANE et al., 1991).

O NO pode atuar de diferentes modos, mas o principal, é a sua propriedade de ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que, por sua vez, catalisa a

conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), formando o complexo NO/GMPc. A ligação do NO ao grupo heme dessa enzima provoca uma alteração conformacional que aumenta em até 200 vezes a taxa catalítica de conversão do GTP em GMPc (FRIEBE; KOESLING, 2003). Esse aumento de GMPc induzido pelo NO pode desencadear uma série de reações intracelulares como alteração direta da permeabilidade de canais iônicos sensíveis ao GMPc (KAUPP, 1991; NAKAMURA; GOLD, 1987), modificar a atividade de fosfodiesterases (PDE) dependentes de GMPc, seja estimulando-a (família II, PDE estimulada por GMPc) ou inibindo-a (família III, PDE inibida por GMPc e família IV, PDE ligada ao GMPc), dependendo da família da PDE (CHARBONNEAU, 1990), ou ainda ativar proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG - FRIEBE; KOESLING, 2003; KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004; SCHMIDT; LOHMANN; WALTER, 1992; SCHUMAN et al., 1994).

Embora seja a principal, as ações do NO não são exclusivamente mediadas pelo aumento intracelular de GMPc. O NO pode ainda reagir com grupamentos tióis livres de resíduos de cisteína, através de um processo chamado S-nitrosilação que leva a formação de nitrosotióis, mais estáveis com meia-vida de alguns minutos (JAFFREY et al., 2001). Além disso, a degradação do NO gerando peroxinitrito (ONOO^-) altamente reativo, pode levar a prejuízo de funções protéicas.

Além das evidências acima que apontam para o envolvimento da transmissão glutamatérgica sobre a liberação de NO, outros estudos indicam ser o NO um mensageiro retrógrado (difunde-se da célula pós-sináptica para a pré-

sináptica) que provoca retro-alimentação positiva na liberação de glutamato, através de um mecanismo GMPc dependente (NOWICKY; BINDMAN, 1993). Além de sua ação sobre o glutamato, o NO parece estar também envolvido direta ou indiretamente na liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (ácido gama-amino-butírico), acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina, neuropeptídeos, histamina e purinas. Porém, seu papel em muitos casos é dual e depende de sua concentração (PRAST; PHILIPPU, 2001).

Sendo assim, o NO pode modificar uma variedade de funções encefálicas, tais como a regulação da excitabilidade neuronal e dos disparos, da plasticidade sináptica, LTP ou LTD (potenciação ou depressão de longo prazo), neurotoxicidade (excitotoxicidade), neuroproteção, liberação de hormônios (PRAST; PHILIPPU, 2001), ansiedade e comportamento defensivo (GUIMARÃES et al., 2005), entre outros.

Com base nas respostas provocadas pela estimulação glutamatérgica da MCP (reações de defesa e antinocicepção), pode-se constatar um papel ansiogênico para esse neurotransmissor. A hipótese de que o NO esteja envolvido na modulação dessas respostas tem levado ao desenvolvimento de investigações buscando entender seu papel na neurobiologia de transtornos emocionais, tais como os de ansiedade. Considerando-se essa relação intrínseca entre a transmissão glutamatérgica e a síntese de NO, somado ao fato da presença de neurônios positivos para a enzima NOS na coluna dorsolateral da MCP (ONSTOTT et al., 1993), torna-se relevante a investigação de um possível papel

do NO na modulação das respostas defensivas, incluindo-se a antinocicepção, nesta região.

Além do glutamato, outro composto, o fator de liberação de corticotrofina (CRF – do inglês “corticotropin-releasing factor”), tem despertado interesse em diversos grupos de pesquisa devido ao seu comprovado envolvimento na excitabilidade neuronal. O CRF é um peptídeo com 41 aminoácidos produzido no hipotálamo, sendo inicialmente conhecido por sua função na via ou eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenais), estimulando a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (pituitária). O ACTH, por sua vez, estimula a produção de glicocorticóides no córtex das adrenais. No entanto, estudos anatômicos utilizando anticorpos para CRF identificaram vários sítios no encéfalo de ratos que contêm altas densidades de neurônios CRFérgicos, incluindo núcleos amigdalóides, hipocampo, núcleo dorsal da rafe, *locus coeruleus* (LC) e MCP (MERCHENTHALER, 1984; SWANSON et al., 1983). Tais evidências foram corroboradas por Van Pett e colegas (2000), que identificaram presença de RNA-m codificadores para receptores CRF nestas regiões, que incluem áreas envolvidas no processamento do medo, ansiedade e de informações nociceptivas, caracterizando a importância do desenvolvimento de pesquisas sobre o papel do CRF na antinocicepção induzida por situações ameaçadoras e aversivas.

Com a descoberta de neurônios CRFérgicos extra-hipotalâmicos, as investigações não mais se restringiram à sua função endócrina, ultrapassando as fronteiras das regiões hipotalâmicas. Neste sentido, além do seu papel endócrino, o CRF comporta-se como um regulador parácrino ou neurotransmissor,

modulando respostas comportamentais defensivas frente a estímulos aversivos de modo aparentemente independente da ativação do eixo HPA, pois tais respostas são insensíveis a hipofisectomia e ao tratamento com dexametasona (BERRIDGE; DUNN, 1989; BRITTON et al., 1986).

O envolvimento do CRF sobre a ansiedade tem sido também enfatizado em estudos que demonstraram efeitos ansiogênicos após injeções intracerebroventricular (i.c.v.) e intra-MCP desse peptídeo em ratos expostos ao LCE (BALDWIN et al., 1991; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997). O papel do CRF na modulação da ansiedade foi também verificado em camundongos transgênicos que apresentam produção excessiva de CRF (STENZEL-POORE, 1994; VAN GAALEN et al., 2002). Esses camundongos são modificados geneticamente, servindo como modelos animais para o estudo dos efeitos crônicos da hiperprodução de CRF e seus produtos. Tais animais exibem anormalidades endócrinas e permanecem menos tempo nos braços abertos do LCE, quando comparados aos animais do grupo controle, além de exibir comportamento pró-ansiedade em outros modelos.

Em recente colaboração com os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard, da Universidade do Havaí, Carvalho-Netto e colegas (2007) avaliaram os efeitos da microinjeção intra-MCPd de oCRF (CRF de ovinos) em camundongos expostos ao modelo presa-predador (RET, do inglês: "Rat Exposure Test"). Nessa condição, infusões de oCRF intensificaram a exibição de comportamentos de defesa em camundongos, sugerindo um papel ansiogênico desse peptídeo na MCP. Nesta mesma linha, a injeção intra-MCPd de CRF-alfa-

helical, um antagonista de receptores CRF, foi capaz de reverter o efeito ansiogênico provocado por injeções locais de CRF em ratos expostos ao LCE, além de também reverter o efeito ansiogênico em ratos previamente estressados (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997, 2000). Além disso, outras evidências sugestivas da participação do CRF nessa estrutura mesencefálica na modulação de respostas emocionais são encontradas em estudos mostrando que a MCP recebe aferentes de neurônios CRFérgicos oriundos de áreas límbicas incluindo amígdala, córtex pré-frontal e regiões hipotalâmicas (SHIPLEY et al., 1991). Ademais, todas as colunas da MCP contêm neurônios CRFérgicos e receptores para o CRF de ambos os subtipos (STECKLER; HOLSBOER, 1999; TIMPL et al., 1998).

Existem evidências de que os receptores para o CRF são acoplados à proteína Gs (estimulatória), ou seja, aquela que estimula a via do AMPc-PKA, sendo subdivididos em dois subtipos, o CRF1 (CHANG et al., 1993; CHEN et al., 1993; VITA et al., 1993) e o CRF2 (LOVENBERG et al., 1995; PERRIN et al., 1995). Camundongos nocaute para receptores CRF1 demonstraram redução da ansiedade, sugerindo sua participação na modulação desse estado emocional (SMITH et al., 1998; TIMPL et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que as ações excitatórias mediadas pela estimulação dos receptores CRF1 são bloqueadas por seus antagonistas (BARAM et al., 1997). Bowers, Swisher e Behbehani (2003) mostraram que a aplicação de CRF na MCP de ratos produziu aumento significativo na taxa de disparos espontâneos das células estudadas. Esse aumento na excitabilidade celular foi também observado em outras regiões. Quanto ao subtipo CRF2, seu papel nos comportamentos eliciados pelo medo/

ansiedade não está claro, existindo trabalhos contraditórios quanto a sua participação (BALE et al., 2000; KISHIMOTO et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001).

O efeito excitatório produzido pelo CRF tem sido associado com a despolarização da membrana, porém os mecanismos de sua ação sobre a excitabilidade celular e sobre a ansiedade ainda não estão elucidados. Tem sido sugerido que as ações do CRF estariam associadas com o aumento da permeabilidade celular aos íons Na^+ e Ca^{++} (BOWERS; SWISHER; BEHBEHANI, 2003). Este estudo demonstrou que microinjeções de CRF na MCP aumentavam significativamente a frequência tanto de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) quanto de potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS), o que faz do efeito excitatório do CRF, um fenômeno generalizado e não específico para determinado tipo de neurônio na MCP. Devido a esses efeitos, postulou-se que o CRF poderia estar aumentando a liberação de óxido nítrico, cuja ação de aumentar a liberação de transmissores como o GABA (inibitório) e o glutamato (excitatório) na MCP é conhecida (HALL; BEHBEHANI, 1998). Assim, um mecanismo de ação possível para o CRF estaria relacionado ao aumento da concentração intracelular de cálcio mediado pelo AMPc/PKA e posterior abertura de canais de cálcio, causando excitabilidade celular e ativação da NOSn, resultando na produção e liberação de óxido nítrico que por sua vez agiria na liberação de vários transmissores dentro da MCP. Desta forma, os efeitos inibitórios e excitatórios observados com infusões intra-MCP de CRF seriam explicados pelo aumento da liberação de GABA e glutamato, respectivamente, na própria MCP (HALL; BEHBEHANI, 1998).

Como apresentado anteriormente, a MCP contém neurônios e receptores CRFérgicos (CRF1 e CRF2) e evidências têm associado à ação desse peptídeo alguns comportamentos defensivos. Evidências mostrando que injeções i.c.v. de CRF provocam antinocicepção são também encontradas na literatura (LARIVIERE; MELZACK, 2000). Considerando que a MCP é uma estrutura crucial do sistema inibitório descendente, conforme descrito anteriormente, parece-nos relevante estudar o papel do CRF na MCP na antinocicepção induzida por situações ameaçadoras. Além disso, é importante investigar se os efeitos do CRF sobre as reações comportamentais defensivas e sobre a nocicepção envolvem a participação do óxido nítrico.

Assim, o presente trabalho mostra os experimentos realizados com objetivo de entender melhor o funcionamento das vias excitatórias glutamatérgicas e CRFérgicas na MCP bem como a mediação nitrérgica na ação desses neurotransmissores no que diz respeito à modulação dos comportamentos defensivos e na neurobiologia dos transtornos de ansiedade.

Além disso, outro componente relacionado à ansiedade e ao estresse é o comportamento agressivo. Neste sentido, tais comportamentos são importantes ferramentas no estudo da neurobiologia das reações de defesa, uma vez que parece existir relação na gênese de suas respostas. Agressão e ansiedade são estados emocionais que estão associados com uma série de desordens psiquiátricas, e estudos farmacológicos e comportamentais têm sugerido uma relação entre essas emoções em modelos animais (FERRARI et al., 1998; MICZEK, 1974; MICZEK et al., 1995). Entretanto, esta relação entre ansiedade e

agressão ainda não é bem entendida, de modo que existem trabalhos com resultados contrastantes e inconsistentes. Assim, são necessários novos estudos que abordem os aspectos neurobiológicos subjacentes à interação ansiedade x agressão.

Outra associação que merece atenção quanto ao provável compartilhamento de mecanismos é aumento da susceptibilidade e vulnerabilidade ao uso ou à recaída ao uso de drogas como consequência de estados ansiosos duradouros como, por exemplo, aqueles desencadeados pela exposição a diferentes tipos de estresse (PELLOUX; COSTENTIN; DUTERTE-BOUCHER, 2009). Frente a uma situação de estresse, o organismo emite respostas resultantes de mudanças neurais, endócrinas, autonômicas e imunológicas para se adaptar àquela situação (SELYE; 1936 apud MICZEK; CONVINGTON; YAP, 2008). Tais mudanças podem influenciar e modificar a resposta do organismo às substâncias psicoativas de abuso (MICZEK; CONVINGTON; YAP, 2008), levando a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da dependência. Assim, pelo demonstrado em estudos anteriores (GAWIN, 1991; KOOB; SANNA; BLOOM, 1998; PELLOUX; COSTENTIN; DUTERTE-BOUCHER, 2009; RESNICK; RESNICK, 1984), a interação ansiedade x uso e dependência de drogas parece ser estreita, tanto no que diz respeito à busca da droga como numa eventual recaída ao uso.

Esses temas são de fundamental importância em neurociência e necessitam maiores esclarecimentos, tornando-se, portanto, objeto de estudo e motivo da realização do estágio no Departamento de Psicofarmacologia da Tufts

University, Medford, Massachusetts, EUA, sob a supervisão do Professor Klaus Miczek.

Assim, os experimentos descritos na presente tese foram delineados para investigar o papel dos receptores CRFérgicos em processos psicobiológicos subjacentes à ansiedade bem como sua interação com a nocicepção, agressão e dependência. Além disso, como apontado acima, a hipótese do envolvimento de mecanismos mediados pelo complexo NMDA-NO-GMPc nos efeitos ansiogênicos e antinociceptivos desencadeados pela ativação de receptores CRFérgicos na matéria cinzenta periaquedutal constitui-se também tema da presente tese.

Desta forma, além dos aspectos introdutórios apontados neste capítulo (Capítulo 1), esta tese foi organizada em outros sete capítulos. O Capítulo 2 descreve o papel do óxido nítrico (via inibição de sua síntese) nos efeitos ansiogênicos provocados pela injeção intra-MCP de NMDA. O Capítulo 3 mostra o envolvimento de receptores CRF do tipo 1 e 2 e do óxido nítrico nos efeitos ansiogênico e antinociceptivo provocados pela injeção intra-MCP de CRF. Os efeitos aversivo e antinociceptivo desencadeados pela microinjeção intra-MCP de doador de óxido nítrico (NOC-9) são descritos no Capítulo 4, que também aborda o papel dos receptores CRFérgicos 1 da MCP nestas respostas. Os resultados dos experimentos conduzidos no departamento de Psicofarmacologia, da Tufts University, Medford, Massachusetts, são descritos nos Capítulos 5 e 6. O Capítulo 5 mostra os efeitos da injeção do agonista e do antagonista de receptores de CRF em outra estrutura intimamente ligada ao sistema encefálico de defesa, o núcleo dorsal da rafe, no comportamento agressivo ofensivo em camundongos. Já o

Capítulo 6 contém os resultados do bloqueio de receptores CRFérgicos tipo 1 sobre a sensibilização comportamental provocada pela cocaína e na auto-administração deste psicoestimulante em ratos submetidos ao estresse de derrota social. Uma discussão geral dos principais achados do presente estudo é mostrada no Capítulo 7, que também aponta as conclusões da tese. Por fim, o capítulo 8 corresponde às referências bibliográficas desta tese.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-MCP DE NMDA NA ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS NO LCE: AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO NITRÉRGICA

Recentemente, Miguel e Nunes-de-Souza (2006) demonstraram que o efeito pró-aversivo provocado pela injeção de NMDA na MCP de camundongos foi prevenido pelo tratamento com o NPLA, inibidor da NOSn (Introdução da tese). Entretanto, injeções de diferentes doses de NPLA na MCP desses animais não foram capazes, por si só, de alterar a ansiedade avaliada no LCE (MIGUEL, 2006). Tais resultados sugerem que a ansiedade avaliada durante o LCE possa não depender da síntese de NO na MCP. No entanto, faz-se necessário conhecer se os efeitos aversivos do aumento do “tônus” glutamatérgico nos receptores NMDA na MCP estariam envolvidos também com os comportamentos eliciados no LCE, além daqueles relacionados a respostas intempestivas descritas anteriormente (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Além disso, torna-se interessante investigar se esta resposta (no LCE), a exemplo daquelas intempestivas, também está relacionada com a síntese de NO, ou se realmente os comportamentos eliciados pela exposição ao LCE são independentes de sua síntese, uma vez que o tratamento com o NPLA em diferentes doses não alterou os índices de ansiedade no LCE.

Assim, serão apresentados neste capítulo os experimentos realizados para investigar o efeito da microinjeção intra-MCP de NMDA na ansiedade de camundongos expostos ao LCE. Diferente do estudo de Miguel e Nunes-de-Souza (2006), em que a dose de NMDA (0,04 nmol/0,1 µL) provocou comportamentos defensivos explosivos, foi utilizada uma dose mais baixa de NMDA (0,02 nmol/0,1

μL) para a experimentação. Além disso, para investigar se os efeitos ansiogênicos do NMDA dependem da síntese de NO, os camundongos foram pré-tratados com NPLA no mesmo sítio.

2.1 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo estudar o papel do receptor NMDA na MCP sobre a ansiedade avaliada no LCE bem como verificar a participação da mediação nitrérgica neste efeito.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Sujeitos

Camundongos Suíços albinos machos (25-35g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP, mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00) e livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste.

2.2.2 Cirurgia e administração de drogas na MCP

Camundongos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para receber implante intracraniano de cânula guia (26 gauge - aço inoxidável) de 7,0 mm de comprimento, após anestesia com a associação de anestésico + relaxante

muscular, Cetamina + Xilazina (80 e 8 mg/Kg respectivamente). A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico e as coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula guia objetivando atingir a MCP do animal foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). As coordenadas foram: 4,1 mm posterior e 1,4 mm lateral (unilateral, sempre lado direito por padronização) ao bregma (encontro das suturas) e 2,2 mm ventral à superfície do crânio, com a cânula inclinada em um ângulo de 26°. A ponta da cânula guia foi posicionada + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções na MCP foi feita através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia, conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma micro-seringa (marca Hamilton). Uma bomba de infusão foi programada para injetar um volume total de 0,1 µL em um período de 30 segundos. Após a microinjeção, a agulha de injeção permanecia por mais 30 segundos no interior da cânula guia para garantir escoamento e infusão e durante todo o procedimento de injeção o animal foi contido manualmente pelo experimentador com uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmava o fluxo da solução.

2.2.3 Fármacos

Foram utilizados: NMDA (0,02 nmol/0,1 µL) em uma dose ineficaz em produzir reações de defesas explosivas como saltos e corrida; NPLA na dose 0,4 nmol/0,1 µL (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006).

2.2.4 Avaliação dos Comportamentos de Defesa

A avaliação dos efeitos farmacológicos sobre as reações de defesa foi investigada através da análise dos índices de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado.

2.2.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado padrão (LCEp) é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de vidro transparente, com assoalho de madeira/fórmica e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. Os comportamentos analisados envolveram as medidas convencionais, tais como, frequência de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Esses dados são usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos que correspondem aos índices clássicos de ansiedade (Entradas: $[\text{aberto} / \text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento} / 300] \times 100$). A atividade locomotora é avaliada pela frequência absoluta de entradas nos braços fechados.

2.2.5 Histologia

Após o término dos experimentos todos os animais foram submetidos à injeção central de uma solução de 1% de azul de Evans (procedimento semelhante ao descrito anteriormente para injeção das drogas em estudo). Após sacrificar os animais em câmara de CO₂, estes foram decapitados, seus encéfalos removidos e reservados em recipientes contendo solução de formalina (10%) tendo posteriormente sofrido seções coronais ao longo do trajeto da cânula com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850). As seções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DM LB) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicava o local da injeção.

2.2.6 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene e, quando necessário, transformados em raiz quadrada, raiz cúbica ou LOG ($n + 1$) na base 10. Na sequência, os resultados foram submetidos ao teste t de Student (comparação salina x NMDA, experimento 2.A) ou à análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes (fator 1: pré-tratamento na MCP; fator 2: tratamento na MCP, melhor detalhado posteriormente, experimento 2.B). Finalmente, os dados foram submetidos à análise post hoc de Duncan. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

2.2.7 Delineamento Experimental

2.2.7.1 Experimento 2.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NMDA na MCP sobre a ansiedade

Este experimento foi realizado para avaliar a ação do NMDA. Embora seja conhecida a ação pró-aversiva do NMDA na MCP (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006) foi necessário pesquisar primeiramente se doses baixas deste composto apresentariam efeito ansiogênico para posteriormente avaliar sua putativa sensibilidade ao inibidor da síntese de NO.

Assim, os animais receberam microinjeção intra-MCP de NMDA (0 ou 0,02 nmol/0,1 µL) e, após 8 minutos, foram individualmente expostos ao LCE para o registro dos índices de ansiedade e da atividade locomotora por cinco minutos (para detalhes, ver item 2.3.4.1) .

2.2.7.2 Experimento 2.B: Efeito do pré-tratamento com NPLA sobre a ação ansiogênica do NMDA na MCP.

Camundongos receberam uma primeira microinjeção intra-MCP de NPLA (pré-tratamento; 0 ou 0,4 nmol/0,1 µL) e, após dez minutos, foram tratados com uma microinjeção de NMDA (0 ou 0,02 nmol/0,1 µL) no mesmo sítio. Oito minutos após, cada camundongo foi exposto ao LCE para o registro dos índices de ansiedade e da atividade locomotora por cinco minutos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Sítio de injeção

A Figura 1 exemplifica um corte histológico demonstrando a matéria cinzenta periaquedutal, alvo dos experimentos realizados neste trabalho (exceção aos experimentos do capítulo 5 e 6). Abaixo a representação esquemática e uma fotomicrografia de um ponto de infusão para melhor visualização e localização da estrutura. A seção corresponde a -4,24 mm a partir do bregma, de acordo com o Atlas para encéfalo de camundongos de Paxinos e Franklin (2001).

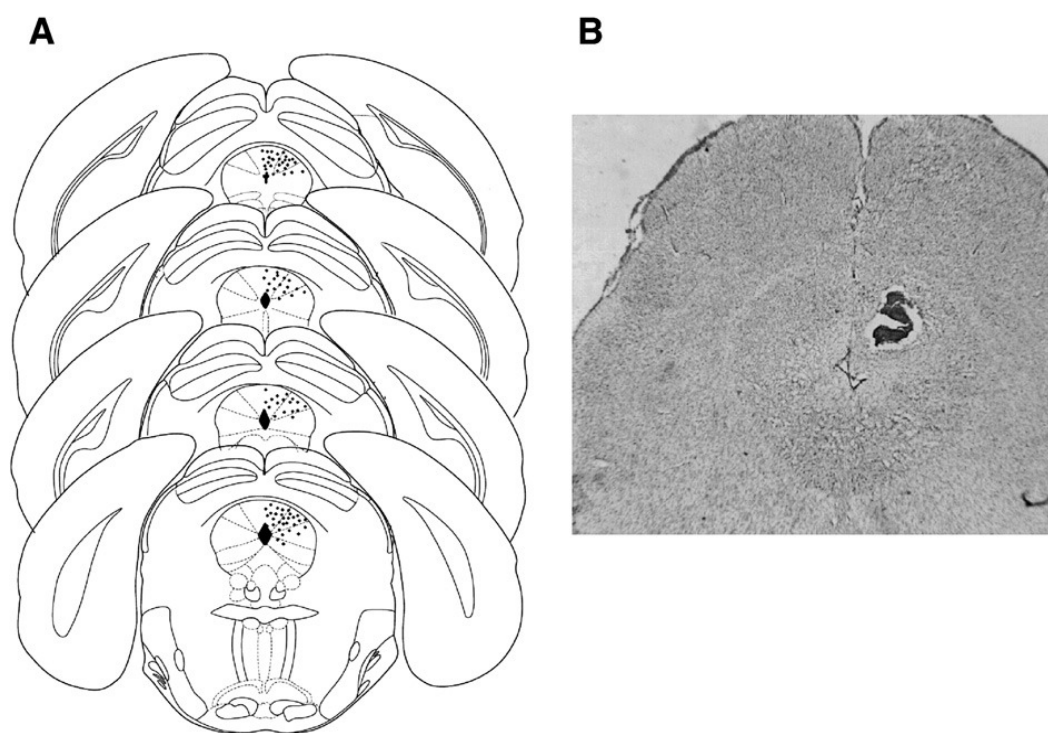


Figura 1 - (A) Representação esquemática dos pontos equivalentes a microinfusão dentro da MCP observados na análise histológica. O número de pontos não equivale ao total de animais devido à sobreposição de pontos de injeção. (B) Fotomicrografia de um corte coronal do mesencéfalo de sujeito representativo demonstrando a localização de um ponto de injeção dentro da MCP.

2.3.2. Experimento 2.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NMDA na MCP sobre a ansiedade

A Figura 2 mostra os índices de ansiedade avaliados em animais submetidos ao LCE padrão após receberem injeção intra-MCP de NMDA (0,02 nmol/0,1 μ L) ou salina. Pode-se observar que a microinjeção de NMDA provocou diminuição na % de entradas (Teste $t(29) = 2,16$, $p < 0,05$) bem como na % de tempo gasto (Teste $t(29) = 3,00$, $p < 0,05$) nos braços abertos do LCE, sem contudo alterar a frequência de entradas nos braços fechados (Teste $t(29) = -0,59$, $p > 0,05$), caracterizando o efeito ansiogênico do NMDA na MCP.

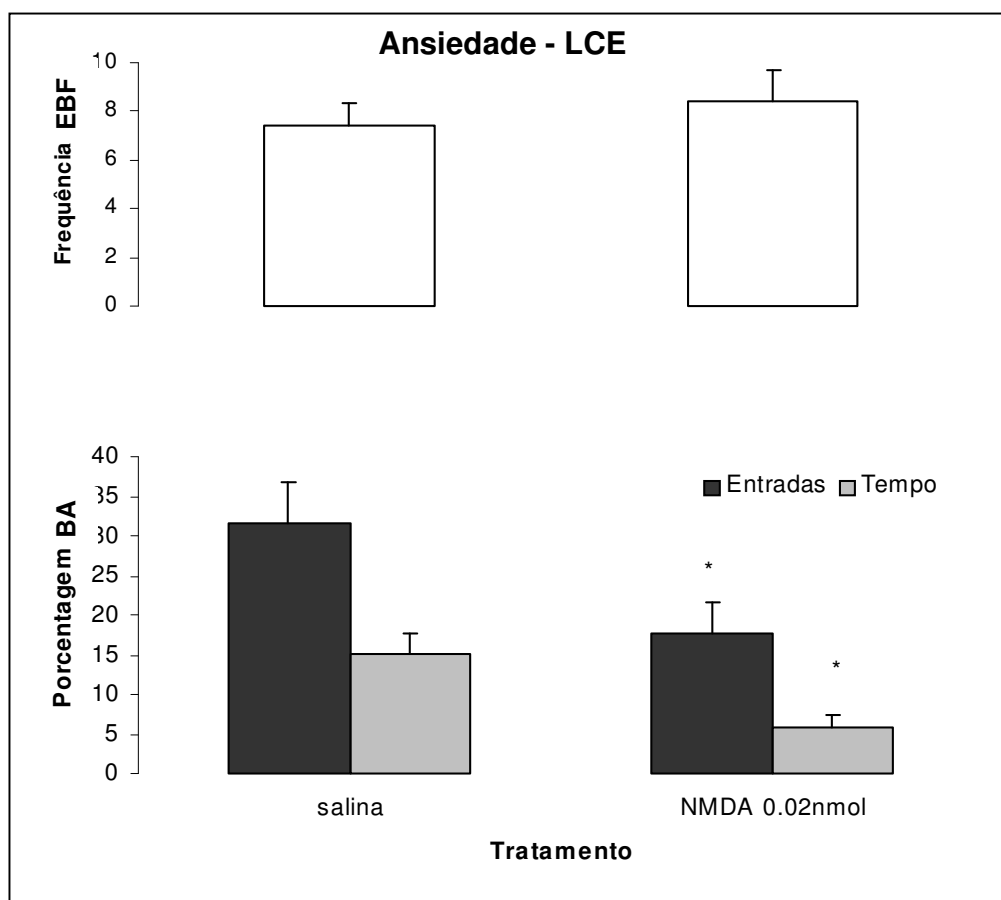


Figura 2 - Efeitos da microinjeção de NMDA (0,02 nmol/0,1 μ L) ou salina na MCP de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCEp. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 15 ou 16 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

2.3.3 Experimento 2.B: Efeito do pré-tratamento com NPLA sobre a ação ansiogênica do NMDA na MCP.

A Figura 3 mostra os índices de ansiedade avaliados em animais submetidos ao LCE padrão após receberem injeções combinadas intra-MCP de Salina + Salina, Salina + NMDA, NPLA + Salina ou NPLA + NMDA. A análise

estatística revelou diferenças entre os grupos no que diz respeito à porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE (Fator pré-tratamento: $F_{1,27} = 0,38$; $p > 0,05$; Fator tratamento: $F_{1,27} = 5,18$; $p < 0,05$; Interação entre pré-tratamento x tratamento: $F_{1,27} = 4,51$; $p < 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) mostraram que o grupo tratado com NMDA apresentou diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparado com salina (Salina + NMDA vs Salina + Salina; $p < 0,05$), confirmando o efeito ansiogênico demonstrado no item 4.2. O pré-tratamento com NPLA produziu efeitos próximos da significância ($p = 0,06$) em bloquear a ação ansiogênica do NMDA (NPLA + NMDA vs Salina + NMDA; $p = 0,06$) e não alterou significativamente os níveis basais de ansiedade quando comparado com o grupo controle (NPLA + Salina vs Salina + Salina; $p > 0,05$).

Efeitos semelhantes foram observados com relação à porcentagem de tempo nos braços abertos. A ANOVA revelou diferenças entre os grupos (Fator pré-tratamento: $F_{1,27} = 0,54$; $p > 0,05$; Fator tratamento: $F_{1,27} = 7,08$; $p < 0,05$; Interação entre pré-tratamento x tratamento: $F_{1,27} = 5,01$; $p < 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) mostraram que o grupo tratado com NMDA apresentou diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos (Salina + NMDA vs Salina + Salina; $p < 0,05$). O pré-tratamento com NPLA bloqueou os efeitos do NMDA (NPLA + NMDA vs Salina + NMDA; $p < 0,05$) sem alterar significativamente os níveis basais de ansiedade quando comparado com o grupo controle (NPLA + Salina vs Salina + Salina; $p > 0,05$). Nenhum tratamento alterou a frequência de entradas nos braços fechados (Fator pré-tratamento: $F_{1,27} = 1,39$; $p >$

0,05; Fator tratamento: $F_{1,27} = 0,0006$; $p > 0,05$; Interação entre pré-tratamento x tratamento: $F_{1,27} = 0,22$; $p > 0,05$).

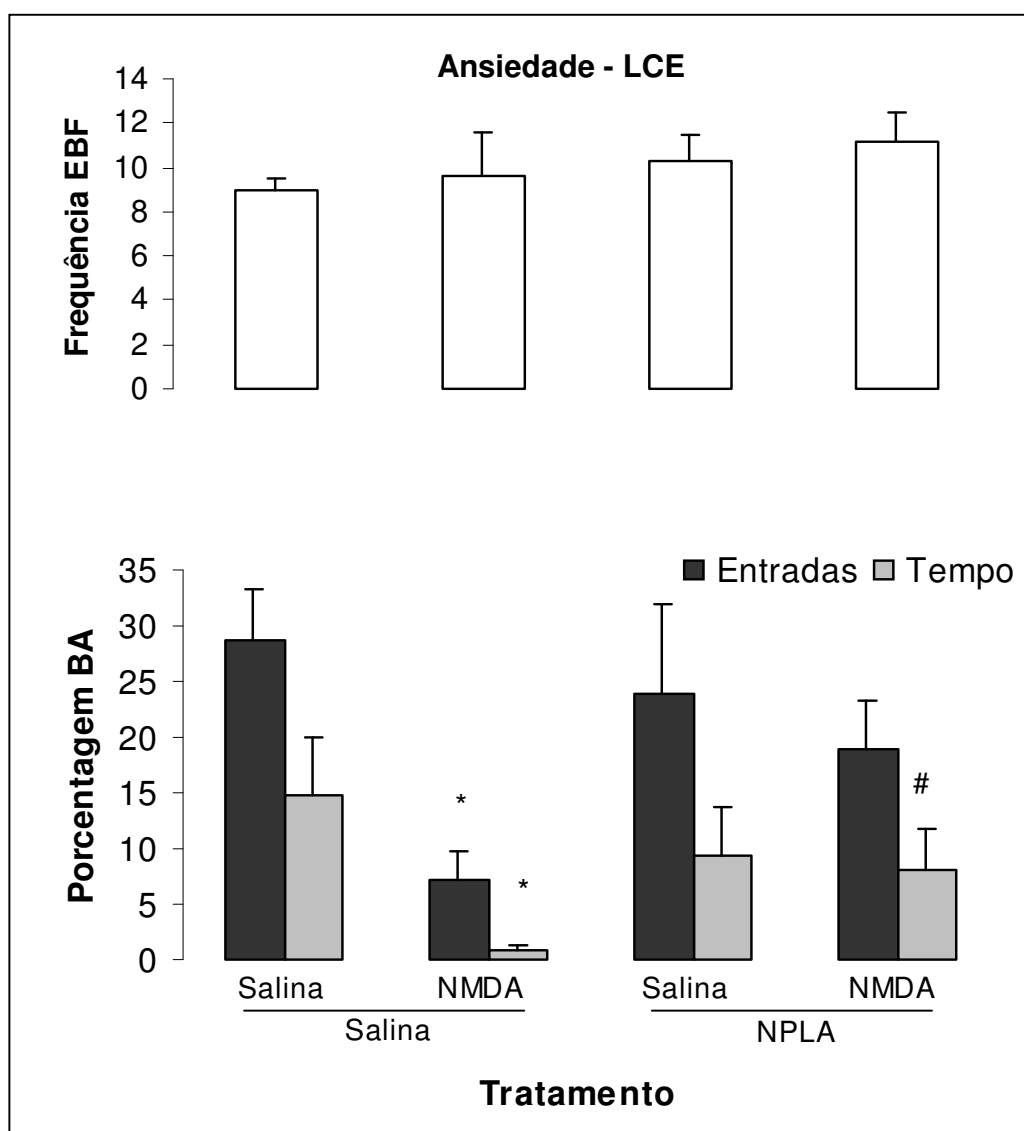


Figura 3 - Efeitos de microinjeções combinadas de salina, NPLA ou NMDA (ver texto para detalhes) na MCP de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (BA) e na frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCEp. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 7-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina + salina e # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina + NMDA.

2.4 DISCUSSÃO

Os presentes resultados corroboram estudos anteriores nos quais foram demonstrados efeitos aversivos da ativação glutamatérgica em receptores NMDA na MCP (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; SCHENBERG et al., 2005). A injeção intra-MCP de NMDA, em uma dose ineficaz para produzir reações comportamentais explosivas como saltos e corrida, provocou diminuição do tempo e da frequência de entradas nos braços abertos do LCE, efeitos característicos de agentes ansiogênicos. Tais efeitos se mostraram seletivos sobre a ansiedade, uma vez que não foram acompanhados por alterações significativas da atividade locomotora expressos pela frequência de entradas nos braços fechados. Estes resultados sugerem que os mecanismos glutamatérgicos via receptores NMDA da MCP exercem um papel também na modulação de comportamentos defensivos mais sutis e não apenas daqueles associados às reações explosivas como fuga e luta, aos quais têm sido relacionadas à esquiva do perigo proximal, tal como acontece em situações de medo (BANDLER, 1988; BANDLER; CARRIVE, 1988; BANDLER; DEPAULIS, 1991; JACQUET, 1988; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Assim, nossos resultados fortalecem a hipótese de que a MCP também faz parte da modulação de outros comportamentos ansiosos mais elaborados como os observados através da alteração dos índices de ansiedade no LCE. Resultados semelhantes foram relatados por Carvalho-Netto e colaboradores (2006), que descreveram os efeitos pró-aversivos de injeções intra-MCP do ácido D,L-Homocistéico (DLH) em camundongos. Segundo esses autores, a injeção intra-MCP de DLH, agonista glutamatérgico, induziu reações vigorosas de defesa

caracterizadas por corridas e saltos, destacando papel da MCP nesses comportamentos. No entanto, Carvalho-Netto e colaboradores (2009) também demonstraram que a injeção de NMDA no mesmo sítio exacerbou os comportamentos de defesa frente ao predador, no teste de exposição ao rato (do inglês RET: rat exposure test), exemplificados pela redução do tempo de contato do animal com a grade que o separa do predador, além de tender a aumentar o tempo de avaliação de risco do animal. Tais resultados denotam um efeito ansiogênico do NMDA e, portanto, da ativação da via glutamatérgica, também nos comportamentos defensivos mais orientados como avaliação de risco e permanência na superfície do RET. Desta forma, a MCP estaria envolvida na mediação dos comportamentos explosivos de defesa relacionados ao medo e também participaria, juntamente com estruturas prosencefálicas (córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala), do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados à ansiedade como postularam McNaughton e Corr (2004).

De modo interessante, os efeitos ansiogênicos da injeção intra-MCP de NMDA foram antagonizados pela infusão local do inibidor de NOSn, NPLA, sugerindo ser a ação pró-aversiva da ativação do receptor glutamatérgico NMDA dependente da produção de óxido nítrico. Estes resultados corroboram estudos anteriores, como o de Miguel e Nunes-de-Souza (2006), que demonstrou inibição da antinocicepção e das respostas explosivas de saltos e corrida e do congelamento induzidos pela injeção de NMDA na MCP, em animais pré-tratados com NPLA na mesma estrutura, sugerindo a participação nitrérgica nas reações

defensivas provocadas pela ativação da transmissão glutamatérgica em receptores NMDA. Corroborando a hipótese do papel ansiogênico do NO, De Oliveira e colegas (2000a) mostraram aumento da expressão do RNA mensageiro para NOS neuronal em áreas relacionadas a reações de defesa (incluindo a MCP dorsal) após estresse agudo e crônico em ratos. Neste contexto, Chiavegatto, Scavone e Canteras (1998) demonstraram que a exposição de ratos a predadores provoca aumento nos níveis de NO/cGMP na MCP, reforçando o envolvimento desse complexo na modulação das reações de defesa frente a estímulos aversivos.

De modo interessante, o tratamento com NPLA (NPLA + salina) não alterou os índices de ansiedade, sugerindo ausência de efeitos intrínsecos deste inibidor da NOSn sobre a esquia dos braços abertos no LCE. Assim, embora o óxido nítrico seja uma possível via de ação ansiogênica do glutamato, sobretudo através do receptor NMDA, os presentes resultados indicam que sua modulação sobre a ansiedade possa não ser tônica, pelo menos no que se refere ao comportamento defensivo no LCE. Estes resultados corroboram trabalhos anteriores do nosso laboratório (MIGUEL, 2006) nos quais a injeção de diferentes doses desse inibidor (NPLA) intra-MCP não alterou os índices de ansiedade em animais submetidos ao LCE.

Entretanto, evidências da participação nitrérgica no “tônus” comportamental defensivo foram apontadas por Carvalho-Netto e colaboradores (2009). Nesse estudo, injeções intra-MCP de NPLA, além de reduzirem os efeitos pró-aversivos do NMDA, atenuaram, por si só, as reações de defesa de camundongos expostos

ao predador (rato) no modelo do RET. Assim, o estado emocional desencadeado pela exposição ao LCE parece ser diferente daquele experimentado durante o RET. Enquanto o primeiro parece não mobilizar a síntese de NO, a exposição ao RET demonstrou ser dependente da modulação nitrérgica na MCP.

Além disso, estudos anteriores (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 1997; 2001; FARIA et al., 1997; GUIMARÃES et al., 1994) demonstraram que injeções sistêmicas de L-NAME e intra-MCP de L-NAME e de L-NOARG inibidores inespecíficos da NOS atenuaram a ansiedade em ratos submetidos ao LCE, sugerindo ser a seletividade do agente inibidor pelo tipo de NOS um aspecto relevante para os efeitos ansiolíticos no LCE. A importância dessa especificidade se torna crucial quando consideramos que, além da neuronal, estão presentes outras isoformas de NOS na MCP, como a endotelial (NOSe; IWASE et al., 2000; PAAKARI; LINDSBERG, 1995). Sendo assim, não pode ser descartada a hipótese de que os efeitos ansiolíticos de inibidores não específicos de NOS possam estar associados à inibição de outra isoenzima como a NOSe. Corroborando esta hipótese, resultados oriundos de nosso laboratório mostraram que injeções intra-MCP de L-NAME atenuaram a ansiedade de camundongos expostos ao LCE (CABRAL et al., 2003). Assim, a realização de um estudo com um inibidor seletivo para NOSe poderia levar a resultados mais conclusivos. Neste sentido, a avaliação da microinjeção intra-MCP de L-NIO, um inibidor de NOS com maior seletividade para o subtipo endotelial, sobre os índices de ansiedade de camundongos expostos ao LCE seria uma ferramenta útil para essa questão, uma vez que, baseado nestes fatos, a hipótese de que ambas as isoenzimas atuem em conjunto através de um mecanismo de potencialização pode ser considerada.

Em apoio a essa hipótese de potencialização estão os achados de Hopper e Garthwaite (2006), os quais relacionam o LTP (Potenciação de longa duração; importante fenômeno relacionado a aprendizado e memória) no hipocampo, com a NOSe, além da NOSn. Neste estudo, a inibição da ação de ambas isoformas isoladamente provocou prejuízo na manutenção do LTP, sugerindo uma contribuição relativa entre as duas isoformas para a manutenção deste fenômeno. Ainda neste sentido, Son e colaboradores (1996) demonstraram que animais nocaute somente para NOSn ou NOSe não apresentaram prejuízos na manutenção do LTP. Entretanto, animais nocaute para as duas isoformas tiveram redução drástica no LTP no hipocampo. Finalmente, uma série de evidências relacionam a NOSe, através de sua inibição ou por meio de animais nocaute, com efeitos que antes se pensava serem decorrentes exclusivamente da ativação da isoforma NOSn, como plasticidade sináptica, regulação autonômica, anormalidades neuroquímicas e comportamentais, e neurogênese (CHEN et al., 2005; DEMAS et al., 1999; DOREULEE et al., 2003; FRISCH et al., 2000; HAUL et al., 1999; KANO et al., 1998; PATON; KASPAROV; PATERSON, 2003; REIF et al., 2004). Tais experimentos fortalecem a hipótese da possível ligação entre essas duas isoformas na mediação de diversas respostas incluindo-se aquelas eliciadas no sistema nervoso central.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-MCP DE CRF NA ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS NO LCE E NA NOCICEPÇÃO: AVALIAÇÃO DA MEDIAÇÃO DOS SUBTIPOS DE RECEPTORES CRFérgicos E DA PARTICIPAÇÃO NITRÉRGICA

A MCP, como descrito anteriormente, é uma estrutura encefálica crucial na modulação da nocicepção e de comportamentos relacionados às respostas exibidas mediante estímulos aversivos (FARDIN et al., 1984a, 1984b; LITVIN et al., 2007). Prévios estudos relacionaram a sua ativação (química ou elétrica) com a exibição de comportamentos aversivos como congelamento, fuga e escape, bem como aumento do nível de alerta e avaliação de risco (BANDLER; CARRIVE, 1988; BANDLER et al., 1988; SCHENBERG et al., 2005). Estes comportamentos são acompanhados de antinocicepção (COIMBRA; BRANDÃO, 1997; FANSELOW, 1991,) e alteração dos padrões autonômicos como frequência cardíaca (observa-se taquicardia), pressão arterial (aumento) e frequência respiratória (taquipnéia) entre outros (BANDLER; CARRIVE; ZHANG, 1991; HAYWARD; SCHWARTZ; DAVENPORT, 2003; McDOUGALL; DAMPNEY; BANDLER, 1985).

Uma variedade de neurotransmissores está presente na MCP e, portanto, são capazes de influenciar este controle que a MCP exerce sobre o desencadeamento das respostas defensivas. Dentre eles destacam-se a serotonina, o glutamato, o ácido gama amino butírico e os neuropeptídeos como os opióides e o CRF (BRANDÃO et al., 1999; GRAEFF, 2004; JENCK; SCHMIDTT; KARLI, 1986; LITVIN et al., 2007). O descontrole na atividade desses

transmissores na MCP pode provocar problemas no estado de ativação-inativação da estrutura, sendo muitas das vezes essa a causa e a origem dos sintomas relacionados aos transtornos de ansiedade. Com relação aos receptores para o CRF, estudos anteriores têm demonstrado haver densa marcação para ambos os subtipos CRF1 e CRF2 nas diferentes colunas da MCP (MERCHENTHALER, 1984; STECKLER; HOLSBOER, 1999; SWANSON et al., 1983). Além disso, Gray e Magnuson (1992) realizaram trabalhos de marcação neuronal retrógrada, nos quais demonstraram haver conexões CRFérgicas aferentes na MCP oriundas de importantes núcleos relacionados à mediação das respostas defensivas, como amígdala, hipotálamo e núcleo intersticial da estria terminal (BNST).

Neste sentido, experimentos com fármacos agonistas e antagonistas revelaram o envolvimento deste peptídeo na elaboração e exibição de respostas comportamentais relacionadas ao estresse, incluindo-se o medo e a ansiedade (GRIEBEL, et al., 2002; TAKAHASHI, 2001), a agressão (FARROKHI et al., 2004) e distúrbios alimentares (JONES et al., 1998). Corroborando estes achados, microinjeções diretas de CRF na MCP de ratos foram eficazes em provocar o aumento da ansiedade avaliada no LCE (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997). Além disso, Carvalho-Netto e colaboradores (2007) demonstraram aumento do comportamento de esquiva no paradigma da bateria de testes defensivos para camundongos (do inglês mouse defense test battery – MDTB) e no teste de exposição ao rato (RET) em camundongos que receberam injeção de oCRF na MCP. Esses resultados, somados aos achados de Bowers, Swisher e Behbehani (2003), os quais demonstraram a propriedade excitatória do CRF em neurônios da

MCP, indicam um papel importante para o CRF na MCP no que diz respeito à mediação de comportamentos defensivos.

A atuação dos subtipos dos receptores CRFérgicos na ação ansiogênica do CRF ainda necessita de maiores esclarecimentos, uma vez que pouco se sabe nesse campo. Desta forma, estudos neste sentido constituem uma importante e promissora linha de investigação. Como já descrito anteriormente (Capítulo 1, item 1.5), o papel do receptor CRF1 parece ser mais conhecido que o do CRF2, uma vez que existe maior número de trabalhos na literatura relacionando-o com os diferentes comportamentos ligados a situações de estresse e ansiedade. Assim, este capítulo abordará os experimentos realizados com injeções intra-MCP de CRF e seus efeitos sobre a ansiedade e nocicepção de camundongos. O papel dos receptores CRF1 e CRF2 é também enfatizado. Além disso, como descrito anteriormente, uma vez que o CRF é hábil em induzir excitação neuronal e liberação intracelular de cálcio, o presente estudo investigou também se essa ação ansiogênica do CRF está relacionada com a síntese de óxido nítrico e ativação da via NO-GMPc, a exemplo da ação glutamatérgica demonstrada no capítulo 2 e em trabalhos anteriores como o de Miguel e Nunes-de-Souza (2006).

3.1 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo investigar o envolvimento do CRF dentro da MCP na mediação das respostas relacionadas à ansiedade e nocicepção, bem como verificar a participação dos subtipos de receptores CRFérgicos e a mediação nitrérgica nestes efeitos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Sujeitos

Semelhante ao descrito no item 2.2.1, Capítulo 2.

3.2.2 Cirurgia e administração de drogas na MCP

Semelhante ao descrito no item 2.2.2, Capítulo 2, com a exceção de que o volume microinjetado na MCP foi de 0,2 μ L, por motivos de diluição.

3.2.3 Fármacos

Foram utilizados: CRF (75 e 150 pmol/ 0,2 μ L), NPLA (0,4 nmol/ 0,2 μ L), NBI 27944 [5-cloro-4-(N-ciclopropil)metil-N-propilamo)-2-metil-6-(2,4,6-triclorofenil) aminopiridina] - (2 nmol/ 0,2 μ L), antagonista de receptores CRF1 e antisauvagine 30 (1 nmol/ 0,2 μ L), antagonista de receptores CRF2. As doses foram baseadas em estudos anteriores (HAMMACK et al., 2003; JOCHMAN et al., 2005; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; SAHUQUE et al., 2006). O NBI foi solubilizado em DMSO (dimetil sulfóxido) e as demais drogas em solução salina. Assim, o DMSO também foi utilizado como controle quando necessário.

3.2.4 Avaliação das reações de defesa - grupo ansiedade

As reações provocadas pelos diferentes tratamentos intra-MCP foram avaliadas em grupos de animais expostos ao LCE, obedecendo-se metodologia similar à descrita no subitem 2.2.4.1, Capítulo 2.

3.2.5 Teste de Nocicepção - grupo nocicepção

A nocicepção foi avaliada em grupos de animais diferentes daqueles utilizados para avaliação das reações de defesa, através do teste da formalina.

3.2.5.1 Teste da formalina

A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (DUBUISSON; DENNIS, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, enquanto a segunda fase (tônica) inicia-se depois de 20 minutos da injeção de formalina e dura por volta de 40-50 minutos. Essas duas fases envolvem diferentes mecanismos de nocicepção.

A primeira fase é ocasionada predominantemente pela ativação de fibras C, enquanto a segunda fase parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico injuriado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinhal. No presente estudo, os camundongos foram tratados com 50 µL de solução de formalina (2,5%) injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados numa

cuba de vidro (30 x 21 x 25 cm) para o registro do tempo de lambidas na pata tratada com formalina, por 5 minutos (Fase 1: essa medida será usada apenas para a avaliação da homogeneidade dos grupos antes da administração dos diferentes compostos farmacológicos). Após a injeção de formalina e anterior ao início da fase 2, os animais eram tratados com os diferentes fármacos (melhor detalhado posteriormente durante o delineamento experimental de cada experimento) de modo que o tempo para ação do fármaco era calculado para coincidir com o período de registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

Ambos os testes de nocicepção e de avaliação das reações de defesa foram gravados através de um circuito de câmera-TV-DVD para posterior análise da mídia por um observador treinado.

3.2.6 Histologia

Semelhante ao descrito no item 2.2.5, Capítulo 2.

3.2.7 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Levene e, quando necessário, transformados em raiz quadrada, raiz cúbica ou LOG de $n + 1$ na base 10. Na sequência, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes (fator 1: pré-tratamento na MCP; fator 2: tratamento na MCP, melhor detalhado posteriormente). Finalmente,

os dados foram submetidos à análise post hoc de Duncan. Exceção realizada para o experimento 3.A, que consistiu de somente um tratamento na MCP. Assim, não havendo pré-tratamento, foi realizada a análise de variância de um fator.

3.2.8 Delineamento Experimental

3.2.8.1 Experimento 3.A: Avaliação do efeito da microinjeção de CRF na MCP sobre a ansiedade e nocicepção

Este experimento foi realizado para avaliar as ações ansiogênica e antinociceptiva do CRF. Embora seja conhecida a ação ansiogênica do CRF na MCP (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997) foi necessário pesquisar e caracterizá-lo como ansiogênico para posteriormente avaliar sua putativa sensibilidade aos antagonistas que foram utilizados neste trabalho. Além disso, foi também realizada a avaliação da injeção de CRF na MCP sobre a nocicepção.

Ansiedade: os animais receberam microinjeção intra-MCP de CRF (0, 75 ou 150 nmoles/0,2 µL) e, após 10 minutos, cada camundongo foi exposto ao LCE para o registro dos índices de ansiedade e da atividade locomotora por cinco minutos (ver acima detalhes sobre o LCE, subitem 2.3.4.1, capítulo 2) .

Nocicepção: quinze minutos após a injeção de formalina, os animais receberam microinjeção intra-MCP de CRF (0, 75 ou 150 nmoles/0,2 µL) e, após 10 minutos, foram individualmente colocados na cuba de vidro (30 x 21 x 25 cm)

para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

3.2.8.2 Experimento 3.B: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.

Ansiedade: os animais receberam uma primeira microinjeção intra-MCP de NBI 27914 (pré-tratamento; 0 ou 2 nmoles/0,2 μ L). Após dez minutos, os animais receberam uma microinjeção de CRF no mesmo sítio (tratamento; 0 ou 150 pmoles/0,2 μ L) e, após 10 minutos, cada camundongo foi exposto ao LCE para o registro dos índices de ansiedade e da atividade locomotora por cinco minutos (ver acima detalhes sobre o LCE, subitem 2.3.4.1, Capítulo 2).

Nocicepção: cinco minutos após a injeção de formalina (isto é, imediatamente após o registro da primeira fase nociceptiva), os animais receberam microinjeção intra-MCP de NBI 27914 (pré-tratamento; 0 ou 2 nmoles/0,2 μ L). Após 10 minutos, os animais receberam uma microinjeção de CRF no mesmo sítio (0 ou 150 pmoles/0,2 μ L) e, após 10 minutos, foram individualmente colocados na cuba de vidro para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

3.2.8.3 Experimento 3.C: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF2 da MCP, com o pré-tratamento com ASV-30, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.

Ansiedade: os animais receberam uma primeira microinjeção intra-MCP de ASV-30 (pré-tratamento; 0 ou 1 nmol/0,2 μ L). Após 10 minutos, os animais receberam uma microinjeção de CRF no mesmo sítio (tratamento; 0 ou 150 pmoles/0,2 μ L) e, após 10 minutos, cada camundongo foi exposto ao LCE para o registro dos índices de ansiedade e da atividade locomotora por cinco minutos (ver acima detalhes sobre o LCE, subitem 2.3.4.1, capítulo 2) .

Nocicepção: cinco minutos após a injeção de formalina (isto é, imediatamente após o registro da primeira fase nociceptiva), os animais receberam microinjeção intra-MCP de ASV-30 (pré-tratamento; 0 ou 1 nmol/0,2 μ L). Após dez minutos, os animais receberam uma microinjeção de CRF no mesmo sítio (0 ou 150 pmoles/0,2 μ L) e, após 10 minutos, foram individualmente colocados na cuba de vidro para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

3.2.8.4 Experimento 3.D: Avaliação da inibição da síntese de NO na MCP, com o pré-tratamento com NPLA, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio.

Ansiedade: os animais receberam uma primeira microinjeção intra-MCP NPLA (pré-tratamento; 0 ou 0,4 nmol/ 0,2 µL). Após dez minutos, os animais receberam uma microinjeção no mesmo sítio de CRF (tratamento; 0 ou 150 pmoles/0,2 µL) e, após 10 minutos, cada camundongo foi exposto ao LCE para o registro dos índices de ansiedade e da atividade locomotora por cinco minutos (ver acima detalhes sobre o LCE, subitem 2.3.4.1, Capítulo 2) .

Nocicepção: cinco minutos após a injeção de formalina, (isto é, imediatamente após o registro da primeira fase nociceptiva), os animais receberam microinjeção intra-MCP de NPLA (pré-tratamento; 0 ou 0,4 nmol/0,2 µL). Após dez minutos, os animais receberam uma microinjeção no mesmo sítio de CRF (0 ou 150 pmoles/0,2 µL) e, após 10 minutos, foram individualmente colocados na cuba de vidro para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

3.2.8.5 Experimento 3.E: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito antinociceptivo da exposição ao LCE aberto.

Quinze minutos após a injeção de formalina os animais receberam microinjeção intra-MCP de NBI 27914 (0 ou 2 nmoles/0,2 μ L). Após dez minutos, os animais foram colocados no LCE aberto ou fechado (controle) para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Experimento 3A: Avaliação do efeito da microinjeção de CRF na MCP sobre a ansiedade e nocicepção

A Figura 4 mostra a frequência de entradas nos braços fechados e os índices de ansiedade avaliados em animais submetidos ao LCE padrão após receberem microinjeção intra-MCP de CRF (75 ou 150 pmol/0,2 μ L) ou salina. A ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que a injeção de CRF (150 nmol) diminuiu a % de entradas ($F_{2,34} = 5,38$; $p < 0,05$) e a % de tempo gasto ($F_{2,34} = 7,03$; $p < 0,05$) nos braços abertos do LCE. Embora a ANOVA tenha também revelado diferenças significativas do tratamento sobre a locomoção ($F_{2,34} = 3,3$; $p = 0,05$) comparações posteriores indicaram que apenas a dose mais baixa de CRF reduziu frequência de entradas nos braços fechados.

A Figura 5 mostra o tempo de lambidas na pata traseira direita, provocadas

pela injeção de solução de formalina 2,5% em camundongos tratados com microinjeções intra-MCP de CRF (0, 75 ou 150 pmol/0,2 μ L). A análise estatística (ANOVA) revelou diferenças significativas entre os grupos ($F_{2,28} = 9,2$; $p < 0,05$) e comparações posteriores mostraram que o tratamento com o CRF (150 pmol/0,2 μ L) diminuiu o tempo de lambida na pata, demonstrando efeito antinociceptivo.

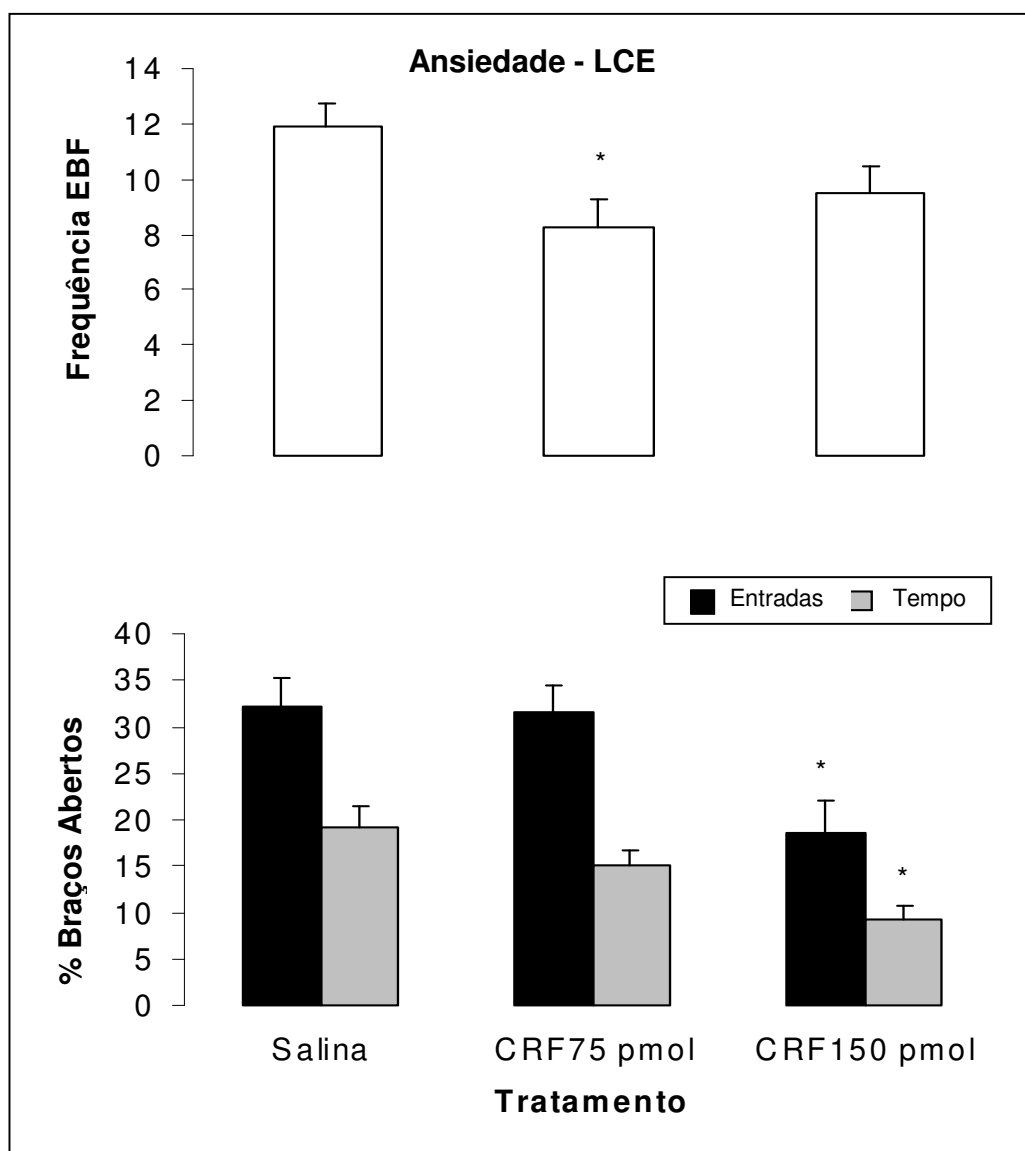


Figura 4 - Efeitos da microinjeção de CRF (0, 75 ou 150 pmol/0,2 μ L) na MCP de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCEp. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-15 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

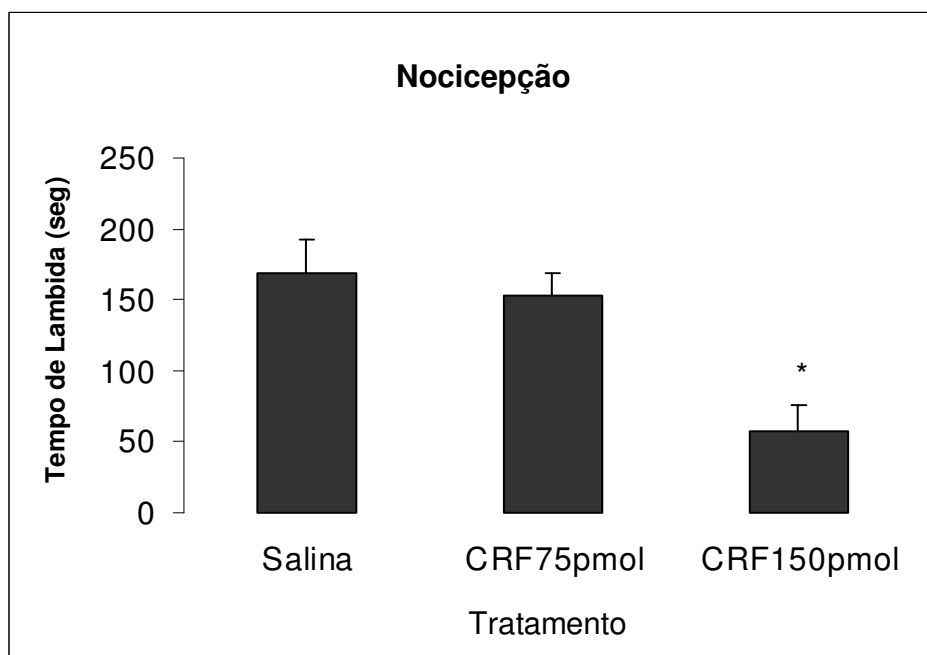


Figura 5 - Tempo (segundos) de lambidas na pata após injeção subcutânea de formalina 2,5% (segunda fase) em camundongos tratados com CRF (0, 75 ou 150 pmol/0,2 μ L) intra-MCP. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. N = 8-13 animais por grupo.

3.3.2 Experimento 3.B: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio

A Figura 6 mostra os efeitos das microinjeções intra-MCP de CRF sobre os índices de ansiedade e locomoção em animais previamente tratados com NBI 27914 no mesmo sítio acompanhado de seus controles. Com relação ao índice %EBA, a ANOVA de dois fatores revelou diferenças tanto para o fator pré-tratamento ($F_{1,37} = 4,22$; $p < 0,05$) como para o fator tratamento ($F_{1,37} = 15,16$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre eles ($F_{1,37} = 1,06$; $p > 0,05$). O segundo índice analisado, %TBA apresentou resultados semelhantes ao anterior onde a ANOVA

também revelou diferenças tanto para o fator pré-tratamento ($F_{1,37} = 4,06$; $p < 0,05$) como para o fator tratamento ($F_{1,37} = 9,84$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre eles ($F_{1,37} = 0,98$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que o grupo tratado com CRF (Veículo + CRF) apresentou menores porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos do LCE ($p < 0,05$) comparado ao controle (Veículo + Veículo). Entretanto, em ambos os índices avaliados, a prévia injeção do antagonista de receptores CRF1, NBI 27914, bloqueou os efeitos do CRF nos dois índices de ansiedade analisados (NBI + CRF vs veículo + veículo, $p > 0,05$). Ressalta-se também que o grupo NBI + CRF apresentou valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) do grupo tratado com CRF (veículo + CRF) para ambos os índices.

Com relação a frequência de entradas nos braços fechados do labirinto (locomotoção), a ANOVA não revelou efeitos significativos para nenhum dos fatores (pré-tratamento: $F_{1,37} = 0,13$; $p > 0,05$; tratamento: $F_{1,37} = 0,16$; $p > 0,05$; Interação pré-tratamento x tratamento: $F_{1,37} = 0,39$; $p > 0,05$).

A Figura 7 mostra o tempo de lambida na pata traseira direita após injeção de formalina 2,5% exibido pelos animais que receberam microinjeções combinadas intra-MCP. A ANOVA de dois fatores não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,32} = 2,49$; $p > 0,05$), porém mostrou efeitos significativos para o fator tratamento ($F_{1,32} = 10,45$; $p < 0,05$) e uma elevada tendência para a interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento ($F_{1,32} = 3,51$; $p = 0,07$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que os animais tratados com CRF (veículo + CRF) lambeiram menos tempo a pata tratada com formalina

quando comparados aos animais do grupo controle (veículo + veículo). No entanto, a injeção do antagonista de receptores CRF1 (NBI 27914) antagonizou os efeitos provocados pelo CRF (NBI + CRF diferente de veículo + CRF) sem, contudo, provocar resposta nociceptiva diferente da apresentada pelo grupo controle (NBI + CRF vs veículo + veículo).

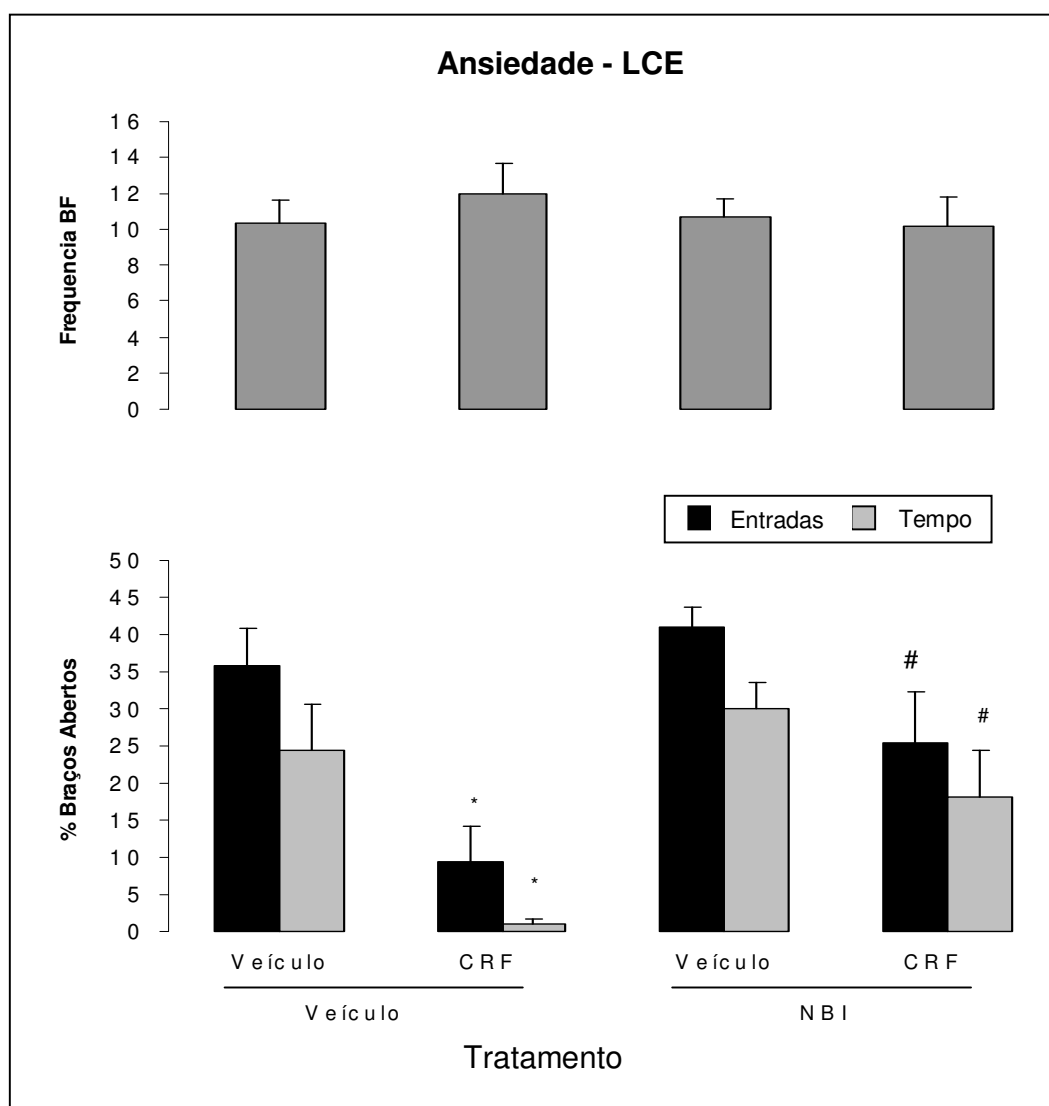


Figura 6 - Efeito dos diferentes tratamentos combinados (ver texto) intra-MCP de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-14 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo + veículo) e # $p < 0,05$ comparado ao grupo Veículo + CRF.

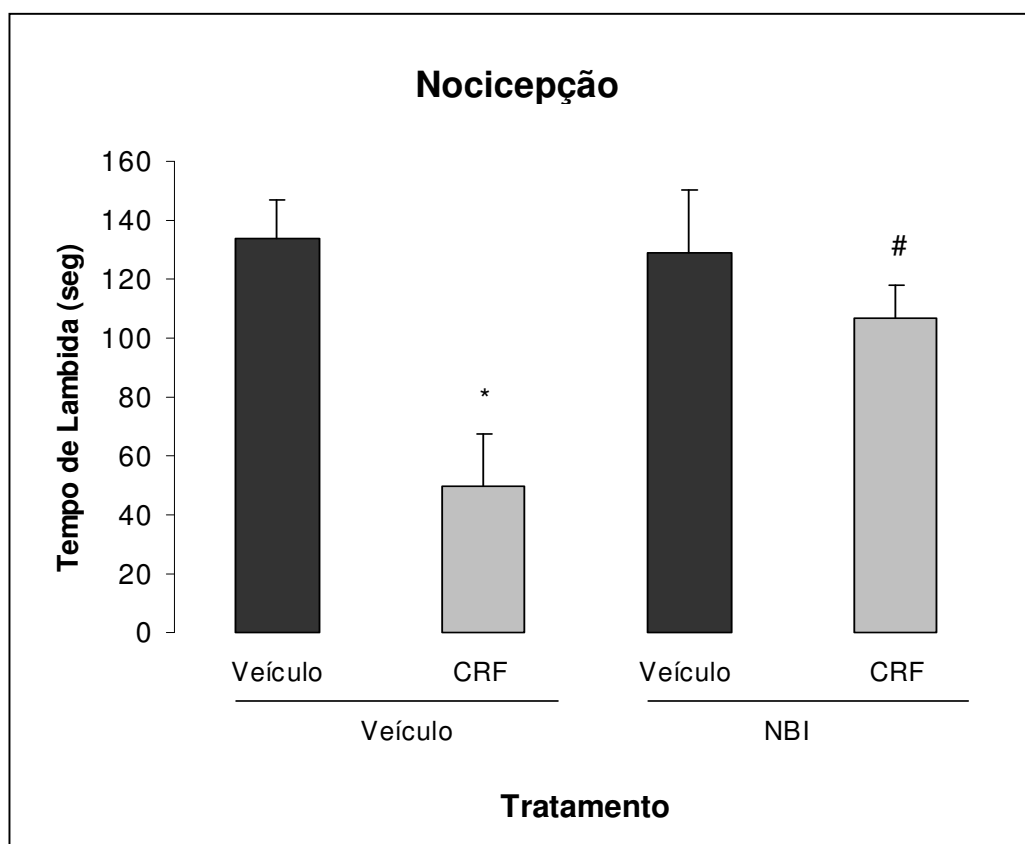


Figura 7 - Efeito dos diferentes tratamentos combinados (ver texto) intra-MCP de camundongos sobre o Tempo (em segundos) de lambidas na pata após a injeção subcutânea de formalina 2,5% (fase tônica). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 8-11 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo + veículo) e # $p < 0,05$ comparado ao grupo Veículo + CRF.

3.3.3 Experimento 3.C: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF2 da MCP, com o pré-tratamento com ASV-30, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio

A Figura 8 mostra os efeitos das microinjeções intra-MCP de CRF sobre os índices de ansiedade e locomoção em animais previamente tratados com ASV-30 no mesmo sítio acompanhado de seus controles. Com relação ao índice %EBA, a ANOVA de dois fatores não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,42} =$

0,02; $p > 0,05$) mas demonstrou diferenças para o fator tratamento ($F_{1,42} = 26,48$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre estes dois fatores ($F_{1,42} = 0,05$; $p > 0,05$). O segundo índice analisado, %TBA apresentou resultados semelhantes ao anterior onde a ANOVA também não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,42} = 0,09$; $p > 0,05$) mas demonstrou diferenças para o fator tratamento ($F_{1,42} = 28,65$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre estes dois fatores ($F_{1,42} = 0,08$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que ambos os grupos tratado com CRF (Veículo + CRF e ASV30 + CRF) apresentaram menores porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos do LCE ($p < 0,05$) comparado ao controle, denotando uma não reversão do efeito ansiogênico do CRF.

Com relação a frequência de entradas nos braços fechados do labirinto (locomotoção), a ANOVA não revelou efeitos significativos para nenhum dos fatores (pré-tratamento: $F_{1,42} = 0,26$; $p > 0,05$; tratamento: $F_{1,42} = 2,47$; $p > 0,05$; Interação pré-tratamento x tratamento: $F_{1,42} = 0,34$; $p > 0,05$).

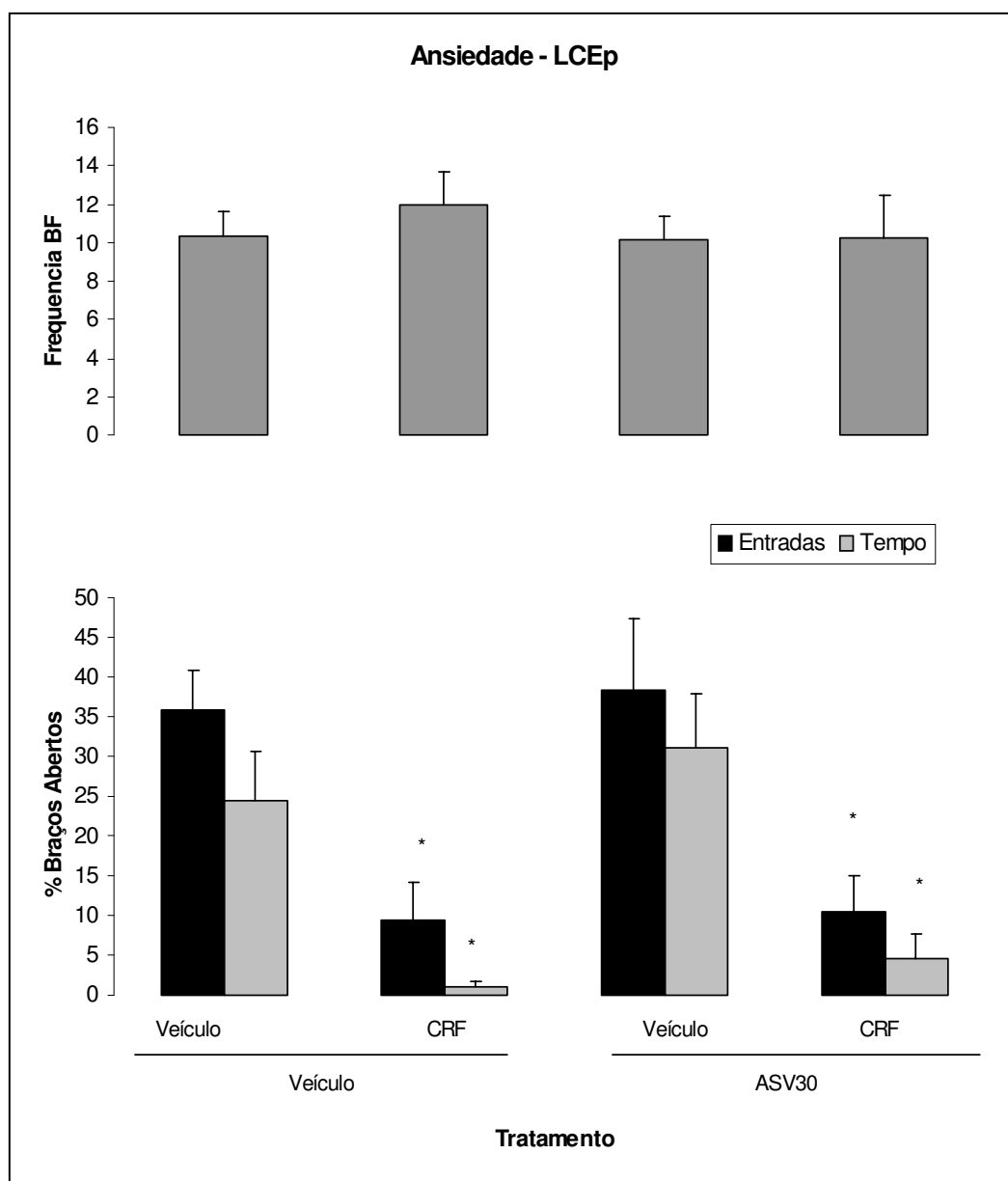


Figura 8 - Efeito dos diferentes tratamentos combinados (ver texto) intra-MCP de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-14 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo + veículo).

A Figura 9 mostra o tempo de lambida na pata traseira direita após injeção de formalina 2,5% exibido pelos animais que receberam microinjeções combinadas intra-MCP. A ANOVA de dois fatores não revelou diferenças para o

fator pré-tratamento ($F_{1,33} = 1,49$; $p > 0,05$), porém mostrou efeitos significativos para o fator tratamento ($F_{1,33} = 33,34$; $p < 0,05$) sem demonstrar interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento ($F_{1,33} = 0,05$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que os animais tratados com CRF (veículo + CRF e ASV30 + CRF) lambem menos tempo a pata tratada com formalina quando comparados aos animais do grupo controle, denotando uma não reversão do efeito antinociceptivo do CRF.

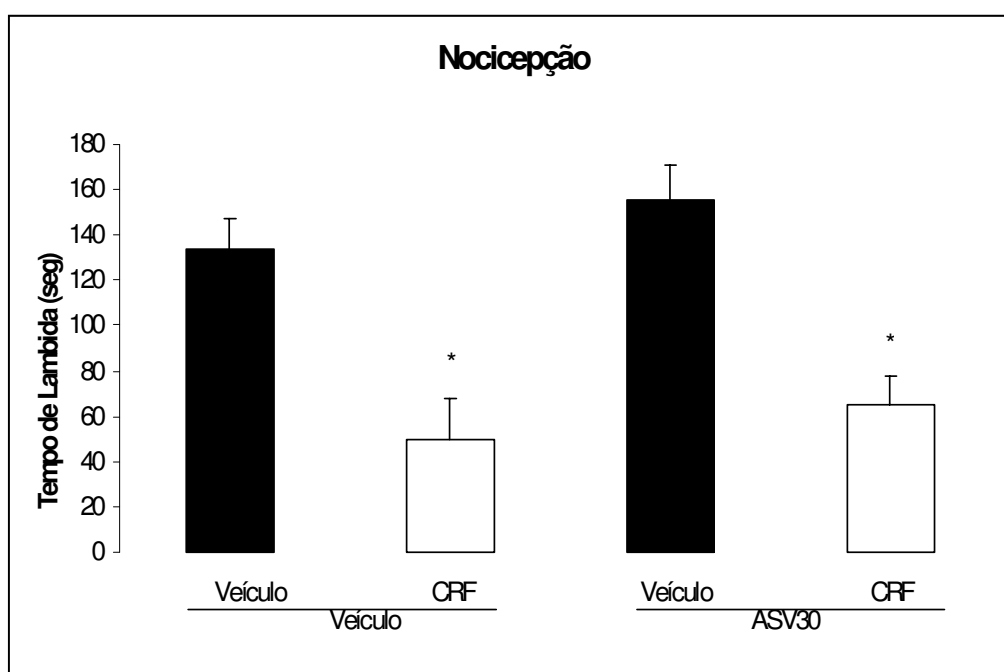


Figura 9 - Efeito dos diferentes tratamentos combinados (ver texto) intra-MCP de camundongos sobre o Tempo (em segundos) de lambidas na pata após a injeção subcutânea de formalina 2,5% (fase tônica). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 8-11 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo + veículo).

3.3.4 Experimento 3.D: Avaliação da inibição da síntese de NO na MCP, com o pré-tratamento com NPLA, sobre o efeito ansiogênico do CRF no mesmo sítio

A Figura 10 mostra os efeitos das microinjeções intra-MCP de CRF sobre os índices de ansiedade e locomoção em animais previamente tratados com NPLA no mesmo sítio acompanhado de seus controles. Com relação ao índice %EBA, a ANOVA de dois fatores não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,38} = 0,06$; $p > 0,05$) mas demonstrou diferenças para o fator tratamento ($F_{1,38} = 14,53$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre estes dois fatores ($F_{1,38} = 0,48$; $p > 0,05$). O segundo índice analisado, %TBA apresentou resultados semelhantes ao anterior onde a ANOVA também não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,38} = 0,00007$; $p > 0,05$) mas demonstrou diferenças para o fator tratamento ($F_{1,38} = 9,92$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre estes dois fatores ($F_{1,38} = 0,97$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que ambos os grupos tratado com CRF (Veículo + CRF e NPLA + CRF) apresentaram menores porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos do LCE ($p < 0,05$) comparados ao controle, denotando uma não reversão do efeito ansiogênico do CRF.

Com relação a frequência de entradas nos braços fechados do labirinto (locomoção), a ANOVA não revelou efeitos significativos para nenhum dos fatores (pré-tratamento: $F_{1,38} = 0,02$; $p > 0,05$; tratamento: $F_{1,38} = 0,006$; $p > 0,05$; Interação pré-tratamento x tratamento: $F_{1,38} = 0,66$; $p > 0,05$).

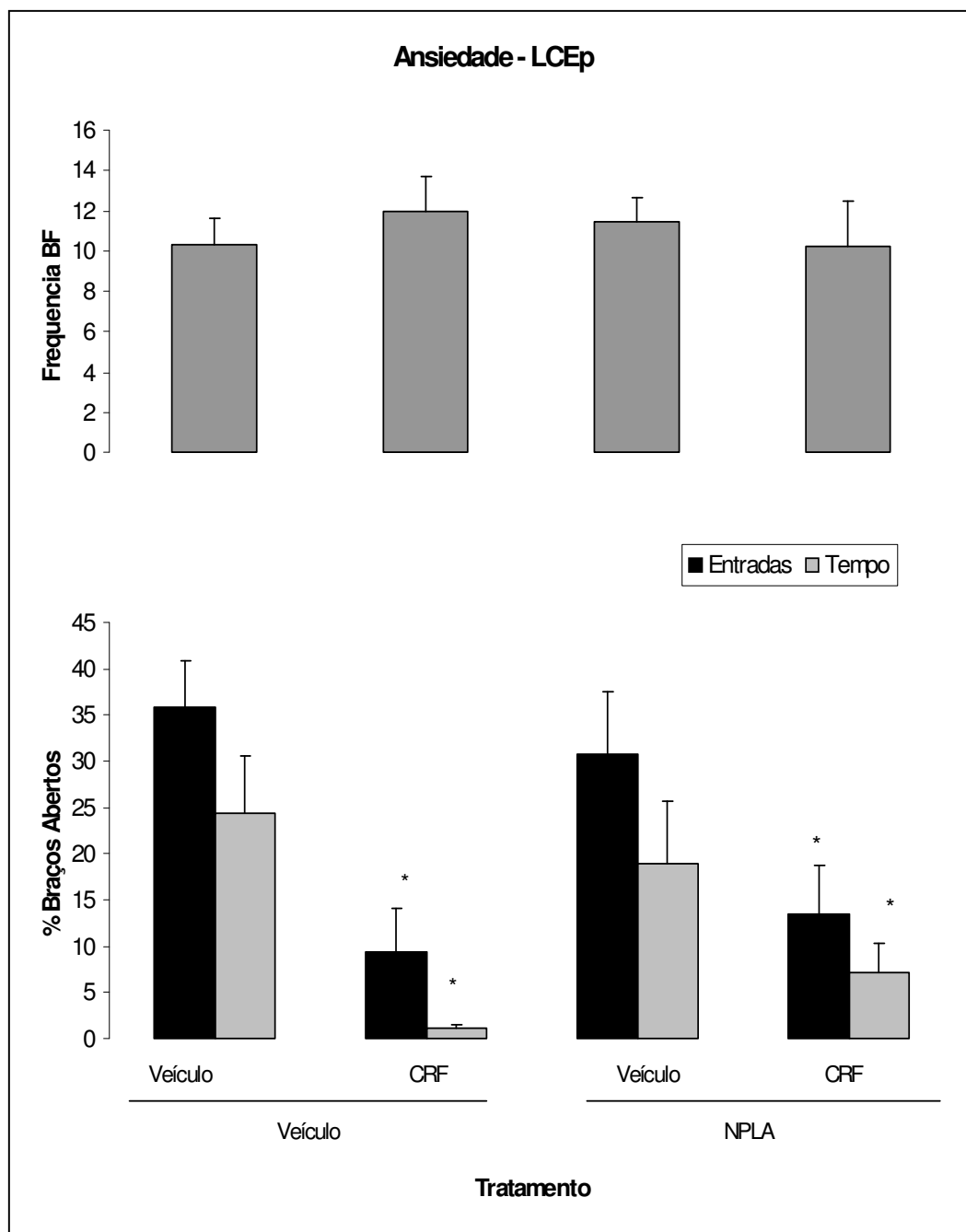


Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos combinados (ver texto) intra-MCP de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-14 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo + veículo).

A Figura 11 mostra o tempo de lambida na pata traseira direita após injeção de formalina 2,5% exibido pelos animais que receberam microinjeções combinadas intra-MCP. A ANOVA de dois fatores não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,30} = 0,91$; $p > 0,05$), porém mostrou efeitos significativos para o fator tratamento ($F_{1,30} = 20,71$; $p < 0,05$) sem demonstrar interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento ($F_{1,30} = 0,13$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que os animais tratados com CRF (veículo + CRF e NPLA + CRF) lambem menos tempo a pata tratada com formalina quando comparados aos animais do grupo controle, denotando uma não reversão do efeito antinociceptivo do CRF.

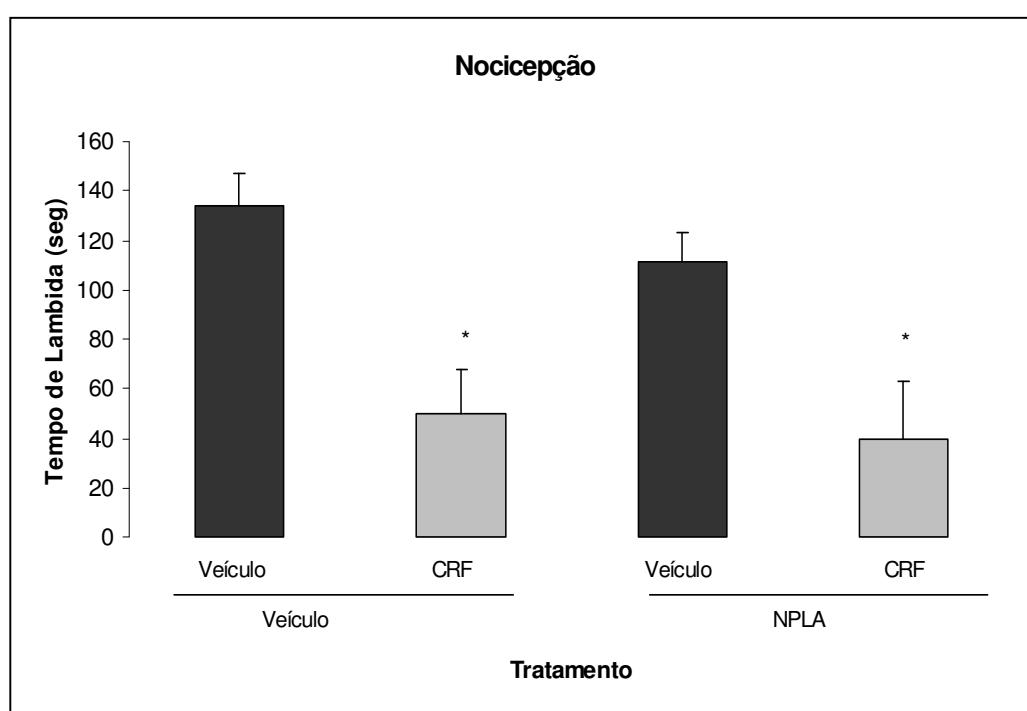


Figura 11 - Efeito dos diferentes tratamentos combinados (ver texto) intra-MCP de camundongos sobre o Tempo (em segundos) de lambidas na pata após a injeção subcutânea de formalina 2,5% (fase tônica). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 8-11 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo + veículo).

3.3.5 Experimento 3.E: Avaliação do bloqueio dos receptores CRF1 da MCP, com o pré-tratamento com NBI 27914, sobre o efeito antinociceptivo da exposição ao LCE aberto

A Figura 12 mostra a ausência de efeitos da microinjeção de NBI 27914 (0 ou 2 nmol/0,2 µL) intra-MCP sobre a resposta nociceptiva em camundongos tratados com solução formalina 2,5%, tanto na situação controle (LCE Fechado) quanto na antinocicepção induzida pelo LCE aberto. Análises estatísticas revelaram (ANOVA de dois fatores – fator 1: LCE e fator 2: Tratamento intra-MCP) diferenças para o fator 1 ($F_{1,29} = 80,08$; $p < 0,05$) mas não para o fator 2 ($F_{1,29} = 0,56$; $p > 0,05$), sem revelar interação entre eles ($F_{1,29} = 1,00$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que os animais expostos ao LCE aberto permaneceram menos tempo lambendo a pata injetada com formalina comparados com aqueles expostos ao LCE fechado. Entretanto, os animais que receberam NBI intra-MCP não apresentaram diferenças de seus controles que receberam veículo em ambos os tipos do aparato. Em outras palavras, o NBI não reverteu a antinocicepção eliciada pelo LCE aberto.

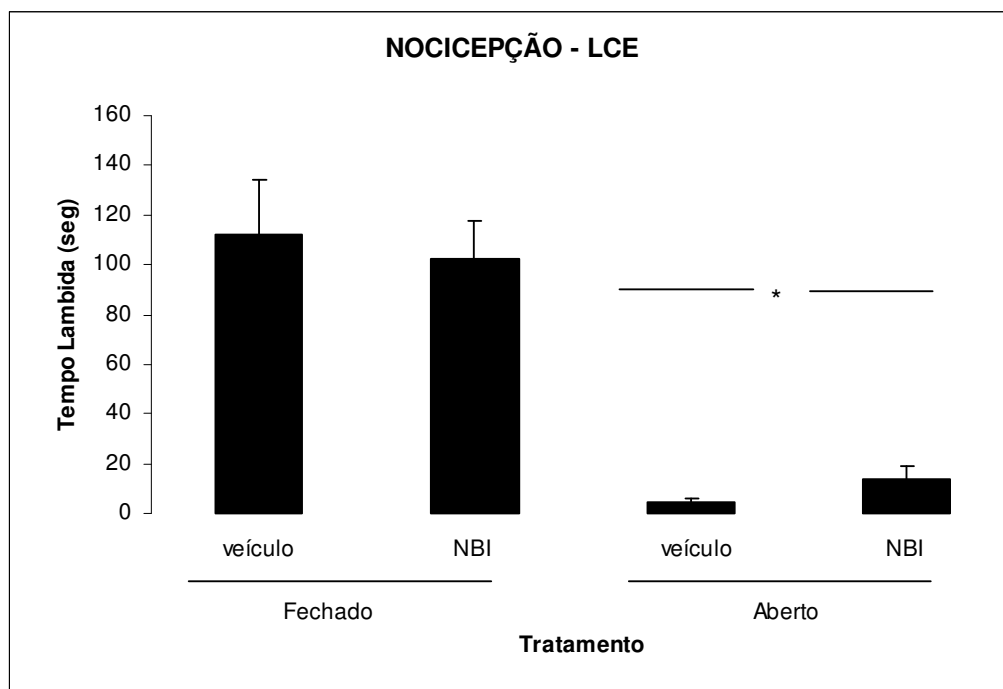


Figura 12 - Efeito do tipo de labirinto em cruz elevado (fechado ou aberto) e da injeção de NBI 27914 intra-MCP sobre o tempo de lambida nas patas (nocicepção) após a injeção subcutânea de formalina 2,5% (fase tônica). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 8-9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao controle (LCE fechado).

3.4 DISCUSSÃO

O primeiro experimento deste capítulo que consistiu da análise do efeito da microinjeção do fator de liberação de corticotrofina, o CRF, sobre os comportamentos no LCE e nocicepção teve por finalidade pesquisar o seu envolvimento nas reações de defesa e na ansiedade. Os resultados dispostos na Figura 4 mostraram efeito ansiogênico deste composto quando microinjetado na MCP de camundongos submetidos ao teste do LCE. A dose mais elevada (150 pmol/0,2 μ L) foi eficaz em reduzir a frequência de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, sem alterar a frequência de

entradas nos braços fechados do aparelho, sugerindo ausência de efeito desse composto sobre a atividade locomotora do animal. Esses achados corroboram estudos de Nishikawa e colaboradores (2004) que mostraram que a injeção i.c.v. de CRF aumentou a ansiedade de camundongos no LCE e de Martins, Marras e Guimarães (1997), nos quais foi demonstrado efeito ansiogênico do CRF na MCP de ratos, também no teste do LCE. Deste modo, pode-se sugerir que a MCP estabeleceu-se como um importante sítio para o efeito ansiogênico do CRF. Neste sentido, tem sido proposto que aferências excitatórias neuropeptidérgicas na MCP como aquelas descritas por Gray e Magnuson (1992) oriundas de núcleos relacionados com a ansiedade como amígdala, hipotálamo e núcleo intersticial da estria terminal (BNST), têm desenvolvido importante papel modulatório, causando despolarização de neurônios CRFérgicos desta estrutura (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997). Estudos *in vitro* (BOWER; SWISHER; BEHBEHANI, 2003) demonstraram que a aplicação de CRF em culturas de células da MCP por meio de um eletrodo (pipeta de vidro acoplada eletrodo aplicador de pulsos elétricos que provocam a injeção da droga, também denominado quimitrodo) produziu significativo aumento da taxa de disparos na maioria das células neuronais testadas. Além disso, esse efeito foi verificado em neurônios de diferentes colunas da MCP (dorsolateral, dorsomedial e ventrolateral), demonstrando não ser um efeito sítio específico. Tais evidências corroboram os achados de Swanson e colaboradores (1983) e Merchenthaler (1984) que demonstraram, através de estudos imuno-histoquímicos, a presença de receptores CRF-érgicos em todas as colunas da MCP.

Assim, a ação ansiogênica do CRF evidenciada neste trabalho pode se

dever a uma resposta excitatória neuronal promovida pelo CRF associada à despolarização da membrana de neurônios da MCP. Essa resposta irá originar uma cascata de eventos, parte deles investigada nos experimentos seguintes do presente estudo, culminando com a manifestação de comportamentos ansiosos.

A estimulação dos neurônios da MCP com CRF também levou a alterações da resposta nociceptiva. Como se pode observar na Figura 5, a microinjeção intra-MCP de CRF (na dose mais elevada) provocou efeito antinociceptivo em animais submetidos ao teste da formalina. É possível que parte dos neurônios ativados na MCP pelo CRF pertençam ao sistema inibitório descendente da dor (FIELDS; BASBAUM, 1999), uma vez que os animais apresentaram antinocicepção. Este sistema é composto por um feixe descendente de neurônios que fazem sinapses na MCP, de onde são enviadas projeções para o Núcleo Magno da Rafe, entre outras áreas como, por exemplo, *Locus Coeruleus* e Nucleo Paragigantocelular. O ramo descendente desse sistema termina com sinapses, principalmente serotoninérgicas, no corno dorsal da medula espinhal (KHARKEVICH; CHURUKANOV, 1999; MILLAN, 2002), resultando em inibição da transmissão ascendente do impulso nociceptivo. Esta inibição impede ou retarda a chegada da informação dolorosa nas vias superiores que processam a dor, como o tálamo sensorial, diminuindo a intensidade da dor (BEHBEHANI, 1995; FIELDS; BASBAUM, 1999). Sendo assim, é possível que a antinocicepção desencadeada pela injeção de CRF na MCP decorra da ativação do sistema inibitório descendente e inibição da transmissão dolorosa no corno dorsal da medula espinhal.

De acordo com a hipótese de que situações de estresse provocam liberação de CRF em áreas centrais envolvidas nas respostas defensivas relacionadas ou não ao eixo HPA (ALBECK et al., 1997; PLOTSKY; MEANEY, 1993; RODAROS et al., 2007). Desta forma, é plausível sugerir que o mesmo fenômeno também ocorra na MCP. A favor desta hipótese estão os experimentos de Martins, Marras e Guimarães (2000), que demonstraram que o antagonismo de CRF inibiu o efeito ansiogênico eliciado pelo estresse de imobilidade. Assim, tais situações desencadeariam o aumento da transmissão CRFérgica e consequente ativação do sistema inibitório descendente (BOWERS; SWISHER; BEHBEHANI, 2003). Neste sentido, Lariviere e Melzack (2000) já haviam destacado a MCP como um sítio de potencial envolvimento na mediação da antinocicepção induzida pelo CRF injetado intracerebroventricularmente. Uma vez que existem evidências sugestivas de que o estado de medo inibe a expressão da resposta nociceptiva (BOLLES; FANSELOW, 1980, SIEGFRIED et al., 1990) e que injeções de CRF aumentam a ansiedade no LCE (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997 e presentes resultados), é possível que a antinocicepção provocada pelo medo tenha o CRF como um dos mediadores.

De modo interessante, nenhuma das doses de CRF empregadas no presente estudo eliciou respostas defensivas intempestivas de fuga, uma vez que não foram observados comportamentos de saltos e corridas, como aqueles demonstrados com injeções de NMDA no mesmo sítio (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Mesmo assim, a antinocicepção foi evidenciada tanto com CRF como com NMDA quando microinjetados na MCP (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA,

2006). Tais discrepâncias são sugestivas de que a excitação neuronal da MCP provocada pela injeção de CRF (BOWERS; SWISHER; BEHBEHANI, 2003), embora resulte na ativação do sistema inibitório descendente da dor, não leva a reações comportamentais explosivas, indicando uma possível diferenciação nas vias neurais e transmissões que modulam tais respostas.

Ambos os efeitos (ansiogênico e antinociceptivo) parecem não depender da síntese de NO, uma vez que a microinjeção prévia no mesmo sítio mesencefálico do inibidor específico da enzima NOSn, o NPLA, não reverteu tanto a ansiedade como a antinocicepção (Figuras 10 e 11). De modo interessante, os resultados mostram também que tanto o efeito ansiogênico quanto a antinocicepção parecem ser mediados por receptores CRF1, uma vez que a injeção local de seu antagonista, o NBI 27914, bloqueou seletivamente ambos os efeitos, como pode ser observado nas Figuras 6 e 7.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho indicam que embora presentes na MCP (STECKLER; HOLLSBOER, 1999), os receptores CRF2 parecem não participar de ambos efeitos do CRF, uma vez que a prévia microinjeção de antisauvagine 30, antagonista deste subtipo de receptores foi inócua aos efeitos do CRF, como se pode observar nas Figuras 8 e 9. Na mesma direção, Sahuque e colaboradores (2006) demonstraram resultados semelhantes a estes, embora a área estudada tenha sido o núcleo intersticial da estria terminal (BNST). Nesse caso, a mediação da ação ansiogênica do CRF também foi direcionada ao receptor CRF1, uma vez que da mesma forma que neste trabalho, os antagonistas CRF1 e CRF2, respectivamente, reverteram e não reverteram a

ação ansiogênica do CRF neste núcleo.

A injeção intra-MCP de CRF diminuiu tanto a porcentagem de entradas como a porcentagem de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Este resultado foi confirmado e fortalecido nos experimentos de injeções combinadas quando se injetava veículo prévio a microinjeção de CRF. Além disso, o efeito ansiogênico se mostrou seletivo para os índices de ansiedade, uma vez que o neuropeptídeo não alterou a frequência de entradas nos braços fechados do aparelho, uma medida amplamente utilizada para se avaliar a atividade locomotora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; COLE, 1994). Estes achados corroboram os trabalhos de Martins, Marras e Guimarães (1997) e de Nishikawa et al. (2004), nos quais foram observados efeitos ansiogênicos com injeções de CRF intra-MCP e i.c.v, respectivamente, em ratos expostos ao LCE. Tomados em conjunto, esses resultados e os apresentados no presente estudo são sugestivos de que a MCP é um sítio importante para o efeito ansiogênico do CRF.

Os resultados do experimento com injeções combinadas de NPLA e NMDA intra-MCP (capítulo 2) demonstraram que a ação aversiva e ansiogênica do glutamato, sobretudo aquela mediada por receptores NMDA apresenta-se dependente da síntese de Óxido Nítrico (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006) já que o prévio tratamento com o NPLA inibiu os efeitos da ativação deste receptor. Entretanto, a mesma relação não foi verificada para o efeito ansiogênico do CRF, uma vez que a inibição da síntese de NO não provocou qualquer alteração na propriedade ansiogênica do CRF na MCP, em nenhum dos índices de ansiedade

avaliados. Assim, com base nos resultados deste trabalho sugere-se que o NO pode não participar da cascata de respostas intracelulares desencadeadas pela liberação de CRF na MCP. Nesta mesma linha, Wilbert-Lampen e colaboradores (2006) demonstraram que o CRF induziu aumento da liberação de endotelina 1 em culturas de células endoteliais, um efeito que foi bloqueado com o tratamento com astressin, um antagonista não seletivo de receptores CRF. Entretanto, os autores observaram que a liberação de NO não foi alterada pelo CRF. Seguindo esse sentido dissociativo da ação CRF e NO, no qual acredita-se que o efeito CRFérgico seja independente de NO, Terui et al. (2001) descreveram que o efeito vasodilatador da urocortina (agonista de receptores CRFérgicos; SUDA et al., 2004) nas coronárias de ratos acordados não foi alterado pela injeção de L-NAME, sugerindo que seu efeito não é via NO, o qual é conhecido ser um potente vasodilatador. Esses achados, mesmo não sendo oriundos de estudos envolvendo a neurotransmissão central, são sugestivos de que a ação do CRF pode não ocorrer por via nitrérgica. Assim, é possível que, de modo semelhante à sua ação em células endoteliais, a ação ansiogênica do CRF não dependa de síntese de NO. No entanto, quando injetado em combinação com NBI 27914, os índices de ansiedade voltaram a valores semelhantes aos do grupo controle, diferindo-se do grupo CRF (veículo + CRF), sugestivo de que o aumento da resposta comportamental defensiva provocada pelo CRF se deva a sua ação em receptores CRF1 de modo majoritário ao CRF2, cujo antagonismo não foi capaz de promover mesmo efeito.

Neste sentido, cabe ressaltar que como descrito no Capítulo 1, o receptor

CRF1 é pertencente ao grupo da família de receptores acoplados à proteína Gs, estimulatória ou excitatória. Uma vez ativado esse receptor irá desencadear uma cascata de reações que irá culminar com a excitação neuronal. Neste conjunto de respostas temos também a ativação de AMPc/PKA que irá fosforilar canais de cálcio, entre outros substratos, permitindo sua abertura e, conseqüentemente, o influxo intracelular deste íon. Neste sentido, torna-se plausível prever a ativação nitrérgica, uma vez que a disponibilidade de cálcio, pré-requisito essencial para ativação das enzimas sintéticas de NO, NOSn e NOSe (detalhado no capítulo 1), foi elevada.

Entretanto isso parece não ter ocorrido se basearmos neste trabalho juntamente com aqueles supra citados. Um fato que pode colaborar no esclarecimento do comportamento diferente do NO nos efeitos glutamatérgicos e CRFérgicos é que os receptores glutamatérgicos NMDA e mesmo os metabotrópicos podem mobilizar uma quantidade significativamente maior de cálcio comparado aos receptores CRF1, devido à natureza correspondente de cada receptor. Já é bem estabelecido que o receptor NMDA, bem como alguns dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGLUR) são capazes de mobilizar alta concentração de cálcio. O NMDA por ser um canal iônico altamente permeável permitindo de modo rápido o influxo do íon e os receptores metabotrópicos acoplados à proteína Gq, os quais, uma vez ativados, possuem a característica de liberar quantidade maciça de cálcio através da via da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o fosfatidilinositol, gerando aumento da permeabilidade a esse íon juntamente com a sua mobilização do retículo endoplasmático

(BERRIDGE, 1981). Com relação à quantidade de cálcio disponibilizada pela ativação dos diferentes tipos de receptores é possível que a via glutamatérgica seja capaz de mobilizar uma maior quantidade de cálcio (canal iônico e PLC) tornando a enzima de síntese de NO, a NOS, mais ativada, produzindo, portanto, maior quantidade de NO. Assim, comparada à ativação de CRF1, que embora também provoque o influxo de cálcio devido a via do AMPc/PKA, essa disponibilidade pode ser menor que a da via da PLC, produzindo menor quantidade de NO. Dessa relação pode-se observar a importância crucial do NO na transmissão glutamatérgica, mas não tão importante na CRFérgica, que provavelmente utilize outros mediadores e mensageiros para estabelecer seus efeitos.

Embora as evidências apontadas acima não confirmem a participação do NO nos efeitos ansiogênicos do CRF, existem estudos que demonstram a interação entre CRF e NO em outros processos biológicos e, portanto, não corroboram os resultados deste trabalho. Por esta via seguem trabalhos como o de Grossini et al. (2008), que recentemente observaram efeitos cardiovasculares (aumento de fluxo coronariano, entre outros) provocados pela administração de urocortina II (um potente agonista CRF com maior afinidade para CRF2) em porcos anestesiados. A possível interação de mecanismos CRFérgicos com a ativação nitrérgica se tornou estreita quando os autores demonstraram que esses efeitos foram abolidos pelo pré-tratamento com L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS. Embora tais evidências tenham sido obtidas em estudos envolvendo espécies diferentes (ratos x porcos) bem como diferentes procedimentos

experimentais (animais acordados x animais anestesiados), deve ser salientado que a compreensão dessa possível interação - CRF/NO - necessita de novos estudos, uma vez que este efeito dual do NO sobre neurotransmissores e hormônios não parece ser exclusividade da interação com o CRF. Na realidade, esse perfil do NO é encontrado com outros compostos também, como nos efeitos bifásicos sobre modulação da transmissão glutamatérgica (CONTESTABILE, 2000; LIN et al., 2000; SISTIAGA; MIRAS-PORTUGAL; SÁNCHEZ-PRIETO, 1997), GABAérgica e serotoninérgica (LOVICK; PAUL, 1999; TRABACE; KENDRICK, 2000). É possível que essa característica dual dos efeitos provocados pelo NO possa explicar, pelo menos em parte, os resultados contraditórios da literatura observados após administração de compostos relacionados ao NO.

Com relação a nocicepção, a microinjeção intra-MCP de CRF provocou diminuição do tempo de lambidas na pata tratada com formalina, indicando um efeito antinociceptivo (Figura 5). No entanto, como o presente estudo buscou investigar os efeitos de microinjeções combinadas de CRF com NPLA, NBI ou ASV30, para compreender os mecanismos subjacentes aos efeitos antinociceptivos do CRF, fez-se necessário confirmar a antinocicepção em animais previamente tratados com veículo. Assim, a exemplo do ocorrido no teste de ansiedade, microinjeções combinadas de NPLA + CRF não alteraram o perfil antinociceptivo provocado pelo CRF (veículo + CRF). Camundongos tratados com NPLA + CRF apresentaram tempos de lambidas na pata tratada com formalina semelhantes aos do grupo veículo + CRF (Figura 11). Tais resultados sugerem que o efeito antinociceptivo provocado pela microinjeção intra-MCP de CRF

também independe da síntese de NO.

Diferente do observado com o inibidor específico de NOSn, a administração combinada de NBI 27914 e CRF na MCP resultou em atenuação da resposta antinociceptiva. Os animais desse grupo apresentaram valores de tempo de lambida na pata muito semelhantes aos do grupo controle (veículo + veículo) e, de modo importante, estatisticamente diferentes daqueles do grupo veículo + CRF, caracterizando que os mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pelo CRF são via ativação seletiva de receptores CRF1, uma vez que o tratamento prévio com ASV, antagonista de CRF2, não alterou a antinocicepção induzida pelo CRF na MCP.

Se tomados em conjunto, os resultados apresentados neste capítulo são sugestivos de que os efeitos ansiogênico e antinociceptivo provocados pela injeção intra-MCP de CRF não dependem de NO, um resultado que difere do que ocorre com a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; item 2.3, Capítulo 2), porém decorrem da ativação do receptor CRF1, mas não de CRF2.

Assim, uma vez certificado o envolvimento do CRF, sobretudo via CRF1 na antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade, realizou-se o experimento que teve por objetivo investigar a ação CRFérgica intra-MCP na antinocicepção provocada pela exposição ao LCE aberto. Como resultado, foi verificado que o tratamento intra-MCP com NBI 27914 não foi eficaz em reverter a antinocicepção provocada pela exposição ao LCE aberto. Isso pode se dever ao fato de que a exposição a este tipo de labirinto constitui um estímulo altamente aversivo se comparado LCE

fechado (situação controle), provocando uma resposta intensa de medo a qual recrutaria uma série de neurotransmissores como o próprio CRF, glutamato, serotonina entre outros. A inibição através do antagonismo de somente uma neurotransmissão, que neste caso foi a CRFérgica via NBI 27914, pode não ser suficiente para atuar neste tipo de antinocicepção, uma vez que os outros neurotransmissores continuaram atuantes substituindo o papel do receptor CRF1 que foi bloqueado. Neste sentido a antinocicepção induzida pelo LCE aberto seria um fenômeno mais complexo que conta com a participação de outros transmissores além do CRF e necessita estudos adicionais para maiores esclarecimentos.

CAPÍTULO 4

EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-MCP DE NOC-9 SOBRE OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E NOCICEPÇÃO: AVALIAÇÃO DA MEDIAÇÃO CRFérgica

Estudos anteriores têm demonstrado que o NO é um composto fundamental na exibição de comportamentos defensivos eliciados pela ativação glutamatérgica da MCP (CARVALHO-NETTO et al., 2009; DOMINGUEZ et al., 2004; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Além disso, o NO, por si só, parece estar envolvido no desencadeamento de tais respostas, uma vez que a microinjeção intra-MCP de compostos doadores de NO, como o cloreto de 3-morfolinossilnomina (SIN-1) e a dietilamina do óxido nítrico (DEA/NO), provocam reações de fuga em ratos (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000b; DE OLIVEIRA et al., 2001).

Neste sentido, embora os resultados apresentados no Capítulo 3 apontem para a não participação do NO na ação ansiogênica e antinociceptiva do CRF, ainda se constitui relevante à realização dos experimentos com os doadores de NO na MCP. Isso se deve ao fato de que o aumento na síntese de NO, por mimetizar um estímulo aversivo, poderia facilitar os efeitos antinociceptivos e ansiogênicos do CRF. Tal hipótese tem por base evidências que enfatizam serem as situações aversivas e estressantes capazes de liberar este composto ou intensificar sua transmissão em diversas áreas encefálicas relacionadas às respostas defensivas, como amígdala e possivelmente MCP (ALBECK et al., 1997; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 2000; PLOTSKY; MEANEY, 1993). Em outras palavras, embora os efeitos ansiogênico e antinociceptivo do CRF na MCP não recrutem a síntese de NO na MCP de camundongos, conforme apontado no Capítulo 3 do presente estudo, não está excluída a possibilidade de que o aumento da síntese de NO, induzido pela injeção do seu doador, nesta mesma

estrutura, possa levar a efeitos pró-aversivos via liberação de CRF. Para testar esta hipótese, iniciou-se o experimento com o doador de NO, primeiramente, para identificação dos efeitos deste composto sobre a nocicepção e em comportamentos defensivos em camundongos. Posteriormente, foi testada a ação do tratamento prévio intra-MCP com o NBI 27914 sobre o efeito aversivo e antinociceptivo do doador de NO. Cabe ressaltar que o primeiro doador testado o SIN-1 foi substituído pelo NOC-9, previamente estudado por Braga, Aguiar e Guimarães (2009) sendo o motivo explicado no item 4.2.8, delineamento experimental.

4.1 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo investigar o papel dos receptores CRF1 da MCP nos comportamentos defensivos e na antinocicepção desencadeados pela injeção local do doador de óxido nítrico (NOC-9) em camundongos.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Sujeitos

Semelhante ao descrito no item 2.2.1, Capítulo 2.

4.2.2 Cirurgia e administração de drogas na MCP

Semelhante ao descrito no item 2.2.2, Capítulo 2, com a exceção de que o volume microinjetado na MCP foi de 0,2 µL, por motivos de diluição.

4.2.3 Fármacos

Foram utilizados: NOC-9 (6-(Hidroxi-1-Metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina, dose de 75 nmoles/0,2 μ L) e NBI 27944 [5-cloro-4-(N-ciclopropil)metil-N-propilamo)-2-metil-6-(2,4,6-triclorofenil) aminopiridina] - (2 nmole/0,2 μ L), antagonista de receptores CRF1. As doses foram baseadas em estudos anteriores (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; HAMMACK et al., 2003; JOCHMAN et al., 2005). O NBI foi solubilizado em DMSO (dimetil sulfóxido) e o NOC-9 em solução de TRIS-HCl em pH 10.

4.2.4 Avaliação das reações de defesa

Imediatamente após a injeção intra-MCP dos diferentes compostos ou seus controles (ver detalhes abaixo em *Delineamento Experimental*), os camundongos foram colocados em uma cuba de vidro (30 x 21 x 25 cm, a mesma descrita no teste de formalina) por cinco minutos para a análise dos comportamentos descritos abaixo:

- A) Comportamentos defensivos: tempo de corrida, frequência de saltos e tempo de congelamento.
- B) Exploração do compartimento: tempo de locomoção e frequência de levantamentos.

Todo o teste foi gravado através de um sistema de câmera-TV-DVD e a análise comportamental foi feita analisando-se a mídia de DVD por um observador devidamente treinado para verificação e registro dos comportamentos. Os seguintes comportamentos foram registrados:

- Levantamentos (frequência): Caracterizado pelo número de vezes que o camundongo permanece na postura bípede, apoiando-se ou não nas paredes da arena com as patas dianteiras.
- Saltos (frequência): Caracterizados por pulos verticais ou horizontais nos quais o camundongo tira as quatro patas do solo.
- Corrida (duração): Caracterizada pelo tempo de trote (corrida mantendo o padrão de andar) ou galope (rápida corrida alternando entre as patas anteriores e posteriores).
- Congelamento (duração): Caracterizado pela ausência total de movimento exceto o de respiração, enquanto o animal assume uma postura tensa.
- Locomoção (duração): registro dos períodos em que o animal andava no aparato.

4.2.5 Teste de Nocicepção

A nocicepção foi avaliada em grupos de animais diferentes daqueles utilizados para avaliação das reações de defesa, através do teste da formalina.

4.2.5.1 Teste da formalina

Semelhante ao descrito no item 3.2.5.1, Capítulo 3.

4.2.6 Histologia

Semelhante ao descrito no item 2.2.5, Capítulo 2.

4.2.7 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Levene e, quando necessário, transformados em raiz quadrada, raiz cúbica ou LOG de $n + 1$ na base 10. Na sequência, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes (fator 1: pré-tratamento na MCP; fator 2: tratamento na MCP, melhor detalhado posteriormente). Finalmente, os dados foram submetidos à análise post hoc de Duncan. Nos casos em que mesmo após as transformações Levene persistiu significativa, que foram os comportamentos de corrida, saltos e congelamento, analisados no experimento 4.B, mostrados na figura 13, os mesmos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, análise post hoc de Dunn. Além disso, o experimento 4.A, que consistiu de somente um tratamento na MCP, as amostras foram submetidas ao Teste t de Student ou não paramétrico de Mann-Whitney, quando o teste de Levene indicava não homogeneidade. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

4.2.8 Delineamento Experimental

4.2.8.1 Experimento 4.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NOC-9 na MCP sobre os comportamentos defensivos e nocicepção

Embora seja conhecida a ação aversiva do NOC-9 na MCP de ratos (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009), faz-se necessário caracterizá-lo como aversivo na MCP de camundongos para, posteriormente, avaliar se essa ação possui sensibilidade ao antagonista de CRF1. Além disso, faz-se relevante avaliar os efeitos da injeção de NOC-9 na MCP sobre a nocicepção de camundongos. Cabe ressaltar que o primeiro composto doador de NO escolhido para a realização do presente estudo foi o SIN-1 (cloreto de amino-3-morfolinil-1,2,3-oxadiazólio). Contudo, injeções intra-MCP de SIN-1 provocaram convulsões seguidas de óbito em 40% dos camundongos testados. Tais mortes podem ter sido decorrentes do potencial excitotóxico do SIN-1, levando a formação de peroxinitritos, elementos altamente prejudiciais à membrana neuronal. Diante disso e em acordo com sugestão apresentada pela assessoria da Fapesp ao nosso relatório, passamos a utilizar o NOC-9, o qual tem menor potencial de formar peroxinitrito (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009).

Comportamentos defensivos: os animais receberam microinjeção intra-MCP de NOC-9 (0 ou 75 nmoles/0,2 μ L) e, em seguida, foram individualmente colocados na cuba de vidro por cinco minutos para o registro dos comportamentos descritos no item 4.3.4.

Nocicepção: vinte e cinco minutos após a injeção de formalina, os animais receberam injeção intra-MCP de NOC-9 (0 ou 75 nmoles/0,2 µL) e, em seguida, foram individualmente colocados na cuba de vidro para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

4.2.8.2 Experimento 4.B: Avaliação dos efeitos do bloqueio de receptores CRF1 com injeção intra-MCP de NBI 27914 (antagonista CRF1) sobre o efeito aversivo do NOC-9 na MCP

Comportamentos defensivos: os animais receberam uma primeira microinjeção intra-MCP de NBI 27914 (pré-tratamento; 0 ou 2 nmoles/0,2 µL) e, após 10 minutos, foram tratados com uma segunda microinjeção intra-MCP de NOC-9 (tratamento; 0 ou 75 nmoles/0,2 µL). Em seguida, cada camundongo foi colocado na cuba de vidro por cinco minutos para o registro dos comportamentos descritos no item 4.3.4.

Nocicepção: quinze minutos após a injeção de formalina, os animais receberam microinjeção intra-MCP de NBI 27914 (pré-tratamento; 0 ou 2 nmoles/0,2 µL) e, após dez minutos, foram tratados com injeção intra-MCP de NOC-9 (0 ou 75 nmoles/0,2 µL). Em seguida, cada camundongo foi colocado na cuba de vidro para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina (10 minutos de registro).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Experimento 4.A: Avaliação do efeito da microinjeção de NOC-9 na MCP sobre os comportamentos defensivos e nocicepção

A Tabela 4 mostra os efeitos da injeção de NOC-9 (0 ou 75 nmol/0,2 μ l) intra-MCP sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina a 2,5% na pata bem como sobre os comportamentos de camundongos não submetidos ao teste nociceptivo.

No grupo nocicepção, os animais que receberam NOC-9 apresentaram redução no tempo gasto lambendo a pata injetada com formalina 2.5% ($U= 0$; $Z= 3,36$; $p< 0,05$).

Para os animais que não receberam a injeção de formalina, foi observado que os camundongos tratados com o NOC-9 expressaram comportamentos defensivos quando comparados com o grupo controle (Corrida: $U= 18$; $Z= -3,51$; $p< 0,05$; Saltos: $U= 42$; $Z= -2,34$; $p< 0,05$; Congelamento: $U= 24$; $Z= -3,22$; $p< 0,05$). Ainda, os animais que receberam NOC-9 apresentaram reduzidos, o tempo gasto andando no aparato (locomoção) e a frequência com que realizavam o comportamento de levantar (levantamentos), demonstrando diminuição da exploração (Locomoção: $t= 4,1$; $p< 0,05$; Levantamentos: $t= 4,0$; $p< 0,05$).

Tabela 4 - Efeito da injeção intra-MCP de veículo (TRIS) ou NOC-9 na resposta nociceptiva [tempo de lambida na pata (em seg)], no tempo de corrida, congelamento e locomoção (em seg) e na frequência de saltos e levantamentos (N = 12-16 por grupo).

Comportamento	Veículo	NOC-9
Nocicepção (seg)	84,5 ± 13,1	12,5 ± 4,8 *
Corrida	0	9,5 ± 2,4 *
Saltos	0	3 ± 1 *
Congelamento	0	53,5 ± 20,0 *
Locomoção	101,9 ± 8,9	38,3 ± 11,9 *
Levantamentos	46 ± 6	16 ± 5 *

*p< 0,05 vs veículo.

4.3.2 Experimento 4.B: Avaliação dos efeitos do bloqueio de receptores CRF1 com injeção intra-MCP de NBI 27914 (antagonista CRF1) sobre o efeito aversivo do NOC-9 na MCP.

A Figura 13 mostra o efeito da microinjeção intra-MCP de NOC-9 sobre os diferentes comportamentos defensivos e nocicepção, e exploratórios exibidos por animais previamente tratados com NBI 27914 no mesmo sítio. Com relação ao comportamento de corrida, a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos ($H = 23,09$; $p < 0,05$). Comparações posteriores (teste de Dunn) mostraram que o grupo tratado com NOC-9 (veículo + NOC-9) apresentou tempo de corrida significativamente maior que o grupo

controle (veículo + veículo). O pré-tratamento com NBI (NBI + NOC-9) reduziu a resposta para valores significativamente menores que o grupo veículo + NOC-9, sem, entretanto, diferir do grupo controle. Nenhum outro tratamento alterou significativamente o tempo de corrida.

Com relação ao comportamento de saltos, a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos ($H = 20,10$; $p < 0,05$). Comparações posteriores (teste de Dunn) mostraram que o grupo tratado com NOC-9 (veículo + NOC-9) apresentou frequência de saltos significativamente maior que o grupo controle (veículo + veículo). O pré-tratamento com NBI (NBI + NOC-9) reduziu a resposta para valores significativamente menores que o grupo veículo + NOC-9, sem, entretanto, diferir do grupo controle. Nenhum outro tratamento alterou significativamente a frequência de saltos.

Com relação ao comportamento de congelamento, a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos ($H = 22,06$; $p < 0,05$). Comparações posteriores (teste de Dunn) mostraram que o grupo tratado com NOC-9 (veículo + NOC-9) apresentou períodos em congelamento significativamente maiores que o grupo controle (veículo + veículo). O pré-tratamento com NBI (NBI + NOC-9) não alterou estatisticamente a resposta de congelamento se comparada o grupo veículo + NOC-9. Entretanto, este grupo (NBI + NOC-9) também não foi diferente do controle, sinalizando um indício de efeito. Nenhum outro tratamento alterou significativamente tempo de congelamento.

Tratando-se da nocicepção, ANOVA de dois fatores revelou diferenças para o fator tratamento ($F_{1,28} = 10,6$; $p < 0,05$) e interação entre os fatores ($F_{1,28} = 5,12$;

$p < 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que o NOC-9 produziu antinocicepção (veículo + NOC-9 x veículo + veículo). O pré-tratamento com NBI (NBI + NOC-9) preveniu a resposta antinociceptiva eliciada pelo NOC-9.

Com relação ao comportamento locomotor, a ANOVA de dois fatores revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,32} = 8,29$; $p < 0,05$), bem como para o fator tratamento ($F_{1,32} = 11,76$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre estes dois fatores ($F_{1,32} = 0,95$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que o grupo tratado com NOC-9 (veículo + NOC-9) apresentou menores períodos de locomoção comparados ao grupo controle (veículo + veículo). O pré-tratamento com NBI (NBI + NOC-9) reduziu a resposta hipolocomotora para valores significativamente diferentes do grupo veículo + NOC-9, sem, entretanto, diferir do grupo controle. Nenhum outro tratamento alterou significativamente a frequência de saltos.

Com relação ao comportamento de levantamento, a ANOVA de dois fatores não revelou diferenças para o fator pré-tratamento ($F_{1,32} = 0,26$; $p > 0,05$), mas revelou diferenças para o fator tratamento ($F_{1,32} = 6,35$; $p < 0,05$), sem indicar interação entre estes dois fatores ($F_{1,32} = 0,006$; $p > 0,05$). Comparações posteriores (Teste de Duncan) revelaram que ambos os grupos tratados com NOC-9 (veículo + NOC-9 e NBI + NOC-9) apresentaram menores frequências de levantamentos comparados ao controle, denotando que o efeito do NOC-9 sobre o comportamento de levantamento persistiu mesmo com o pré-tratamento com o NBI.

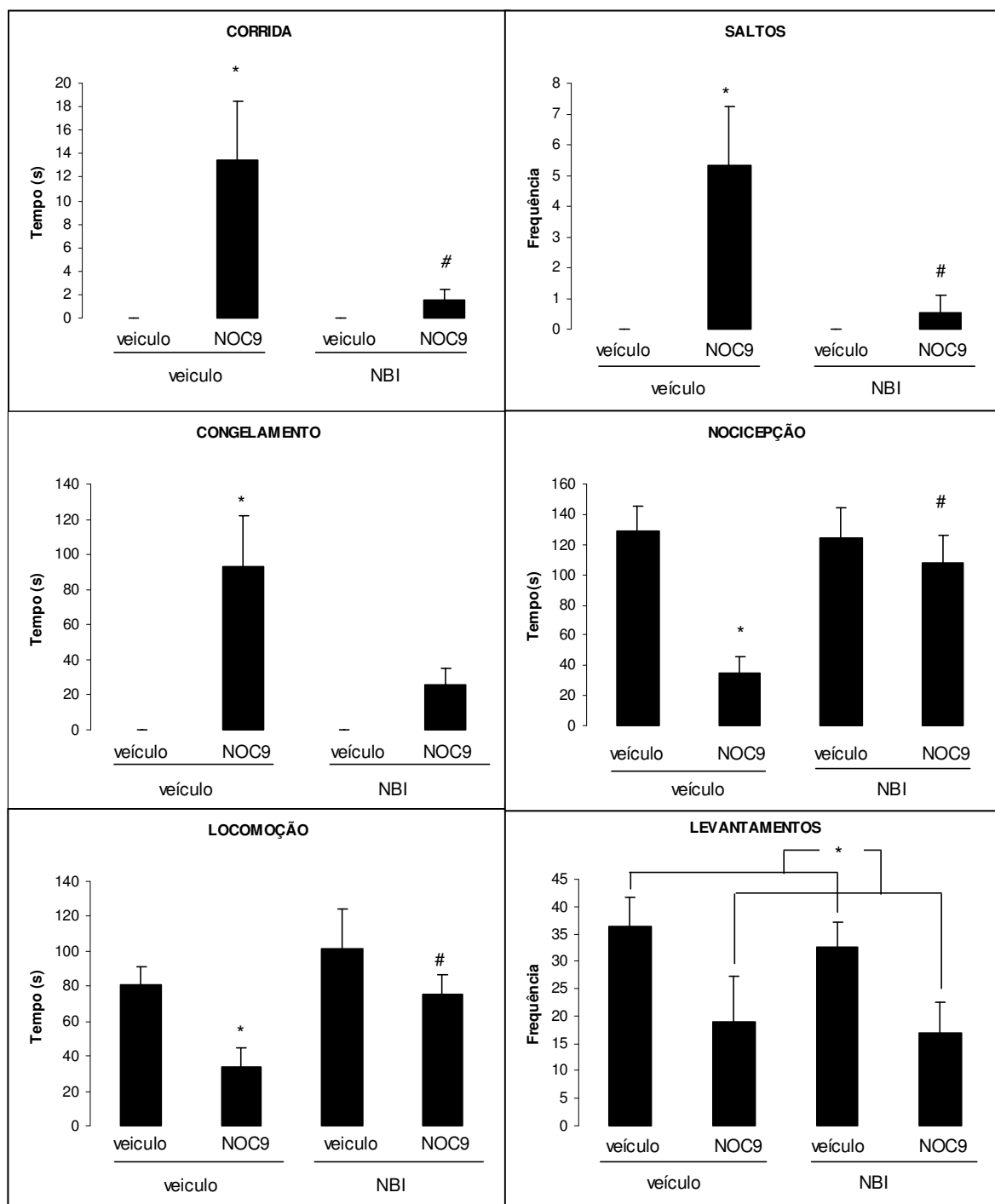


Figura 13: Efeito da microinjeção de NOC-9 na MCP sobre diferentes comportamentos em camundongos pré-tratados com NBI 27914. N= 8-11 animais por grupo. * p < 0,05 comparado com grupo controle e # p < 0,05 comparado com grupo veículo + NOC9.

4.4 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados neste capítulo, a microinjeção intra-MCP de NOC-9 foi eficaz em induzir comportamentos de defesa tais como corrida, saltos e congelamento, além de antinocicepção e diminuir a exploração do aparato evidenciado pela redução na frequência de levantamentos e de locomoção. A queda no comportamento exploratório pode ser decorrente do aumento do tempo de congelamento. No entanto, este perfil comportamental exprime a situação aversiva que o animal está demonstrando sofrer como consequência ao tratamento intra-MCP desse doador de óxido nítrico. O efeito aversivo da injeção do NOC-9 já foi anteriormente demonstrado em ratos por Braga, Aguiar e Guimarães (2009), os quais relacionaram expressão de respostas defensivas e diminuição da distância percorrida pelos animais que receberam esse doador de NO na MCP dorsolateral. Além disso, esses autores também sugeriram que tal efeito pode ser mediado pela formação de GMPc, uma vez que foi observada reversão da resposta pelo prévio tratamento com ODQ, um inibidor da sua enzima de síntese, a guanilato ciclase.

De modo semelhante ao demonstrado por Braga, Aguiar e Guimarães (2009), neste trabalho foi observado que a resposta comportamental eliciada pelo NOC-9 na MCP de camundongos consistiu de início imediato à sua microinjeção, produzindo a exibição de comportamentos explosivos (corrida e saltos). Os efeitos comportamentais desencadeados pelo NOC-9 mostram-se com menor duração que o observado com outro tipo de doador de NO, o SIN-1, o qual provoca

reações de início tardio (alguns minutos após microinjeção), contudo de longa duração (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000b; MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004). Essa diferença no decurso temporal da resposta produzida pelas duas moléculas doadoras de NO pode ser reflexo da cinética de liberação de NO promovida por esses doadores. Enquanto o NOC-9 promove uma liberação imediata de NO em pH fisiológico, com meia-vida aproximada de três minutos (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; SECCIA et al., 1996), o SIN-1 a produz de modo contínuo e lento podendo durar até dez minutos (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; GOSS; HOGG; KALYANARAMAN; 1997). Entretanto, conforme descrito em estudos anteriores (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; DEL CARLO JR; LOESER, 2002), o SIN-1 possui a característica de produzir peroxinitrito, uma molécula altamente reativa capaz de induzir lesão e morte celular por estresse oxidativo e lise da membrana plasmática. Talvez tenha sido esta característica do SIN-1 a causa da dificuldade de trabalho com este composto, verificada na tentativa de seu uso no presente estudo. Sucintamente, a injeção intra-MCP de SIN-1 provocou convulsões seguidas de óbito em 40% dos camundongos testados. Devido a esse perfil tóxico do SIN-1, optamos por substituí-lo pelo NOC-9, seguindo também sugestão da assessoria da Fapesp ao nosso relatório como bolsista.

A segunda parte do presente estudo investigou o efeito da injeção do antagonista CRF1, NBI 27914, na aversão provocada pelo NOC-9 em camundongos. Neste sentido, um fato bastante curioso que este trabalho demonstrou foi que embora o NO não tenha se comportado como elemento chave

na expressão das respostas mediadas pelo CRF, conforme apresentado no terceiro capítulo, a via contrária parece ser diferente, ou seja, o CRF demonstrou ser importante na expressão das respostas comportamentais defensivas e da antinocicepção produzidas pelo aumento do tônus nitrérgico na MCP.

Deste modo, o efeito aversivo (corrida, saltos e congelamento) eliciado pelo aumento do tônus nitrérgico na MCP, conferido pela microinjeção de um composto doador de NO, o NOC-9, foi atenuado pelo prévio antagonismo de receptores CRFérgicos subtipo CRF1, através do emprego do NBI 27914.

Assim, é possível sugerir que a aversão provocada pelo NO pode ser um elemento que contribui para a liberação de CRF e, portanto, a intensificação de sua transmissão na MCP. Entretanto, quando seu receptor está bloqueado, pelo menos o subtipo CRF1, o CRF liberado é impossibilitado de se ligar a este, impedindo sua ação que, como discutido acima, consiste, entre outras respostas, na ativação neuronal. Esta hipótese corrobora estudos anteriores destacando a liberação de CRF por facilitação da produção de NO em outras estruturas pertencentes ao sistema aversivo (RABER; KOOB; BLOOM, 1995). Esses autores demonstraram haver liberação de CRF na amígdala e hipotálamo após administração de nitroprussiato, um doador de NO. Além disso, estes achados, juntamente com os de Karanth, Lyson e McCann (1993), relacionaram o NO como o responsável pela liberação de CRF induzida por interleucina 2 e pelo neurotransmissor acetilcolina nestes núcleos, uma vez que o tratamento prévio com o inibidor da síntese de NO, o LNMA (N-metil-L-arginina), foi eficaz em reverter tais efeitos. O estudo de Raber, Koob e Bloom (1995) descreveu ainda

que a concentração basal de CRF não foi afetada após o tratamento com o LNMA, indicando que o NO parece não mediar a liberação de CRF em tais condições, efeito também observado no estudo de Costa et al. (1993).

Além destes trabalhos, Lee, Kim e Rivier (1999) demonstraram que a injeção intracerebroventricular de SIN-1 foi capaz de induzir a elevação nos índices plasmáticos do hormônio adrenocoticotrófico (ACTH), sendo esta resposta abolida pelo tratamento prévio com anticorpo anti-CRF, peptídeo precursor do ACTH. Ademais, o SIN-1 também promoveu a indução da transcrição gênica de CRF, além de também elevar os níveis de RNA mensageiro para o receptor CRF1 e para o NGFI-B. Este último trata-se de um gene de expressão imediata, indicador do aumento da atividade neuronal. Este fator estimula a transcrição gênica através de elementos responsivos ao NGFI-B, compartilhando sequências-consenso na região promotora com o gene indutor da produção de CRF e esteróides (CHAN et al., 1993, LEE; KIM; RIVIER, 1999; WILSON et al., 1991), em outras palavras, o NGFI-B é utilizado como um marcador de atividade de neurônios envolvidos com o CRF. Com base nesses trabalhos, é plausível sugerir que a liberação de CRF pode ser induzida pelo NO em diferentes sítios encefálicos, incluindo-se aqui a MCP. Embora atraente, esta hipótese necessita ser estudada em novos experimentos voltados a explicar a ausência de efeito do doador de NO intra-MCP nos comportamentos defensivos, tal como observado no presente estudo em animais pré-tratados com o antagonista CRFérgico nesta mesma estrutura mesencefálica .

O modo de ação pelo qual o NO atua favorecendo a liberação de CRF

permanece incerto e, portanto, constitui um campo em potencial de pesquisa. Entretanto, Raber, Koob e Bloom (1995) sugerem que este fenômeno pode ser decorrente do efeito excitatório direto do NO sobre os neurônios CRFérgicos ou, de modo indireto, através da ação nas células da glia. Esta última hipótese é sustentada no estudo de Nedergaard (1994), que demonstrou ser o NO produzido nestas células capaz de induzir influxo de cálcio, levando a exocitose de neurotransmissores em astrócitos e neurônios vizinhos. Se assim, os neurônios CRFérgicos poderiam ser modulados através de conexões intercelulares com gliócitos, que afetariam a sua excitabilidade.

Um resultado curioso e complexo, observado no terceiro capítulo e nos estudos de Martins, Marras e Guimarães (1997), é que a estimulação CRFérgica foi eficaz em induzir efeito ansiogênico no LCE sem, no entanto, promover reações explosivas como aquelas promovidas pela microinjeção do NOC-9 (presente capítulo). Entretanto, o CRF parece participar de tais reações induzidas pelo doador de NO, uma vez que o bloqueio do receptor CRF1, atenuou o efeito do doador na MCP. Uma tentativa de esclarecer esta situação emerge da possibilidade de participação do glutamato neste complexo circuito. Como demonstrado no Capítulo 2, a microinjeção intra-MCP de baixas doses de NMDA, agonista glutamatérgico de receptores NMDA, provocou efeito ansiogênico no LCE, sem levar a comportamentos explosivos (saltos e corrida), os quais são observados quando este composto é administrado em doses mais elevadas (BANDLER, 1988; BITENCOURT et al., 2004; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). O doador de NO provocou estas reações explosivas neste trabalho e

também em estudos anteriores, os quais indicaram uma participação glutamatérgica, uma vez que a microinjeção de um antagonista de receptores NMDA, o AP-7, preveniu o efeito do doador (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004). Além disso, estudos anteriores mostraram que doadores de NO são eficazes indutores da liberação de ambos os transmissores (glutamato e CRF) em outras estruturas relacionadas às respostas defensivas como amígdala e hipotálamo (PRAST et al., 1996; RABER; KOOB; BLOOM, 1995). Este último fato, somado aos achados mostrando que o CRF também possui propriedade de induzir liberação de glutamato sob condições de estresse (SKORZEWSKA et al., 2009), é sugestivo de que o CRF possa colaborar na liberação de glutamato induzida pelo doador de NO, e que, juntamente, ambos CRF e NO produziram liberação de excessivas quantidades de glutamato, provocando reações defensivas explosivas. Em se tratando da injeção pura do peptídeo CRF, é possível que haja indução da liberação de glutamato, como descreve o estudo de Skorzewska e colaboradores (2009). Entretanto, tal liberação promovida somente pelo CRF provavelmente não é tão pronunciada como a que seria desencadeada quando em conjunto com o doador. Se assim, a microinjeção somente de CRF provocaria efeito ansiogênico, como verificado no Capítulo 3, possivelmente com colaboração de pequenas quantidades de glutamato que foi liberado, resultando em ansiogênese, porém em quantidades insuficientes para induzir comportamentos defensivos explosivos. Embora atraente, essa assunção necessita ser investigada em experimentos futuros.

CAPÍTULO 5

COMPORTAMENTO AGRESSIVO EM CAMUNDONGOS: ESTUDO DA MEDIAÇÃO DO RECEPTOR CRF2 NO NÚCLEO DORSAL DA RAFE ¹

Os animais, bem como a espécie humana, são sempre confrontados com situações que geram conflito, desafio ou mesmo dificuldades à vida cotidiana. Desde a busca do alimento até mesmo a luta pela aquisição e manutenção do espaço e território adquiridos, como no caso dos animais selvagens, muitas vezes exige imposição, dominância ou ainda confronto corporal, o que não é raro em muitas espécies como os roedores. Desta forma, os confrontos dos animais com situações que induzem medo e ansiedade resultam em uma série de respostas comportamentais defensivas como, por exemplo, luta, fuga, imobilidade, vocalização e outros comportamentos, bem como na ativação neurovegetativa expressa por eventos como taquicardia, hipertensão, defecação e outros. Tais reações são geralmente acompanhadas de inibição da resposta a estímulos nociceptivos (antinocicepção), (KELLY, 1986; RODGERS, 1995). Os mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade têm sido alvo de muitas investigações, levando para tal fim o emprego de modelos animais originalmente desenvolvidos para o estudo desses estados emocionais.

Parte destas respostas descritas acima foi alvo das investigações arroladas nos capítulos anteriores do presente estudo. Assim, este capítulo tratará de outro componente que também pode estar relacionado à ansiedade, qual seja, o

¹ Experimentos realizados no Departamento de Psicofarmacologia – Tufts University, Medford, Massachusetts, EUA; sob supervisão do Professor Dr. Klaus Miczek.

comportamento agressivo conforme apresentado em diversos trabalhos que objetivaram estabelecer tal relação (BEIDERBECK; NEWMAN; VEENEMA, 2007; FERREIRA et al., 2002; NEWMAN; VEENEMA; BEIDERBECK, 2010; NYBERG; VEKOVISCHEVA; SANDNABBA, 2003). Esta relação ansiedade x agressão, embora seja um tópico importante em neurobiologia, ainda é vasto campo de pesquisa e necessita de maiores esclarecimentos, tornando-se, por esta causa, alvo de estudo e motivo da realização do estágio no Departamento de Psicofarmacologia da Tufts University, Medford, Massachsets, EUA.

5.1 COMPORTAMENTO AGRESSIVO E ANSIEDADE

Para um melhor entendimento do comportamento agressivo, primeiramente faz-se necessário diferenciar o tipo de agressividade que determinada situação elicia. Segundo Blanchard, Wall e Blanchard (2003), as agressões defensiva e ofensiva são comportamentos distintos. Elas podem ser diferenciadas em aspectos comportamentais característicos exibidos por cada tipo de agressão, como a região preferencial atacada no corpo do oponente. Por exemplo, a agressão ofensiva se concentra em ataques nos flancos e dorso, enquanto a defensiva se caracteriza por ataques difusos no focinho do oponente (BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003).

Sucintamente, o comportamento agressivo defensivo é parte do repertório de respostas frente a uma situação aversiva, que pode ser recrutado quando o animal está sob ameaça proximal, da qual não é mais possível fugir, como, por exemplo, na reação presa-predador. Esta agressão defensiva é eliciada em

situações de medo e ansiedade, com o objetivo de preservação da vida e integridade corporal, possuindo raízes na evolução das espécies e pode ser evidenciada em alguns modelos animais como, por exemplo, o MTDB (mouse defense test battery – GRIEBEL; BLANCHARD; BLANCHARD, 1996). Por outro lado, a agressão ofensiva mostra-se de forma impulsiva, como resposta a um desafio ou situação desafiadora. Por exemplo, é apresentada em situações em que um novo sujeito (chamado de intruso) adentra o ambiente do residente. Assim, existem substâncias, como a fluprazina e eltoprazina, com propriedades ansiogênicas no LCE (RODGERS et al., 1992), que reduzem seletivamente a agressão ofensiva, sem afetar a defensiva (BLANCHARD et al., 1985). Além disso, estudos anteriores mostraram que situações aversivas que eliciam respostas induzidas pelo medo, também são eficazes em reduzir o comportamento agressivo ofensivo, mas não o ataque defensivo, demonstrando tratar de dois tipos distintos de comportamento agressivo com motivações e causas diferentes (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BLANCHARD et al., 1980; BLANCHARD; HORI; BLANCHARD, 1988). Com base nestes achados a agressão defensiva caracteriza-se por uma situação extrema e inescapável de medo onde o animal percebe risco de vida, enquanto a ofensiva é motivada por um desafio e/ou tentativa de conquistas como territorial, fêmea para acasalamento e outros. Neste caso, o medo e ansiedade trariam prejuízos aos animais a saírem para realizar tais conquistas diminuindo a ofensividade.

Estes achados, somados ao fato que ansiolíticos clássicos, como os derivados benzodiazepínicos, também exercem efeito no comportamento agressivo ofensivo, revelam uma correlação entre este tipo de agressão e

ansiedade. Agressão e ansiedade são estados emocionais que estão associados com uma série de desordens psiquiátricas, e estudos farmacológicos e comportamentais têm sugerido uma relação entre essas emoções em modelos animais (FERRARI et al., 1998; MICZEK, 1974; MICZEK et al., 1995). Entretanto, esta relação entre ansiedade e agressão ofensiva ainda não é bem entendida, de modo que existem trabalhos apontando para direções distintas.

Por um lado, uma expressiva correlação negativa foi encontrada entre o número de ataques realizados por camundongos machos a um oponente no teste intruso-residente, e o tempo gasto no compartimento claro do teste claro-escuro, um clássico modelo animal de ansiedade. Sucintamente, os animais que mais exibiam comportamento agressivo gastavam menos tempo no compartimento claro, exibindo também maior grau de ansiedade. Este achado propõe que os animais mais ofensivos são também os mais ansiosos (CLEMENT; CHAPOUTHIER, 1998; GUILLOT; CHAPOUTHIER, 1996). Ainda nesta direção, Palanza e colaboradores (1996) encontraram que o clordiazepóxido, um ansiolítico benzodiazepínico, foi eficaz em reduzir os ataques de camundongos lactantes contra intrusos.

Por outro lado, existe uma série de trabalhos nos quais foi demonstrado que baixas doses do mesmo composto, clordiazepóxido, foram eficazes em intensificar o comportamento agressivo em diferentes testes de agressão, como no teste intruso-residente e na agressão exibida por fêmeas lactantes em ratos e camundongos (MICZEK, 1974; MICZEK; O'DONNELL, 1980; MOS; OLIVIER; VAN OORSCHOT, 1987). Tais resultados foram corroborados no estudo de Ferreira e

colaboradores (2002), no qual foi demonstrado que fêmeas lactantes exibiram diminuição da ansiedade no LCE e maiores níveis de agressão quando comparadas com as fêmeas não lactantes. Como apontado acima, os efeitos antiagressivo (BLANCHARD et al., 1985) e ansiogênico (RODGERS et al., 1992) dos compostos fluprazina e eltoprazina parecem contribuir para essa interpretação. Ainda neste sentido, podemos citar os estudos de Beiderbeck, Newman e Veenema (2007), os quais encontraram que linhagens de Ratos Wistar mais e menos ansiosas diferenciavam-se nos testes de agressão, demonstrando que os animais da linhagem que explorava mais os braços abertos do LCE eram também os que apresentaram maior nível de agressividade quando comparados aos animais mais ansiosos. Ainda neste sentido, linhagens de camundongos *Swiss* albino geneticamente diferenciadas em agressivos e não agressivos desempenharam papéis concorrentes em testes de ansiedade. Os animais agressivos foram menos ansiosos no teste do LCE e Claro-escuro que os menos agressivos, enquanto camundongos não selecionados, usados como controle, demonstraram escores intermediários (NYBERG; VEKOVISCHEVA; SANDNABBA, 2003).

Tomados em conjunto, esses achados sugerem uma correlação negativa entre ansiedade e agressão, ou seja, um elevado nível de comportamento agressivo ofensivo pode requerer um baixo nível de ansiedade. Neste sentido, Nyberg, Vekovischeva e Sandnabba (2003), enfatizaram haver diferentes estratégias de confronto entre as linhagens mais e menos agressivas. A estratégia adotada quando é necessário interagir com um novo parceiro ou

território pode ser diferenciada com base no grau de ansiedade. Assim, machos selecionados geneticamente como menos agressivos tenderiam a exibir comportamentos passivos e de esquiva voltados a proteger e evitar ataques de um oponente não familiar. Em contrapartida, machos mais agressivos, selecionados geneticamente, adotariam outra estratégia comportamental em que prevalece a exibição de uma postura ofensiva onde atacar primeiro traria resultados mais relevantes para impor dominância, mesmo se apresentada em um novo ambiente.

Em 1997, Sandnabba realizou um estudo com estes camundongos selecionados geneticamente no qual estes animais foram colocados em grandes viveiros experimentais separadamente, como simulação da vida selvagem, permitindo que fossem formados territórios individuais. Foi observado que os machos não agressivos preferiam permanecer em suas regiões por quase todo tempo, provavelmente em busca de segurança e abrigo, evitando encontros e combates co-específicos. Entretanto, os machos agressivos cruzavam o território e iniciavam combates entre eles de modo frequente e exibiam alto índice de exploração, parecendo estarem seguros, mesmo em novos ambientes. Isto pode ser interpretado como baixo nível de ansiedade em machos agressivos. Contudo, um certo nível de ansiedade na vida selvagem faz-se interessante devido ao fato de que o elevado grau de comportamento exploratório, sem cuidado e sem avaliação do risco potencial, pode constituir em risco de vida para o animal. Do ponto de vista evolutivo, a seleção natural pode favorecer animais mais ansiosos quando expostos a ambientes altamente perigosos, pois não sairão das áreas seguras. Por outro lado, em ambientes menos hostis, machos dominantes,

exploradores e agressivos têm maior índice de sobrevivência e sucesso em encontrar comida, domínio territorial e comportamento sexual, perpetuando a espécie. Neste sentido, alguns autores propuseram que doses ansiolíticas de benzodiazepínicos intensificam o comportamento agressivo devido a uma ação de desinibição comportamental, cabendo ressaltar que se a dose for elevada não haverá aumento da agressividade podendo inclusive provocar supressão devido ao efeito sedativo (MICZEK, 1974; MICZEK; O'DONNELL, 1980; MOS; OLIVIER; VAN OORSCHOT, 1987)

Por isso, com base nesta relação ainda não claramente elucidada, haja vista a dualidade observada nos resultados até então publicados com respeito à interação *ansiedade x comportamento agressivo*, este trabalho foi realizado. Este estudo avaliou o comportamento agressivo de camundongos e o possível papel do Fator de Liberação de Corticotrofina (CRF).

5.2 COMPORTAMENTO AGRESSIVO E CRF

O fator de liberação de corticotrofina (CRF) é um peptídeo de 41 resíduos de aminoácidos com papel fundamental na gênese das respostas ao estresse. Além da sua função clássica de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) nestas situações (VALE et al., 1981), um grande corpo de evidências tem destacado ser de elevada importância sua ação extra-hipotalâmica, atuando como neurotransmissor em respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse. Neste sentido, infusões intracerebroventricular ou intranúcleos encefálicos específicos deste peptídeo induzem uma série de respostas relacionadas ao estresse,

incluindo alterações na atividade locomotora e comportamento de autolimpeza, indução de comportamentos relacionados à ansiedade e alterações na ingestão alimentar. Tais respostas podem ser abolidas ou atenuadas pela infusão de antagonistas de CRF (COSTE et al., 2006; KOOB; HEINRICHS, 1999; STECKLER; HOLSBOER, 1999). O desequilíbrio entre as vias relacionadas ao CRF e urocortinas (1, 2 e 3, agonistas CRFérgicos) tem sido implicado na patogenia de síndromes psiquiátricas em humanos (ARBORELIUS et al., 1999; GOLD; CHROUSOS, 1999; GOLD et al., 1996). Ainda no âmbito do estresse, o comportamento agressivo envolve padrões comportamentais adicionais eliciados pelo estresse (BLANCHARD; BLANCHARD, 1977; FARROKHI et al., 2004). Uma fonte geradora de estresse é a ameaça territorial que pode colocar em desafio a dominância e supremacia, fato este que pode eliciar a agressão ofensiva. Contudo, a presença de predadores ou ataques co-específicos intensivos constituem outro tipo de ameaça, desta vez à vida e à integridade física, sendo indutores de agressão defensiva (BLANCHARD et al., 2003). Embora pouco mais estudado nos comportamentos relacionados à ansiedade, o papel do CRF é controverso e ainda não está bem elucidado no que diz respeito ao comportamento agressivo.

Por um lado, existem relatos prévios em que a injeção intracerebroventricular de CRF reduz o comportamento agressivo em camundongos (MELE et al., 1987). Além disso, a expressão de outros modelos como a agressão materna em camundongos também foi diminuída pelo tratamento com CRF (GAMMIE et al., 2004). Entretanto, por outro lado, existem trabalhos, como o de Habib e colaboradores (2000), que mostraram que a

antalarmina, um antagonista de receptores CRF1, tendeu a reduzir a agressividade em macacos rhesus, e o de Farrokhi e colaboradores (2004), que encontraram diminuição do comportamento agressivo em hamsters, após o tratamento com SSR125543A, um antagonista CRF1.

Com base nestes resultados discrepantes e de complexa interpretação do papel do CRF1 no comportamento agressivo, os experimentos foram direcionados na pesquisa da atuação do receptor CRF2, ainda pouco estudado, nestas respostas. Pelo fato do núcleo dorsal da rafe (NDR) ser uma das poucas estruturas que possuem alta expressão desses receptores (AMAT et al., 2004; CHALMERS; LOVENBERG; DE SOUZA, 1995), este núcleo se tornou um forte candidato a ser o sitio da ação CRFérgica no comportamento agressivo e levou-nos a levantar a hipótese do envolvimento desses receptores nestes comportamentos.

Além disso, escolha do CRF teve como base os resultados de Martins, Marras e Guimarães (1997), bem como aqueles apresentados nos capítulos anteriores deste trabalho, nos quais foi demonstrado seu efeito ansiogênico quando microinjetado na matéria cinzenta periaquedutal de ratos e camundongos. Assim, o estudo da ação do CRF no comportamento agressivo poderia ajudar no entendimento da possível interação ansiedade x comportamento agressivo em roedores.

5.3 OBJETIVO

Investigar a participação da transmissão CRFérgica através do receptor CRF2 no núcleo dorsal da rafe, na agressão ofensiva em camundongos.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1 Sujeitos

Camundongos Suíços albinos machos da linhagem CFW (25-35g), provenientes do biotério Charles River Laboratories Co., USA, foram acomodados em pares com uma fêmea em caixas de polycarbonato transparente (28 x 17 x 12 cm), com assoalho coberto com maravalha. Os animais residentes tiveram livre acesso à ração, enquanto a água era fornecida durante 4 horas por dia. O restante do dia, os animais eram privados para realização do protocolo de auto-administração. Os animais intrusos foram mantidos em caixas maiores (48 x 26 x 16 cm), acomodados em 6-10 sujeitos por caixa, com livre acesso ao alimento e à água. Todos animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade (30-40 %) e ciclo invertido de luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 19:00).

5.4.2 Autoadministração de álcool

O álcool foi utilizado como ferramenta experimental para intensificar a agressão. Um painel de alumínio, acoplado dentro da caixa do residente, possui, em cada lado, uma luz como pista posicionada acima de um orifício, no qual o animal pode emitir o comportamento operante de tocar o focinho, ocasionando a ativação de uma fotocélula no fundo desse orifício (do inglês: nose-poke). A ativação da fotocélula por cinco vezes (razão fixa 5) resultava na liberação de uma

pequena quantidade (50 microlitros) de água ou álcool 6% diluído em água, através de um dispositivo acoplado a uma seringa. Para a aquisição do comportamento operante, os animais residentes eram privados de água 20 horas por dia, exceto nos finais de semana quando não era realizada a sessão. A quantidade de água/álcool que o animal ingeria era baseada no peso do animal (ingestão de álcool 1 g/Kg).

5.4.3 Confronto Residente-Intruso e Agressão intensificada pelo álcool

Após três semanas vivendo em pares, os residentes foram treinados para agressão através de confrontos com intrusos (sempre o mesmo intruso para um mesmo residente), com o propósito de estabilizar a frequência de ataques na forma de mordidas. Este período durou aproximadamente 10 confrontos (intervalo de pelo menos 2 dias entre dois confrontos) para que o número de mordidas se tornasse estável em confrontos com duração de cinco minutos, após a primeira mordida.

Após a estabilização dos confrontos, os animais foram caracterizados para discriminar agressores sensíveis ao álcool. Assim, os animais sensíveis caracterizavam-se pelo aumento da frequência de mordidas após auto-administração de etanol (paradigma descrito acima). Os não sensíveis eram caracterizados pela não alteração na frequência de mordidas após a ingestão de etanol. Para isso, cada animal passava por uma sessão de autoadministração e, 15 minutos após, era confrontado com um intruso. Esse procedimento foi realizado

de modo que no final de pelo menos seis sessões, cada animal tinha três confrontos após ingestão de álcool e três confrontos após ingestão de água.

5.4.4 Cirurgia e administração de fármacos no Núcleo Dorsal da Rafe

Camundongos agressores sensíveis ao etanol receberam implante intracraniano de cânula guia (26 gauge) de 6,0 mm de comprimento, após anestesia com a associação de anestésico + relaxante muscular, Cetamina + Xilazina (80 e 8 mg/Kg, respectivamente). A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico. As coordenadas estereotáticas para implantação da cânula guia foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). A ponta da cânula guia foi posicionada 2,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções no NDR foi feita através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia, conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma micro-seringa (Hamilton). Uma bomba de infusão foi programada para injetar um volume total de 0,2 μ L em um período de 60 segundos. Após a microinjeção, a agulha de injeção permanecia por mais 30 segundos no interior da cânula guia e durante todo o procedimento o animal foi contido manualmente pelo experimentador com uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmava o fluxo da solução.

5.4.5 Fármacos

Foram utilizados: Urocortina II (Sigma Inco., USA), agonista de receptores CRF2 nas doses de 100 e 300 ng/0,2µl e Astressin 2B (Sigma Inco., USA), antagonista de receptores CRF2 nas doses 100 e 560 ng/0,2 µl. Além do álcool etílico 95% (Pharmaco Products Inco., USA), utilizado nas sessões de auto-administração, diluído em água na concentração de 6%.

5.4.6 Avaliação do Comportamento Agressivo

Após o período de recuperação da cirurgia (pelo menos sete dias), os animais foram submetidos aos confrontos experimentais. No momento do confronto, foi registrado o número de ataques na forma de mordidas como a expressão do comportamento agressivo. O confronto foi gravado por meio de um circuito TV-câmera-videocassete para posterior análise. Todos os animais receberam seis microinjeções conduzidas em sequência aleatória, porém balanceada, separadas por pelo menos 48 horas.

5.4.7 Delineamento experimental

5.4.7.1 Experimento 5.A: Avaliação do efeito da microinjeção de Urocortina II (agonista CRF2) no NDR sobre o comportamento agressivo

No dia do teste, os animais foram inicialmente colocados em regime de auto-administração de água ou etanol 1,0 g/Kg. Imediatamente após a sessão, os

animais foram submetidos a microinjeção intra-NDR de fluido cérebro-espinhal artificial (CSF) ou Urocortina II (100 ou 300 ng/0,2 µL). Dez minutos após a microinjeção, cada animal foi submetido ao confronto com o intruso, conforme descrito anteriormente.

5.4.7.2 Experimento 5.B: Avaliação do efeito da microinjeção de Astressin 2B (antagonista CRF2) no NDR sobre o comportamento agressivo

Semelhante ao experimento anterior, no dia do teste, os animais foram inicialmente colocados em regime de auto-administração de água ou etanol 1,0 g/Kg. Imediatamente após a sessão, os animais foram submetidos a microinjeção intra-NDR de fluido cérebro-espinhal artificial (CSF) ou Astressin 2B (100 ou 560 ng/0,2 µL). Dez minutos após a microinjeção, cada animal foi submetido ao confronto com o intruso, conforme descrito anteriormente.

5.4.8 Histologia

Após o término dos experimentos os animais foram anestesiados profundamente com Cetamina + Xilazina e sofreram perfusão intra-cardíaca com solução salina 0,9% e paraformaldeído a 4% e tiveram seus encéfalos removidos. Para verificar a posição da cânula, os encéfalos foram seccionados coronalmente (60 µm) com o uso de um micrótomo e as secções foram coradas com cresil violeta.

5.4.9 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes (fator 1: consumo de etanol ou água antes da microinjeção e 2: tratamento intra-NDR com CSF ou droga em questão – urocortina II ou astressin 2B) de medidas repetidas. Finalmente, os dados foram submetidos à análise post hoc através do teste de Tukey. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

5.5 RESULTADOS

A Figura 14 mostra o comportamento agressivo dos animais após microinjeção intra-NDR de CSF ou Urocortina II (100 e 300 ng) em animais que ingeriram água ou etanol 6% (auto-administração). A análise estatística revelou diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito à frequência de mordidas. Primeiramente, a ANOVA revelou um efeito geral do fluido consumido (Fator 1, $F_{1,11} = 11,48$; $p < 0,05$) traduzido pelo aumento do comportamento agressivo após ingestão de etanol (sem considerar a microinjeção recebida). Além disso, um efeito significativo foi encontrado na frequência de mordidas entre os grupos que receberam diferentes microinjeções no NDR (Fator 2, $F_{2,22} = 11,89$; $p < 0,05$) e interação entre os dois fatores ($F_{2,22} = 6,57$; $p < 0,05$). Comparações posteriores através do teste de Tukey revelaram que o grupo tratado com urocortina II (100 ng) apresentou redução do número de mordidas durante os confrontos, comparado com o grupo controle (CSF), após ingestão de água, mas não após ingestão de etanol. Entretanto, quando tratados com a dose mais

elevada (300 ng), os animais exibiram redução da frequência de mordidas em ambas as situações (ingestão de água ou etanol).

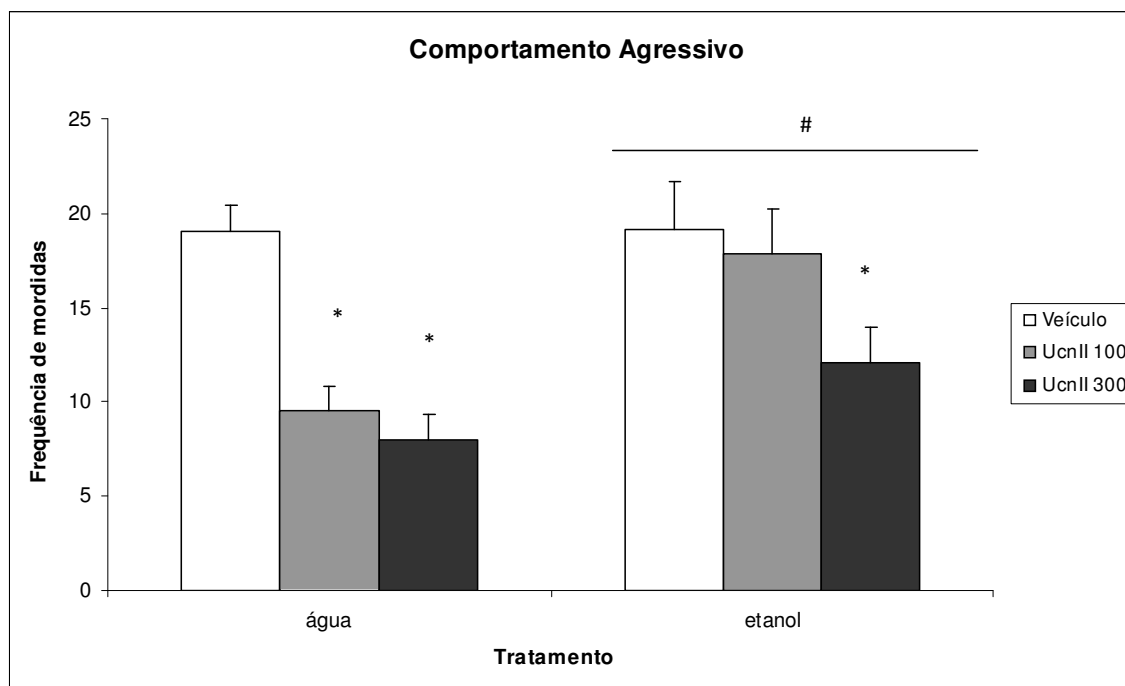


Figura 14 - Efeito de microinjeções de agonista de CRF2, urocortina II ou veículo (CSF), intra-NDR de camundongos após consumo de água ou etanol sobre o comportamento agressivo (frequência de mordidas). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). # $p < 0,05$ comparado com tratamento água e * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (veículo/água ou veículo/etanol). N = 12 animais por grupo.

A Figura 15 mostra o comportamento agressivo dos animais após microinjeção intra-NDR de CSF ou Astressin 2B (100 e 560 ng) em animais que ingeriram água ou etanol 6% (auto-administração). A análise estatística revelou diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito à frequência de mordidas. Primeiramente, existe um efeito geral do fluido consumido (Fator 1, $F_{1,11} = 5.46$; $p < 0,05$), ou seja, um aumento do comportamento agressivo após ingestão de etanol sem considerar a microinjeção recebida. Além disso, um efeito significativo foi encontrado na frequência de mordidas entre os grupos que

receberam diferentes microinjeções no NDR (Fator 2, $F_{2,22} = 12,43$; $p < 0,05$), sem exibir interação entre os dois fatores. Comparações posteriores através do teste de Tukey revelaram que o grupo tratado com Astressin 2B (100 ng, mas não 560 ng), apresentou aumento significativo do número de mordidas durante os confrontos, comparado com o grupo controle (CSF).

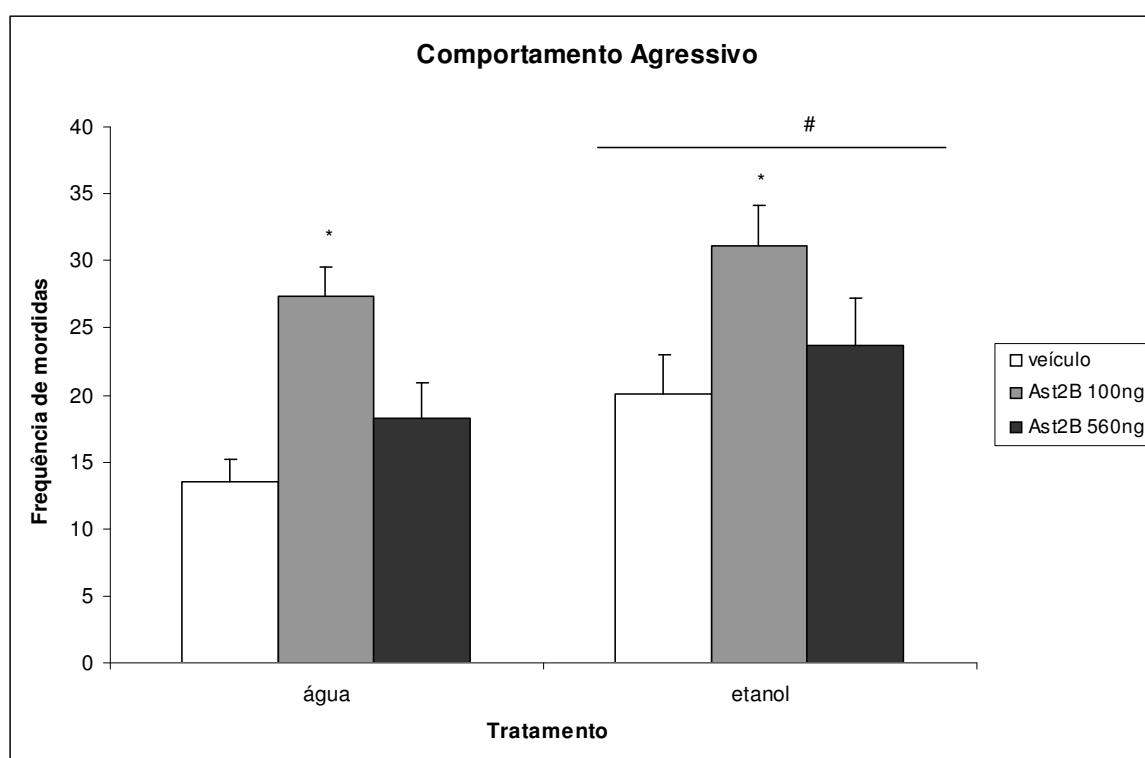


Figura 15 - Efeito de microinjeções de antagonista de CRF2, astressin 2B ou veículo (CSF), intra-NDR de camundongos após consumo de água ou etanol, sobre o comportamento agressivo (frequência de mordidas). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) # $p < 0,05$ comparado com tratamento água * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (veículo/ água ou veículo/ etanol). N = 12 animais por grupo.

5.6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem uma participação da transmissão CRFérgica envolvendo receptores CRF2 no NDR na gênese do comportamento agressivo ofensivo em camundongos submetidos ao confronto

residente-intruso. A Urocortina II, agonista de receptores CRF2, foi eficaz em promover redução da agressão evidenciada pela diminuição do número de mordidas exibidas nos confrontos (Fig. 14). Por outro lado, o astressin 2B, antagonista do mesmo subtipo de receptor, provocou um aumento da expressão do comportamento, ou seja, os animais tratados com este composto intra-NDR aplicaram maior número de mordidas nos intrusos, durante os confrontos (Fig. 15).

Estes resultados corroboram estudos que relacionam o CRF com a diminuição da agressão, como aqueles de Mele e colaboradores (1987), em que a injeção intracerebroventricular (i.c.v) de CRF reduziu o comportamento agressivo em camundongos, evidenciado pela diminuição do número de mordidas aplicadas pelo residente, bem como no estudo de Gammie e colaboradores (2004), em que a diminuição da agressão materna foi evidenciada em camundongos tratados com CRF (i.c.v). Além destes trabalhos, e ainda nesta direção, estão os achados de Coste e colaboradores (2006), que encontraram alta expressão do comportamento agressivo em camundongos nocaute para receptores CRF2, sugerindo que sua ativação poderia controlar a expressão deste comportamento.

Os mecanismos específicos pelos quais receptores CRF2 poderiam modular a agressão ainda não estão bem elucidados, mas a neurotransmissão serotoninérgica é uma candidata plausível a ser influenciada pela ativação de CRF2. Uma série de situações aponta para esse caminho, dentre as quais podemos destacar que: i) o NDR é a principal fonte de projeções serotoninérgicas para muitas outras estruturas relacionadas ao medo e a ansiedade (CARRASCO; VAN DER KAR, 2003; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; MILAN, 2003; VIANA; GRAEFF; LÖSCHMANN, 1997), ii) a transmissão serotoninérgica no NDR, bem

como em outras estruturas, desenvolve importante papel na modulação do comportamento agressivo (BANNAI et al., 2007; FACCIDOMO; BANNAI; MICZEK, 2008) e iii) trabalhos mais recentes têm sugerido a atuação de CRF na liberação de serotonina bem como na ativação de neurônios serotoninérgicos no NDR e em regiões que recebem suas projeções (AMAT et al., 2004; FORSTER et al., 2008; LUKKES et al., 2008; STAUB; EVANS; LOWRY, 2006).

Tradicionalmente, muitos estudos têm mostrado que a serotonina tem efeito inibitório sobre a agressão em diferentes espécies (CHIAVEGATTO; NELSON, 2003; DE ALMEIDA et al., 2006; KAVOUSSI; ARMSTEAD; COCCARO, 1997; LINNOILA; VIRKKUNEN, 1992). Essa hipótese, denominada hipótese serotoninérgica, foi baseada em experimentos anteriores nos quais foram encontrados baixos níveis de serotonina e/ou metabólitos serotoninérgicos em tecidos encefálicos *post-mortem* de camundongos agressivos (GIANCARLONE et al., 1968) bem como no líquido cérebro espinal de humanos que exibiam comportamento agressivo e violento (BERMAN; TRACY; COCCARO, 1997). Embora a hipótese da deficiência de serotonina seja bastante estabelecida, devido a grande quantidade de trabalhos que apontam nesta direção, estudos mais recentes colocam em desafio a sua sustentabilidade, mostrando uma relação inversa (DE BOER; KOOLHAAS, 2005; OLIVIER 2004). Estes resultados controversos podem ser devidos a uma vasta quantidade de receptores serotoninérgicos e suas diferentes localizações. Um exemplo disso são os receptores 5HT1A e 1B, que possuem comprovada influência sobre a agressão, mas diferentes trabalhos apontam para um diferente mecanismo de ação. Enquanto Nikulina e Miczek (1999) direcionam para uma ação pós-sináptica de

5HT1A, outros trabalhos (DE BOER et al., 2000; VAN DER VEGT et al., 2001) sugerem que a mesma ação seja via pré-sináptica. Quanto ao receptor 5HT1B, o mesmo paradoxo é observado, uma vez que diferentes trabalhos direcionam para ação pré (BANNAI et al., 2007) ou pós-sináptica (OLIVIER; VAN OORSCHOT, 2005). Considerando o grande corpo de resultados, podemos certificar que a ação serotoninérgica sobre a agressão é indiscutível, entretanto, permanece como objeto de estudos futuros para melhor esclarecimento de seu papel neste comportamento.

Tomando-se por base a hipótese serotoninérgica, a elevação do nível de serotonina seria responsável por atenuar o comportamento agressivo. Assim, sistemas ou intervenções extra-serotoninérgicas que provocam essa elevação são importantes neste paradigma. Neste sentido, a ação excitatória CRFérgica poderia aumentar a liberação de serotonina, provocando ação anti-agressiva. Entretanto, resultados contrastantes não são exclusivos da ação da serotonina, uma vez que o CRF tem produzido efeito dual sobre a agressão, conforme descrito anteriormente. Esses mesmos resultados discrepantes têm sido relatados na ação de CRF sobre a atividade serotoninérgica. Kirby, Rice e Valentino (2000), usando técnicas eletrofisiológicas, verificaram que a administração intra-NDR e i.c.v. de CRF diminuiu a atividade de neurônios serotoninérgicos nesta estrutura. Curiosamente, este efeito inibitório diminuiu à medida que a dose de CRF era elevada, sendo, após aplicação de altas doses, revertido a excitatório, aumentando os disparos serotoninérgicos. De acordo com esse trabalho, está o de Price e colegas (1998), que mostra a diminuição de 5HT em áreas de projeção após injeção de CRF no NDR.

Com relação à afinidade do CRF aos seus receptores, é conhecido que o mesmo possui uma afinidade maior ao CRF1 que ao CRF2, relação inversa para a urocortina II. Baseando-se nesta característica, esse paradoxo foi melhor entendido posteriormente quando Amat e colaboradores (2004) encontraram que injeções de urocortina II no NDR elevaram a expressão de Fos em neurônios 5HT desta estrutura e aumentaram a liberação deste mesmo neurotransmissor na amígdala basolateral. Além disso, resultados semelhantes quanto à ação excitatória de CRF2 foram mostrados. A estimulação de CRF2 no NDR provocou liberação de 5HT no córtex pré-frontal e no núcleo acumbens (NAc - FORSTER et al., 2008; LUKKES et al., 2008). Deste modo, segundo Amat e colegas (2004), a estimulação de CRF1 seria inibitória sobre os neurônios 5HT, enquanto a estimulação de CRF2 seria excitatória. Isso explica o fato de que baixas doses de CRF, que possivelmente se ligaria primeiramente nos receptores tipo 1, tiveram perfil inibitório. Assim, à medida que a dose era elevada o efeito foi revertido, provavelmente devido a uma mudança de modulação, onde o CRF, embora com menor afinidade, se ligaria a CRF2, após saturação de receptores CRF1. Esse fato foi corroborado no estudo de Lukkes e colaboradores (2008) que encontraram o mesmo perfil de ação na liberação de 5HT no NAc, somado ao fato de que a inibição da liberação de 5HT no Nac provocada pela baixa dose de CRF no NDR, foi bloqueada pela antalarmina (antagonista CRF1) e, por outro lado, a indução da liberação produzida pela dose elevada, foi bloqueada por antisauvagine 30, um antagonista de receptores CRF2. Segundo Liu e colegas (2004), esta relação oposta CRF1 x CRF2 pode ocorrer extra-NDR, o que poderia explicar resultados prévios (ELKABIR et al., 1990), nos quais baixas doses de CRF provocaram

aumento da agressão, enquanto altas doses levaram a diminuição da expressão deste comportamento.

Neste contexto, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a ação antiagressiva da urocortina II, injetada no NDR de camundongos, pode se dever a estimulação serotoninérgica neste mesmo sítio. Por outro lado, a injeção de astressin 2B provocou uma diminuição da ação CRFérgica via CRF2, o que poderia provocar uma deficiência serotoninérgica. Essa visão pode ser corroborada no fato de que a injeção intra-NDR de agonista GABAérgico, um conhecido neurotransmissor inibitório, provoca aumento no comportamento agressivo, possivelmente por aumentar o efeito inibitório sobre neurônios 5HT, resultando também em um déficit serotoninérgico (TAKAHASHI; DEBOLD; MICZEK, 2008).

No tocante a relação ansiedade-agressão ofensiva, os resultados envolvendo receptores CRF2 são discrepantes quanto à sua ação ansiogênica. Em linhas gerais, estes resultados podem ser relacionados com a hipótese da correlação negativa ansiedade x agressão. Isto porque a estimulação CRFérgica, conhecidamente ansiogênica em diversas estruturas relacionadas a essas respostas, desenvolveu perfil antiagressivo. A esta observação inclui-se, de modo indireto, o NDR, no qual foi encontrado efeito ansiolítico do antagonista CRFérgico D-Phe-CRF (LUKKES et al., 2009) e pró-agressivo com o antagonista CRFérgico astressin 2B (Fig. 15). Entretanto, essa observação possui uma série de limitações que a fazem objeto de estudos futuros, uma vez que o antagonista D-Phe-CRF não é seletivo, enquanto o astressin 2B o é para receptores CRF2, tornando a

investigação dos receptores uma interessante ferramenta para melhor compreensão de seus mecanismos. O fato da estimulação de CRF2 aumentar a liberação de serotonina em núcleos relacionados a comportamentos defensivos, como a amígdala e o córtex pré-frontal, poderia apontar para uma ação deste composto via ativação serotoninérgica. Assim, experimentos futuros unindo a estimulação CRF2 no NDR e intervenções em sítios de projeções, além da pesquisa de possíveis ações CRFérgicas em projeções destinadas a estruturas como a MCP, poderão servir como ferramentas úteis na tentativa de melhor entender as ações destes neurotransmissores na ansiedade e no comportamento agressivo.

CAPÍTULO 6

ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL E AUTOADMINISTRAÇÃO DE COCAÍNA: ESTUDO DA MEDIAÇÃO CRFérgica¹

6.1 COCAÍNA

A cocaína é um alcalóide obtido da folha da planta *Erythroxylum coca*, nativa de países da América do Sul como Bolívia e Peru. Apresenta-se como um pó branco cristalino e moderadamente solúvel em água, mas bastante solúvel em solventes orgânicos. Pertence a classe farmacológica dos estimulantes do sistema nervoso central. O mecanismo de ação da cocaína corresponde à sua propriedade de bloquear a proteína recaptadora de dopamina, aumentando sua concentração na fenda sináptica. Seu uso como fármaco é extremamente restrito ao campo da cirurgia oftalmológica devido aos problemas que pode causar como dependência e cardiopatias. No SNC, a ação ocorre em diferentes regiões, sobretudo no córtex e estruturas límbicas (via dopaminérgica meso-cortico-límbica) como núcleo acumbens e área tegmental ventral, provocando euforia, agitação, aumento da capacidade física e mental, diminuindo a fadiga. O uso repetido pode provocar dependência e efeitos colaterais sérios como intoxicações e morte. A sua retirada abrupta provoca síndrome de abstinência caracterizada por ansiedade elevada, depressão e anedonia, entre outros sintomas o que torna a recaída ao seu uso um episódio frequente. O efeito recompensador agudo da cocaína pode levar a

¹ Experimentos realizados no Departamento de Psicofarmacologia – Tufts University, Medford Massachusetts, EUA; sob supervisão do Professor Dr. Klaus Miczek.

procura pela droga e isso em indivíduos vulneráveis (geneticamente) resultam eventualmente em adição hipoteticamente resultante de plasticidade de múltiplos circuitos neurais (HYMAN, 1996).

6.2 ANSIEDADE, ESTRESSE SOCIAL E DEPENDÊNCIA

Embora a cocaína possua atividade altamente reforçadora em humanos e animais (DEVRIES; PERT, 1998; JOHANSON; FISCHMAN, 1989), efeitos adicionais às manifestações positivas como bem-estar, euforia e outras sensações podem ser encontrados com o uso deste psicoestimulante. Dentre eles, destacam-se sintomas negativos como irritação, nervosismo, medo e outros (RESNICK; RESNICK, 1984; SPOTTS; SHONTZ, 1984). Assim, a dependência à cocaína, definida no DSM IV como “padrão desadaptado de ingestão, levando a perturbações clínicas associadas à dificuldade de controlar a auto-administração”, é um fenômeno altamente deletério e devastador tanto no aspecto psicológico quanto fisiológico do dependente. Por este motivo, distúrbios psiquiátricos são frequentemente apontados como consequência do uso da cocaína. São exemplos: paranóia e distúrbios de ansiedade, como ansiedade generalizada e, em especial, episódios de pânico (BLANCHARD; BLANCHARD, 1999). Neste sentido, estes pesquisadores relataram aumento na expressão das reações defensivas eliciadas na bateria de testes de reações de defesa em camundongos (do inglês “mouse defense test battery” – MDTB) nos animais tratados com cocaína. Além disso, Rogerio e Takahashi (1992) demonstraram efeitos ansiogênicos deste composto em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

Uma considerável quantidade de trabalhos tem apontado o envolvimento da ansiedade também na retirada e na abstinência ao uso da cocaína, sendo apontada como um componente maior da síndrome de abstinência e, portanto, uma das causas cruciais do retorno à procura pela droga e recaída (GAWIN, 1991; KOOB; SANA; BLOOM, 1998; RESNICK; RESNICK, 1984;).

O CRF, que está relacionado com o efeito ansiogênico (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997, 2000; resultados Capítulo 3), também parece interferir nestes episódios relacionados ao uso e dependência de drogas como a cocaína, estreitando ainda mais a relação ansiedade e dependência (BASSO et al., 1999; DEVRIES; PERT, 1998; SHAHAM; ERB; STEWART, 2000). Neste sentido, Sarnyai e colaboradores (1995) encontraram que o tratamento periférico e i.c.v. com anticorpo anti-CRF reduziu o efeito ansiogênico no LCE avaliado 48 horas após a última injeção de cocaína i.p. (tratamento durante 14 dias). Além disso, Devries e Pert (1998) demonstraram que o antagonismo central de receptores CRFérgicos, com o alfa helical CRF, atenuou a ansiedade no LCE induzida pela re-exposição do animal ao ambiente no qual a droga era administrada.

O recente trabalho de Pelloux, Costentin e Duterte-Boucher (2009) enfatiza que a ansiedade pode, em muitos casos, estar relacionada com a dependência como demonstrado acima. Entretanto, estes pesquisadores ressaltam que é incerto se ela é uma desordem primária ou secundária ao abuso de drogas. Em outras palavras, o uso de drogas, como a cocaína, pode provocar efeitos ansiogênicos como os demonstrados anteriormente, inclusive quando o uso é descontinuado, como na síndrome de abstinência. Isso constitui, sem dúvida, uma

importante avenida de possibilidades em neurociência. No entanto, Pelloux, Costentin e Duterte-Boucher (2009) levantam um outro aspecto importante, qual seja o questionamento se a ansiedade não seria também um fator que pré-dispõe o indivíduo ao uso e à dependência de cocaína. Embora pareça existir, a interação entre essas duas condições (ansiedade x uso de drogas) é de natureza bastante complexa.

Atualmente é conhecido que existe uma variabilidade no que diz respeito ao uso e susceptibilidade à dependência. Neste sentido, enquanto alguns indivíduos usam a droga sem se tornarem dependentes, outros, no entanto, se tornam dependentes de modo rápido, um fenômeno que parece não depender do potencial de indução de dependência intrínseco de uma determinada droga. Assim, a identificação de fatores confiavelmente preditivos da susceptibilidade individual ao uso e dependência de drogas se faz relevante no que diz respeito aos aspectos preventivos ao abuso.

A vida contemporânea elicia uma série de situações estressantes. O estresse social da vida moderna pode ser exemplificado através de muitas situações que provocam ameaça à integridade física, financeira e enfim à sobrevivência. Fatos que podem abranger desde a alta competitividade no mercado de trabalho até o perigo iminente de se viver em grandes cidades devido à criminalidade são capazes de gerar situações de desconforto e estresse. Entre as muitas consequências que essas situações podem provocar, podemos destacar o medo e a ansiedade. Além disso, frente a uma situação de estresse, o organismo emite respostas resultantes de mudanças neurais, endócrinas, autonômicas e imunológicas para se adaptar àquela situação (SELYE; 1936 apud

MICZEK; COVINGTON; YAP, 2008). Tais mudanças podem influenciar e modificar a resposta do organismo a substâncias psicoativas de abuso, provocando, talvez uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da dependência (MICZEK; COVINGTON; YAP, 2008).

Neste sentido, os resultados de Pelloux, Costentin e Duterte-Boucher (2009) demonstraram que ratos classificados como ansiosos no LCE desenvolveram concomitante preferência condicionada por lugar (PCL - um modelo animal que demonstra o efeito reforçador das drogas) à cocaína, enquanto ratos não ansiosos não desenvolveram tal fenômeno.

Reforçando esses achados, a exposição a episódios de estresse social que conhecidamente é capaz de aumentar os níveis de ansiedade no LCE (CALFA; MOLOSIN; MOLINA, 2006) foi também intensificadora da autoadministração de cocaína em ratos (HANEY et al., 1995, COVINGTON; MICZEK, 2001). Nesse contexto, muitos trabalhos têm utilizado modelos de estresse social para estudar a interferência do estresse no comportamento aditivo. A exposição a um episódio de estresse social pode promover alterações comportamentais e neuroendócrinas persistentes, tais como desregulação do ciclo circadiano, nocicepção, estimulação psicomotora, ansiedade, bem como ativação de estruturas corticolímbicas (CALFA; MOLOSIN; MOLINA, 2006; MARINI et al., 2006; MEERLO et al., 1996; 1999; NIKULINA et al., 1998). Exposições repetidas a esse tipo de estresse podem amplificar e prolongar essas alterações comportamentais e neurobiológicas (TORNATZKY; MICZEK, 1993).

Nessa categoria, incluem-se os modelos de separação materna, derrota social, isolamento social entre outros. A utilização destes modelos justifica-se por

seu valor etológico, o que os tornam mais preditivos dos episódios de estresse vivenciado por humanos (MICZEK et al., 2008).

Confrontos agressivos estão presentes na maioria das espécies e são frequentemente motivados por aspectos reprodutivos, pelo estabelecimento de hierarquia ou por busca de alimento, quando esse se torna escasso (MARINI et al., 2006; MICZEK; THOMPSON; SHUSTER, 1982; NIKULINA et al., 1999; ROCHES; LESHNER, 1979).

O estresse de derrota social pode alterar as respostas às substâncias psicoativas. Por exemplo, animais que foram submetidos a quatro sessões de estresse social adquiriram mais rapidamente e em menores doses o comportamento de auto-administração de cocaína, quando comparados aos animais controles (HANEY et al., 1995).

Além de interferir no consumo, Covington e Miczek (2001) demonstraram que ratos expostos a quatro sessões de derrota social apresentaram maior atividade locomotora em resposta à administração de cocaína e morfina, quando comparados aos animais do grupo controle. A apresentação intermitente ao estresse da derrota social provocou uma resposta de sensibilização comportamental similar em magnitude e decurso temporal àquela produzida após a administração repetida da droga em desafio (COVINGTON; MICZEK, 2001); daí o termo utilizado, sensibilização cruzada.

Sucintamente, a sensibilização comportamental em roedores se caracteriza pelo aumento progressivo da atividade locomotora após a administração repetida da substância psicoativa de abuso (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Este modelo foi primeiramente utilizado para o estudo de psicoses induzidas por

psicostimulantes (ROBINSON; BECKER, 1986) e foi descrito posteriormente para a cocaína, anfetamina, etanol, morfina, nicotina, delta-9-THC e heroína (CADONI; CHIARA, 2000; CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005; KALIVAS; DUFFY, 1987; LENOIR; AHMED, 2007; MARIN; PLANETA, 2004; MISERENDINO; NESTLER, 1995; ROBINSON; BECKER, 1986).

O aumento da atividade locomotora observado na sensibilização comportamental decorre de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico (NESTLER et al., 2001; ROBINSON; BERRIDGE, 2001). As neuroadaptações envolvidas na sensibilização locomotora seriam homólogas àquelas responsáveis pela transição do uso controlado para o uso compulsivo das substâncias psicoativas (CONVIGTON; MICZEK, 2001; NESTLER et al., 2001; ROBINSON; BERRIDGE, 2001).

A natureza do fenômeno é bastante complexa, de tal forma que inúmeros fatores, como genéticos, ambientais, condições experimentais e idade interferem no seu desenvolvimento (ANTELMAN et al., 1980; CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005). Além disso, a sensibilização comportamental é duradoura, podendo ser evidenciada semanas após o final do tratamento prolongado (ROBINSON; BECKER 1986).

Desta maneira, podemos inferir que o estresse interfere em vários aspectos dos comportamentos relacionados à dependência. Assim, estudos que permitam elucidar como o estresse interfere nessa síndrome bem como os mecanismos envolvidos nessa interação são fundamentais para o entendimento mais amplo da farmacodependência. Estudos prévios, como o de Erb e Brown (2006) e de Lu e colaboradores (2003), relacionaram a importância do peptídeo CRF na

sensibilização comportamental a cocaína e outras respostas relacionadas a essa droga. Além disso, Covington e Miczek (2001) encontraram também que animais submetidos ao paradigma da derrota social tiveram elevados significativamente seus níveis de corticosterona duas semanas após o último episódio de estresse, comparado com animais que não tiveram a mesma experiência. Baseado nestes achados, e devido ao fato do CRF ser um composto estreitamente relacionado a situações de estresse e ansiedade, o presente estudo investigou sua possível participação nesta inter-relação estresse/ansiedade e dependência.

6.3 OBJETIVO

O objetivo deste experimento foi investigar a participação do CRF na sensibilização comportamental à cocaína e na intensificação da autoadministração de cocaína induzida pelo estresse da derrota social.

6.4 MATERIAIS E MÉTODOS

6.4.1 Sujeitos

Foram utilizados ratos Long-Evans machos (intrusos e residentes) e fêmeas (pares dos residentes) adultos (dia pós-natal > 60; 225-250 g), provenientes do laboratório Charles River, Wilmington, MA-USA. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório do Dr. Klaus A. Miczek (Medford, MA-USA), onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) e umidade

(35-40%) em ciclo invertido de luz (ciclo 12/12 horas, luz acesa às 20:00) e tiveram livre acesso a alimento e água. A escolha do rato como sujeito experimental se deve ao fato dessa espécie ser mais facilmente utilizada para o paradigma da auto-administração se comparada com camundongos de difícil cateterismo e manutenção do mesmo após implante (THOMSEN; CAINE, 2007).

6.4.2 Fármacos

Foram utilizadas as seguintes substâncias: cocaína (Sigma, EUA) para teste de sensibilização comportamental (10 mg/Kg), e para o protocolo de auto-administração (2, 4 e 5 mg/Kg). Além disso, foi utilizado o atagonista de receptores CRF1, CP 154,526 (CP, 20 mg/Kg), nome químico: Butil-[2,5 dimetil-7-(2,4,6 trimetilfenil)-7H-pirrol-[2,3-d] pirimidino-4-il-etilamina, gentilmente cedido por Pfizer Farmacêutica (EUA) ou adquirido junto à Tocris Inco (EUA).

6.4.3 Estresse de derrota social

6.4.3.1 Residentes - desenvolvimento de dominância

Os ratos dominantes foram previamente treinados para o desenvolvimento dominância. Machos e fêmeas foram aleatoriamente reunidos em pares em caixas de metal medindo 45,1cm de largura; 71,1cm de comprimento e 45,7 cm de altura. Os pares de ratos foram mantidos em suas gaiolas sem perturbação (apenas para a limpeza regular das caixas 1 vez por semana) por um período superior a 1 mês.

Os ratos residentes que participaram das sessões de estresse de derrota social foram selecionados por demonstrarem comportamentos agressivos consistentes (números de mordidas regulares ou imposição da postura de supino ao animal intruso), durante os testes de triagem (MICZEK, 1979). Uma vez estabelecido comportamento dominante, os ratos eram usados em confrontos na medida em que fosse necessário induzir estresse a um intruso.

6.4.3.2 Sessões de estresse de derrota social e prévio tratamento com CP

154,526

Os animais intrusos foram alojados individualmente em gaiolas com grades laterais possuindo orifícios pequenos com medidas semelhantes às caixas que posteriormente foram utilizadas para auto-administração de cocaína. Após uma semana de habituação ao biotério, iniciaram-se as sessões de estresse de derrota social. Cada sessão, num total de quatro, com intervalo de 72 horas entre elas, consistia de 3 etapas (CONVINGTON E MICZEK, 2001):

Etapas 1 – Inicialmente, as fêmeas foram removidas e os animais (intrusos) submetidos ao protocolo de estresse foram transferidos de suas gaiolas-viveiro para as gaiolas dos animais residentes onde foram mantidos por 10 minutos, para provocar os residentes (período de instigação).

Etapas 2 – Após dez minutos, os animais intrusos foram removidos de suas gaiolas-viveiro e colocados dentro da gaiola dos residentes, para a realização do confronto (intrusos *versus* residentes). O confronto era interrompido quando os animais intrusos eram derrotados pelos residentes, fato constatado quando o

intruso recebia 10 mordidas do residente ou quando apresentava posição de supino (deitado com o dorso no assoalho) por 5 segundos (o que ocorresse primeiro).

Etapa 3 - Realizada como descrito na etapa 1.

Trinta minutos antes de cada uma das quatro sessões de estresse, os animais, incluindo-se os controles que não foram submetidos ao estresse, foram tratados intraperitonealmente com CP 154,526 na dose 20 mg/Kg ou o veículo metilcelulose 0,1%. Assim, foram formados quatro grupos: controle/veículo, controle/CP, estresse/veículo e estresse/CP.

6.4.4 Sensibilização Comportamental a Cocaína

Dez dias após a última sessão de estresse, todos os grupos experimentais foram submetidos ao teste de expressão da sensibilização comportamental à cocaína. Todo o teste foi realizado na própria gaiola-viveiro dos animais. Primeiramente, foi administrada salina (0,9%, i.p.) e 5 minutos após a injeção, a atividade locomotora foi avaliada durante 5 minutos. Em seguida, os animais receberam cocaína (10 mg/kg; i.p.) e a atividade locomotora foi observada nos intervalos de 5 - 10 minutos e 25 - 30 minutos após a administração da substância, através da análise posterior do vídeo registrado no momento do teste.

6.4.5 Cirurgia para implantação de cateter na veia jugular

A implantação do cateter é necessária para infusão endovenosa da cocaína. A cirurgia, descrita por Remie, Van Dongen e Rensema (1990), foi

adaptada para as condições do laboratório. Todo o material utilizado no procedimento cirúrgico foi autoclavado e a mesa de cirurgia e tábua de dissecação foram desinfetadas com solução de glutaraldeído a 3,2%.

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) por via intraperitoneal. Quando necessárias, doses suplementares da solução anestésica foram utilizadas durante a cirurgia.

Em uma sala anexa à sala de cirurgia realizou-se a tricotomia da região dorsal na área entre as escápulas e na região torácica na porção superior direita. Foi realizada assepsia nas áreas depiladas com solução de etanol 70%, seguida de solução de álcool iodado a 2%. Repetiu-se o procedimento de limpeza por três vezes, terminando-se com a solução de iodo. Fez-se então uma incisão pequena (8-10 mm) entre as escápulas do animal. Feito este procedimento o animal foi transportado para a sala de cirurgia.

Com um bisturi, fez-se uma incisão de aproximadamente 1 cm paralela ao membro anterior direito do animal. Com uma tesoura pequena os tecidos muscular e adiposo foram dissecados até a visualização da veia jugular. A veia jugular foi então exposta e isolada na porção imediatamente posterior a sua ramificação. Todo o tecido adiposo e conectivo ao redor da veia foi removido.

Utilizando-se uma agulha de 25 gauge, fez-se um pequeno orifício na parede ventral da veia jugular. Com auxílio de pinças cirúrgicas oftálmicas, 4 cm do cateter (tubos de silicone Silastic®, diâmetro interno 0,63 mm e diâmetro externo 1,17 mm) foi introduzido, lentamente, na veia jugular. O cateter foi fixado à veia nas porções cranial e sacral e em seguida, com o auxílio de uma guia de metal, foi realizado um túnel subcutâneo pela parte superior do membro anterior

direito até atingir a incisão no dorso do animal. O cateter foi então introduzido em uma guia e fixado com um “colete” de silicone, no dorso do animal. Por fim a área dissecada foi suturada.

Após a cirurgia, os animais foram submetidos a um período de recuperação de, no mínimo, 5 dias. Nesse período os animais foram pesados e manuseados diariamente e tiveram livre acesso à água e comida.

6.4.6 Autoadministração

O procedimento de autoadministração foi adaptado de Covington e Miczek (2001). As caixas para autoadministração são de acrílico medindo 24,5 cm de comprimento, 30 cm de largura e 30,5 cm de altura. O assoalho da caixa consiste de uma bandeja metálica coberta por papéis prensados (do inglês: paper chip), que mimetizam serragem com vantagem de melhor absorção de líquidos. Em uma das paredes da caixa encontra-se um painel removível, com duas barras retráteis nas laterais a 5 cm do assoalho. Acima das barras existe uma luz verde e uma vermelha, que sinaliza a disponibilidade da cocaína. No centro dessa mesma lateral existe uma luz branca de baixa intensidade a 1 cm do teto que sinaliza o início da sessão de auto-administração. No centro do teto existe um orifício circular de 5 cm de diâmetro que possibilita a passagem e a livre movimentação do cateter, para administração/infusão da droga. Esse cateter está conectado a um suporte giratório contrabalançado (conector que permite movimentos para todos os lados para que o animal não sofra restrição de movimento; do inglês: “swivel” - Cole-Parmer Instruments®, Chicago, USA) que se acopla a uma seringa

em uma bomba de infusão de drogas (Med Associates®, St Albans, VT, USA). A caixa para auto-administração está alojada dentro de uma caixa de madeira equipada com ventilador e luz branca de 7,5 W, com ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas 20:00). O painel e a bomba estão conectados a uma interface ligada a um computador. O programa de auto-administração utilizado para o controle das caixas é o MED-PC (MED Associates® St Albans, VT, USA).

6.4.6.1 Aquisição e manutenção

No processo de aquisição da autoadministração todos os ratos receberam infusão de cocaína (0,75 mg/kg/infusão) ao pressionar a barra ativa, num esquema de razão fixa 1 (RF1) (o reforço foi liberado por uma única pressão na barra), com um “time out” (tempo que se o animal pressionar a barra novamente não recebe a droga) de 30 segundos depois de cada infusão. As sessões terminavam quando o animal obtinha 15 infusões ou atingisse a duração máxima de 300 minutos. Uma vez adquirido o comportamento de auto-administração, o esquema de reforço era gradualmente aumentado para RF3 (3 pressões por um reforço) e posteriormente a RF5 (5 pressões por um reforço). Todos os sujeitos foram mantidos por no mínimo 4 sessões no esquema de RF5.

6.4.6.2 Razão progressiva

Após aquisição da autoadministração (4 sessões RF5), foi implantado um esquema de razão progressiva (RP) de resposta. Na razão progressiva, foi

utilizada a escala aritmética para o incremento do número de resposta para obtenção de um reforço, como descrito por Richardson e Roberts, (1996): 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178... A sessão era encerrada se durante sessenta minutos o rato não obtivesse nenhum reforço.

Foram realizadas três sessões de razão progressiva em dias alternados. Cada sessão de RP foi intercalada por uma sessão de RF5. A média das razões completadas e do total de infusões recebidas em cada uma das sessões foi utilizada como variável dependente.

6.4.6.3 Livre acesso à cocaína durante 24 horas - “Binge”

Um protocolo de acesso contínuo à cocaína (0,3 mg/kg/infusão, RF5 com um “time out” de 30 segundos) foi implementado por um período de 24 horas. A quantidade de cocaína administrada (infusões) foi utilizada como medida para comparação entre os grupos.

6.4.7 Análise Estatística

Os resultados foram (cada item separadamente: sensibilização comportamental, razão progressiva, ponto de ruptura e Binge) submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes (Fator 1: Grupo controle ou estresse e Fator 2: Tratamento Veículo ou CP-antagonista) seguidos pelo teste Post Hoc de Tukey. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Expressão da sensibilização comportamental

A Figura 16 mostra a duração do comportamento de locomoção, em resposta à administração de salina e cocaína, 10 dias após a última sessão de estresse de derrota social. A ANOVA de dois fatores (Fator 1: Grupo controle ou estresse e Fator 2: Tratamento Veículo ou CP) não revelou diferenças entre os grupos em resposta à administração de salina (Fator 1: $F_{1,54} = 0,4$; $p > 0,05$; Fator 2: $F_{1,54} = 0,02$; $p > 0,05$). Entretanto, entre cinco e dez minutos após a injeção de cocaína, foram reveladas diferenças significativas entre os grupos para o fator 1 ($F_{1,54} = 13,82$; $p < 0,05$), fator 2 ($F_{1,54} = 4,42$; $p < 0,05$) bem como uma interação significativa entre os fatores grupo e tratamento foi observada ($F_{1,54} = 4,27$; $p < 0,05$). Análises Post-hoc (Teste de Tukey) revelaram que o grupo estresse tratado com veículo apresentou maior locomoção em resposta à administração de cocaína no intervalo de 5-10 minutos, quando comparado ao grupo controle (não estressado) que também recebeu veículo ($p < 0,05$). Análises intra-grupo revelaram diferenças neste grupo (estresse + veículo), quando foram comparadas injeção de salina (5-10 min) e injeção de cocaína (5-10 min), demonstrando sensibilização comportamental. Além disso, foi revelado também que o grupo estressado tratado com CP apresentou tempo de locomoção menor que o grupo estressado tratado com veículo, demonstrando que o tratamento foi eficiente em provocar a reversão do efeito deste tipo de estresse na sensibilização comportamental à cocaína. Com relação à locomoção, após 25 minutos da injeção

de cocaína, ainda foi observado um maior tempo de locomoção nos animais estressados, embora tenha sido observada diminuição se comparado aos 5 minutos (5-10 min), demonstrando retorno ao valor basal semelhante aos índices pós-injeção de salina (estresse + veículo 25-30 minutos pós-injeção de cocaína, não é diferente do valor após injeção de salina, $p > 0,05$).

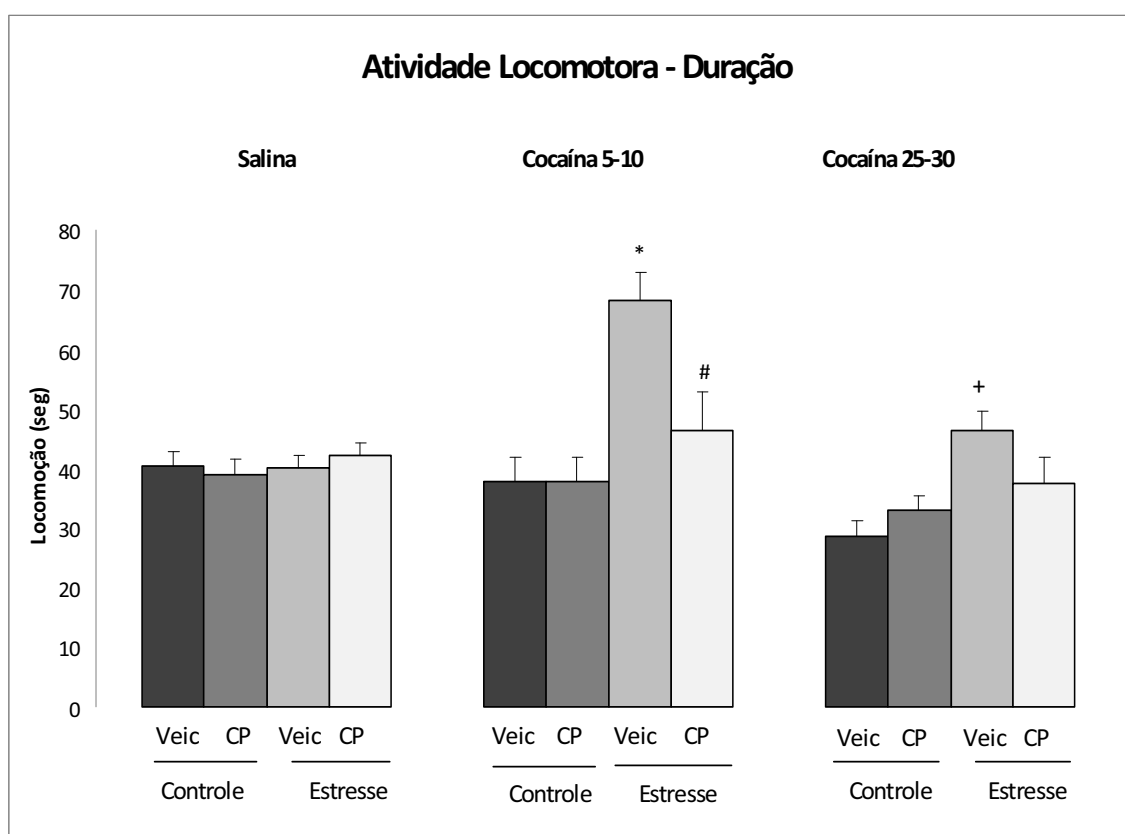


Figura 16 - Locomoção avaliada após administração de salina ou cocaína em ratos submetidos ao estresse de derrota social e controles tratados com CP 154,526 ou veículo metilcelulose 0,1%. As barras representam média $\pm$ EPM (N= 12 - 18 ratos por grupo) da duração da locomoção (seg) nos intervalos de 5-10 minutos após a administração de salina, 5-10 e 25-30 minutos após a administração de cocaína. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Veículo (5-10) e Estresse + veículo (salina); # $p < 0,05$ comparado ao grupo Estresse + Veículo (5-10) e + $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Veículo (25-30).

6.5.2 Autoadministração de cocaína – razão progressiva

A Figura 17 mostra a média do número de reforços durante as sessões de razão progressiva por ratos submetidos ao estresse de derrota social e controles.

Primeiramente, para o número de reforços durante a sessão de razão progressiva, a ANOVA de dois fatores (Fator 1: Grupo controle ou estresse e Fator 2: Tratamento Veículo ou CP) revelou haver diferença significativa entre os grupos experimentais para o fator 1 e fator 2 (Fator 1: $F_{1,32} = 4,26$; $p < 0,05$; Fator 2: $F_{1,32} = 9,16$; $p < 0,05$) sem interação entre eles ($F_{1,32} = 0,22$; $p > 0,05$). Análises posteriores (Teste de Tukey) revelaram diferenças entre os grupos estresse e controle independentemente do tratamento que o animal recebeu, bem como entre CP e Veículo, independente do animal ser estressado ou controle.

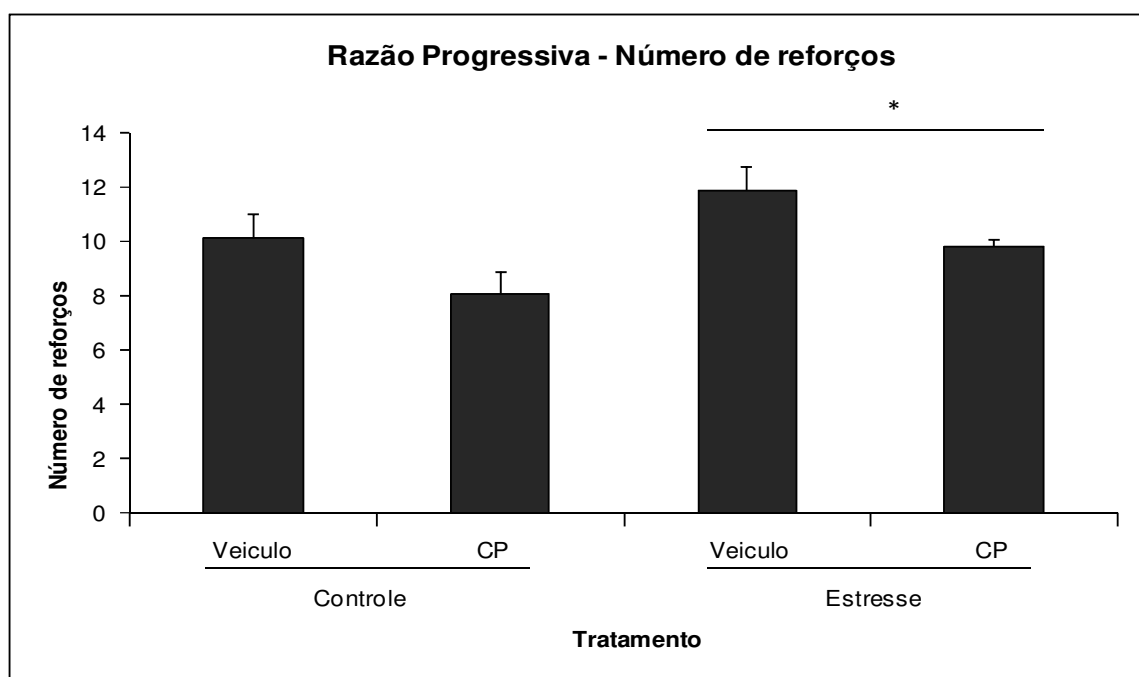


Figura 17 - Razão progressiva para a cocaína. Os gráficos representam média $\pm$ EPM do número de reforços durante as sessões de razão progressiva por ratos dos grupos Controle e Estresse tratados com Veículo ou CP 154526. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (Controle+Veículo e Controle+CP). N= 8-10 animais por grupo.

6.5.3 Livre acesso à cocaína durante 24 horas - “Binge”

A Figura 18 mostra a média do consumo de cocaína (infusões/24h) durante o “binge”, por ratos submetidos ao estresse de derrota social e controles tratados com Veículo ou CP 154,526. A ANOVA de dois fatores (Fator 1: Grupo controle ou estresse e Fator 2: Tratamento com Veículo ou CP) revelou haver diferença significativa entre os grupos experimentais para o fator 1 e fator 2 (Fator 1: $F_{1,32} = 8,936$; $p < 0,05$; Fator 2: $F_{1,32} = 10,33$; $p < 0,05$) sem interação entre eles ($F_{1,28} = 0.18$; $p > 0,05$). Análises posteriores (Teste de Tukey) revelaram um efeito geral do estresse que aumentou o número de infusões se comparado ao controle, sem considerar que tratamento o animal recebeu i.p. antes dos confrontos. Além disso, revelou uma tendência à redução da auto-administração entre os animais tratados com CP x veículo no grupo controle, ou seja, animais não submetidos ao estresse social ($p = 0,06$). Finalmente, no grupo estresse os animais tratados com CP se auto-administraram menos cocaína durante as 24 horas ($p < 0,05$), que os animais tratados com veículo, mostrando que o tratamento com CP apresentou reverter o aumento do consumo de cocaína provocado pelo estresse.

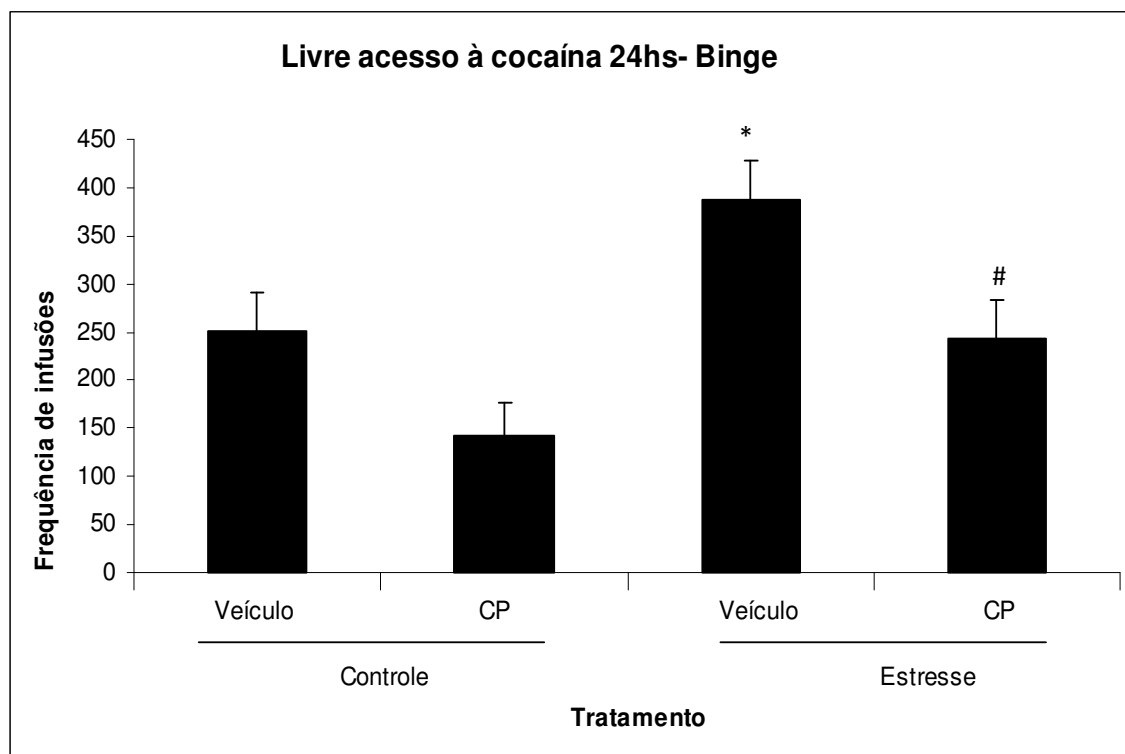


Figura 18 - Consumo de cocaína durante 24 horas de livre-acesso (Binge). Os valores são expressos em número de infusões/24h realizadas por ratos submetidos ao estresse social e controles tratados com CP 154,526 ou veículo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Veículo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo Estresse + Veículo. N= 8-10 animais/grupo.

6.6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento demonstrando que os animais submetidos ao estresse intermitente (quatro sessões de derrota social) tiveram a atividade locomotora aumentada (Figura 16) em resposta a administração de cocaína, caminham ao encontro dos achados de Kalivas e Duffy (1989), Araújo et al., (2003) e Yap e Miczek (2007), os quais também demonstraram sensibilização comportamental cruzada. Os resultados encontrados no presente estudo também corroboram estudos prévios, nos quais foi demonstrado que a exposição

intermitente a breves episódios de estresse de derrota social induz sensibilização cruzada para doses moderadas de cocaína, anfetamina, morfina e etanol (MARROW et al., 1999; MICZEK et al., 1999; NIKULINA et al., 1998; YAP et al., 2007).

Evidências oriundas de estudos realizados em camundongos e ratos mostram que a ativação de regiões que estimulam direta ou indiretamente o núcleo acumbens está intrinsecamente relacionada ao desenvolvimento da sensibilização cruzada entre estresse de derrota social e drogas (HERBERT, 2002; MARTINEZ; CALVO-TORRENT; MATSUDA et al., 1996; MICZEK et al., 2004). Esse tipo de estresse ativa células na matéria cinzenta periaquedutal, núcleo dorsal da rafe e *locus coeruleus*, que se projetam via hipotálamo para o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. Essas três últimas regiões enviam projeções glutamatérgicas para a área tegmental ventral (ATV), ativando neurônios dopaminérgicos que se projetam para o núcleo acumbens (NAc), aumentando a concentração de dopamina nesse núcleo (MICZEK, COVINGTON; YAP, 2008). Ambas as áreas são participantes do sistema de recompensa ou circuito do reforço, as quais são ativadas após o uso da droga conferindo seu efeito reforçador positivo. As projeções glutamatérgicas para a ATV parecem ter grande importância para o desenvolvimento da sensibilização cruzada, visto que o bloqueio de receptores glutamatérgicos na ATV previne o desenvolvimento desse comportamento. Neste sentido, foi demonstrado que o bloqueio de receptores NMDA em camundongos e ratos, antes das sessões de estresse de derrota social, reduz a sensibilização locomotora aos psicostimulantes (COVINGTON et al., 2008; YAP et al., 2005;).

Além dessas respostas, Covington e Miczek (2001) encontraram também que animais submetidos ao paradigma da derrota social tiveram elevados significativamente seus níveis de corticosterona duas semanas após o último episódio de estresse, comparado com animais que não tiveram a mesma experiência. Este aumento pode ter sido desencadeado por uma ativação do eixo HPA mediado pelo aumento de liberação de CRF, seu precursor em resposta ao estresse sofrido. O CRF, além de ativar o eixo HPA, também age como neurotransmissor, atuando em seus receptores CRF1 e CRF2 e desencadeando respostas neurais ao estresse. Desse modo, um possível mecanismo de ação pelo qual o estresse provoca o efeito estimulante seria pelo aumento de CRF, que poderia atuar em neurônios dopaminérgicos. Em apoio a essa relação dopamina-CRF, estão os trabalhos de Erb e Brown (2006) e de Przegalinski e colaboradores, (2005), os quais encontraram que o tratamento com o antagonista CRFérgico D-Phe CRF e CP 154,526 respectivamente, preveniu a sensibilização comportamental a cocaína (aquela induzida por injeções repetidas). Neste sentido, Lu e colaboradores (2003) encontraram que respostas dopaminérgicas à cocaína são dependentes da transmissão CRFérgica, uma vez que o tratamento com alfa-helical CRF, um antagonista inespecífico de receptores CRFérgicos, diminuiu a distância percorrida em resposta a injeção de cocaína, bloqueou a preferência condicionada por lugar induzida pela cocaína, bem como reduziu o nível extracelular de dopamina no NAc e ATV em resposta a injeção de cocaína.

Os resultados do presente estudo corroboram estes achados, uma vez que a sensibilização comportamental à cocaína provocada pelo estresse foi prevenida

pelo tratamento com o CP 154,526 nos animais submetidos aos confrontos com residentes (Figura 16).

O presente estudo também apresenta dados de outras variáveis importantes no entendimento da neurobiologia da dependência, além da sensibilização comportamental. Neste sentido, foram realizados os experimentos de autoadministração endovenosa de cocaína. Segundo estudos anteriores, animais sensibilizados à cocaína (estresse – sensibilização cruzada ou administração repetida da droga) acumulam significativamente mais droga, ou seja, administram a si próprios, maior número de infusões de cocaína durante o livre-acesso (binge), que animais não sensibilizados (COVINGTON; MICZEK, 2001; O'BRIEN, 1998;).

Os resultados deste estudo apresentam um efeito geral do estresse quando comparado ao grupo controle. Em outras palavras, os animais estressados (ambos os tratamentos):

- i) Receberam mais reforços nas sessões de razão progressiva (Figura 17), demonstrando mais empenho e motivação na procura e no trabalho para obtenção da droga que os animais controle, que desistiam antes, à medida em que a razão progredia, ou seja, o trabalho para conseguir um reforço crescia.
- ii) Receberam mais reforços na sessão de livre acesso (Binge, Figura 18) durante 24 horas, ratificando esse efeito geral do estresse não só na sensibilização como também na autoadministração de cocaína.

Além disso, a análise estatística demonstrou efeito geral do CP sobre o comportamento de auto-administração nas sessões de razão progressiva e no Binge. Os animais que foram tratados com CP tiveram reduzidos os reforços em ambas as situações. Ainda neste sentido, foi demonstrado um efeito inibitório do CP sobre a auto-administração no grupo estresse na sessão de livre-acesso - Binge. Assim, o fato de o antagonismo de CRF ter revertido a intensificação da autoadministração de cocaína promovida pelo estresse, como sugerem estes resultados, está de acordo com estudos anteriores, que sugeriram uma ação do CRF com respostas comportamentais à cocaína, embora aqueles não tenham envolvido o estresse.

Uma estrutura encefálica provavelmente envolvida nestas respostas é a ATV, uma vez que trabalhos, como o de Wanat e colaboradores (2008), detectaram aumento de disparos de neurônios dopaminérgicos provocados pelo CRF nesta região. Além disso, estudos prévios demonstraram que situações de estresse podem liberar CRF em áreas extra-hipotalâmicas, como a ATV (HAUGER et al., 2006; RODAROS et al., 2007; WANG et al., 2005). Considerando esses achados, juntamente com o resultado de nosso estudo, pode-se propor uma participação da transmissão CRFérgica na ATV na mediação das respostas à cocaína. Entretanto, para uma confirmação desta ação, futuros experimentos deverão ser realizados envolvendo a microinjeção deste mesmo antagonista na ATV e a verificação de um possível efeito sobre os comportamentos eliciados pela injeção de cocaína (sensibilização comportamental) e também sobre a auto-administração endovenosa desta droga.

Um fato curioso, e de certa forma não esperado, é o efeito inibitório do CP sobre a autoadministração também nos animais controles. Esta diminuição no número de infusões nas sessões de razão progressiva (Figura 17), além de uma forte tendência de declínio do número de infusões durante o livre-acesso (*binge*, $p = 0,06$, Figura 18), comparados com os animais controle que receberam veículo. Neste sentido, é importante ressaltar dois pontos: i) os animais controles também receberam 4 injeções no mesmo momento que os animais estresse. Tal procedimento pode, de alguma forma, ter atuado como um estressor, resultando em liberação de CRF, que, por sua vez, seria bloqueado pela injeção do antagonista, e ii) estudos anteriores demonstraram que animais tratados com antagonistas de CRF não exibiram sensibilização comportamental a repetidas injeções de cocaína (ERB; BROWN, 2006; PRZEGALINSKI et al., 2005). Em outras palavras, animais não estressados também sofreram efeitos da manipulação da transmissão CRFérgica. Assim, o efeito do CP em ambos os grupos controle e estressado pode ser um indicativo do envolvimento do CRF não apenas na ingestão de drogas intensificada pelo estresse, mas também nas modificações e plasticidades induzidas pelo contato com a droga, mesmo no grupo não estressado. Se assim, o CRF é importante para a manutenção da busca pela droga; trazendo para a vida cotidiana, mesmo em indivíduos não estressados, como por exemplo, aqueles que buscam pela curiosidade. Isto pode ser corroborado pelo fato de que alguns animais, sobretudo aqueles que receberam CP (independentemente do grupo), tiveram grande dificuldade ou não adquiriram o comportamento de auto-administração, não passando da primeira fase (aquisição e manutenção), sendo, portanto, excluídos dos resultados.

Baseando-se no fato que o estresse de derrota social é capaz de eliciar comportamento ansioso no LCE e em outros modelos animais de ansiedade (BLUMBERG et al., 2009; CALFA; MOLOSIN; MOLINA, 2006; KINSEY et al., 2007; PULLIAM et al., 2010), pode-se pontuar que os resultados do presente estudo corroboram os recentes achados de Pelloux, Costentin e Duterte-Boucher (2009), os quais estabeleceram que a ansiedade pode ser um fator predisponente ao uso e dependência à cocaína. Tais autores demonstraram que animais previamente classificados como mais ansiosos desenvolveram preferência condicionada por lugar pareado com a cocaína em contraposição àqueles menos ansiosos. No presente experimento, os animais que sofreram estresse de derrota social como discutido anteriormente demonstraram sensibilização cruzada à cocaína além de se auto-administrarem mais a droga.

Quanto ao decurso temporal, Calfa, Molosin e Molina (2006) demonstraram efeito ansiogênico um dia após o último episódio de estresse de derrota social. Entretanto, achados de Blumberg e colaboradores (2009) e de Pulliam e colaboradores (2010) sugerem que a ansiedade eliciada por tal fenômeno pode perdurar por muito tempo após a retirada do estímulo, ou seja, o último episódio de estresse social. Estes achados fortalecem a possibilidade que a ansiedade desencadeada pelos episódios de estresse social seja um elemento participante no desencadeamento da dependência, uma vez que os efeitos do estresse observados na sensibilização comportamental e auto-administração foram também fenômenos observados por longo período após o último episódio (10 dias para sensibilização comportamental e pelo menos 20 dias para o início do protocolo de autoadministração).

Outro ponto importante observado no presente estudo foi a ação inibitória do antagonista de CRF sobre todos os comportamentos relacionados à dependência, mostrando reversão do efeito do estresse. Este fato torna-se relevante uma vez que foi demonstrado por Martins, Marras e Guimarães (2000) que o bloqueio das ações deste mesmo neurotransmissor inibiu o efeito ansiogênico no LCE provocado por um outro tipo de estresse, o de imobilização. Assim, é possível que a ansiedade desencadeada pelo estresse, tanto por derrota social (presente estudo) como por imobilização (MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 2000), tenha sua origem na elevação da transmissão CRFérgica. Se assim, o tratamento prévio aos episódios de derrota social com o antagonista CRFérgico, o CP, preveniu a ação do CRF, bem como de seu efeito ansiogênico, dificultando a sensibilização comportamental e atenuando o comportamento de auto-administração, como verificado nos resultados apresentados neste estudo. Desta forma, a prevenção da ansiedade, de certa forma, se configuraria como um importante fator para atenuar a vulnerabilidade ao uso e dependência à cocaína.

Com relação à natureza do receptor envolvido, se CRF1 ou CRF2, os resultados do presente estudo indicam ser o subtipo CRF1 relevante na gênese desses comportamentos, uma vez que o CP possui alta especificidade e afinidade a este subtipo. Assim, parece que o receptor CRF1 participa na mediação da intensificação de comportamentos relacionados à dependência de cocaína induzida pelo estresse social. Embora se mostrem aparentemente relacionados, a natureza dessa relação CRF-ansiedade-dependência é ainda indeterminada e possivelmente envolve mecanismos de neuroplasticidade complexos. Tal fato encoraja a realização de novos estudos, sendo a administração de um ansiolítico

clássico como um benzodiazepínico prévio aos episódios de estresse, uma possível maneira de se abordar esse tema. Outra condição experimental plausível seria a manipulação farmacológica de outras estruturas encefálicas, além daquelas áreas pertencentes ao sistema de recompensa (ATV e NAc), com reconhecido papel na mediação de respostas defensivas, como amígdala, matéria cinzenta periaquedutal e outras estruturas na intenção de diminuir a ansiedade provocada pelo estresse de derrota social e avaliar os efeitos sobre os comportamentos relacionados à dependência. Além dessas propostas, uma série de outras possibilidades experimentais surge, fato que proporciona um vasto campo a ser explorado em neurociência, uma vez que o melhor entendimento dessa relação é de elevada utilidade para uma possível interação farmacológica como forma de prevenir e tratar problemas relacionados à dependência à cocaína.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES GERAIS DO ESTUDO

O presente estudo confirmou o papel relevante da matéria cinzenta periaquedutal mesencefálica na coordenação de respostas comportamentais defensivas bem como da antinocicepção. Neste sentido, nossos resultados demonstraram que o receptor NMDA neste sítio, além de estar envolvido nas respostas defensivas explosivas (fuga e luta), também exerce papel na modulação de comportamentos defensivos mais sutis, corroborando os achados de Carvalho-Netto e colaboradores (2009). Nesta mesma linha, resultados encontrados neste estudo indicam ser a mediação nitrérgica intra-MCP relevante para os efeitos aversivos da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Em outras palavras, a ação ansiogênica evidenciada no labirinto em cruz elevado (LCE) resultante da ativação de receptores NMDA na MCP foi atenuada com o pré-tratamento com o inibidor da síntese de óxido nítrico (NO) no mesmo sítio. Desta forma, a MCP estaria envolvida na mediação dos comportamentos explosivos de defesa relacionados ao medo, mas também participaria, juntamente com estruturas prosencefálicas (córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala) do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados à ansiedade como postularam McNaughton e Corr (2004).

O presente estudo também corroborou resultados anteriores do laboratório (MIGUEL, 2006) em que foi demonstrada a ineficácia do inibidor da isoforma neural da enzima sintase de NO (NOS_n) na MCP sobre a ansiedade no LCE. Esta ausência de efeitos do NPLA se opõe aos resultados encontrados por Guimarães e colaboradores (1994) os quais observaram efeito ansiolítico com injeções intra-

MCP de inibidores inespecíficos da NOS como, por exemplo, o L-NAME e o L-NOARG, capazes de atuarem sobre as outras isoenzimas. Assim, sugere-se a participação de outras isoenzimas como a endotelial também presente na MCP (IWASE et al., 2000; PAAKARI; LINDSBERG, 1999) na gênese da ansiedade eliciada pelo NO.

Além da relação glutamato/NMDA e NO, o presente estudo ajudou a esclarecer, pelo menos em parte, o complexo e dual efeito do CRF nos diferentes comportamentos relacionados à ansiedade e ao estresse. Neste sentido, observou-se mediação CRFérgica nos índices de ansiedade avaliados no LCE, na antinocicepção, bem como no comportamento agressivo e nos mecanismos da dependência à cocaína, corroborando estudos anteriores que demonstraram ser o CRF um peptídeo intimamente relacionado com as mais diferentes respostas relacionadas ao estresse.

Com relação à ansiedade no LCE e à antinocicepção, este estudo demonstrou a ação ansiogênica, corroborando os achados de Martins, Marras e Guimarães (1997), e antinociceptiva da estimulação CRFérgica na MCP. Além disso, este estudo apontou serem estes efeitos CRFérgicos intra-MCP mediados pelo subtipo de receptor CRF1, uma vez que o bloqueio deste receptor aboliu ambos os efeitos do CRF. Por outro lado, estas ações intra-MCP não parecem sofrer mediação do subtipo de receptor CRF2, pois o seu bloqueio demonstrou-se inócuo aos efeitos do CRF. Estes achados estão em acordo com Sahuque e colaboradores (2006), que embora tenham estudado outra área encefálica, o núcleo intersticial da estria terminal (BNST), encontraram a mesma relação deste

estudo quanto à mediação CRF1 x CRF2 na ansiedade desencadeada pelo CRF. As ações ansiogênica e antinociceptiva da ativação CRFérgica parecem não depender da produção de NO, uma vez que a prévia inibição da síntese de NO não alterou nenhum dos efeitos do CRF. Tais resultados indicam um perfil diferente deste neuropeptídeo daquele encontrado para o glutamato/NMDA, no que se refere aos mecanismos da ansiedade e da nocicepção. Assim, pode-se sugerir que embora ambos sejam ansiogênicos, glutamato e CRF devem recrutar diferentes mensageiros na complexa cascata intracelular para expressão destas respostas.

Um resultado intrigante do presente estudo foi que enquanto o NO não se comportou como elemento chave na expressão das respostas mediadas pelo CRF, os efeitos aversivos desencadeados pela ativação nitrérgica intra-MCP mostraram-se sensíveis ao bloqueio dos receptores CRF1. Neste sentido, o efeito aversivo neste trabalho evidenciado pelos comportamentos de corrida, saltos e congelamento, promovido pelo aumento do tônus nitrérgico na MCP, através da microinjeção de um composto doador de NO, foi atenuado pelo prévio antagonismo de receptores CRFérgicos subtipo CRF1. Assim, pode-se sugerir que a aversão provocada pelo NO pode ter contribuído para a liberação de CRF.

O presente estudo demonstrou também a participação CRFérgica no NDR na modulação do comportamento agressivo de camundongos. Evidências anteriores enfatizaram a relação entre o comportamento agressivo e a ansiedade e reações de defesa (BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003; NYBERG; VEKOVISCHEVA; SANDNABBA, 2003). O efeito antiagressivo do CRF mostrou

ser via receptor CRF2 do NDR, já que a ativação e o bloqueio seletivos deste levaram a redução e intensificação, respectivamente, da agressão. Em geral, estes resultados reforçam a possibilidade da correlação negativa ansiedade x agressão (NYBERG; VEKOVISCHEVA; SANDNABBA, 2003; SANDNABA, 1997), uma vez que a estimulação CRFérgica, ansiogênica em diversas estruturas, inclusive no próprio NDR, desenvolveu perfil antiagressivo neste sítio.

O presente estudo apresentou indicativo da ação do CRF também no comportamento relacionado à dependência à cocaína, inclusive na intensificação de tais comportamentos provocados pela exposição ao estresse. Neste sentido, o tratamento sistêmico com o antagonista de receptores CRF1, prévio aos episódios de estresse social, bloqueou a sensibilização comportamental e atenuou o efeito intensificador sobre a autoadministração de cocaína, evidenciados nos animais também estressados, mas que não receberam o antagonista. Uma vez que o estresse de derrota social promove efeito ansiogênico em modelos animais de ansiedade (BLUMBERG et al., 2009; CALFA; MOLOSIN; MOLINA, 2006; KINSEY et al., 2007; PULLIAM et al., 2010), estes resultados levantam a possibilidade de que a ansiedade pode ser participante da vulnerabilidade ao uso e dependência à cocaína. Neste sentido, estão os achados de Pelloux, Costentin e Duterte-Boucher (2009) nos quais animais previamente classificados como mais ansiosos desenvolveram preferência condicionada ao local à cocaína em contraposição àqueles menos ansiosos que não exibiram tal comportamento. Assim, o CRF parece estar envolvido também nessa complexa relação de co-morbidade entre a ansiedade-dependência ou adição de drogas.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS

ABU-SOUD, H.M.; STUEHR, D.J. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, n.22, p.10769-72, 1993.

ALBECK, D.S., et al. Chronic social stress alters levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain. **J. Neurosci.**, v.17, n.12, p.4895-903, 1997.

AMAT, J., et al. Microinjection of urocortin 2 into the dorsal raphe nucleus activates serotonergic neurons and increases extracellular serotonin in the basolateral amygdala. **Neuroscience**, v.129, n.3, p.509-19, 2004.

ANTELMAN, S.M., et al. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. **Science**, v.1207, p.329-31, 1980.

ARAUJO, A.P.N., et al. Predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. **Behav. Brain Res.**, v.139, p.75-81, 2003.

ARBORELIUS, L., et al. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J. Endocrinol.**, v.160, n.1, p.1-12, 1999.

BAILEY T.W.; DIMICCO, J.A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevated plasma ACTH in conscious rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.280, p.R8-15, 2001.

BALE, T.L., et al. Corticotropin releasing factor receptor 2-deficient mice display anxiety-like behavior and are hypersensitive to stress. **Nat. Genet.**, v.24, p.410-14, 2000.

BALDWIN, H.A., et al. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, v.103, p.227-32, 1991.

BANNAI, M., et al. Anti-aggressive effects of agonists at 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus of mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.193, n.2, p.295-304, 2007.

BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation, suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region. In: EPSTEIN, A.; HARRISON, A. **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology**, v.13, New York Academic Press, p.67-74, 1988.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. **Brain Res.**, v.439, n.1-2, p.95-106, 1988.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog. Brain Res.**, v.87, p.267-305, 1991.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A.A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, p.175-98, 1991.

BARAM, T.Z., et al. The CRF1 receptor mediates the excitatory actions of corticotropin releasing factor (CRF) in the developing rat brain: in vivo evidence using a novel, selective, non-peptide CRF receptor antagonist. **Brain Res.**, v.770, n.1-2, p.89-95, 1997.

BASSO, A.M. Corticotropin-releasing factor antagonist attenuates the "anxiogenic-like" effect in the defensive burying paradigm but not in the elevated plus-maze following chronic cocaine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.145, n.1, p.21-30, 1999.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog. Neurobiol.**, v.46, p.575-605, 1995.

BEIDERBECK, D.I.; NEUMANN, I.D.; VEENEMA, A.H. Differences in intermale aggression are accompanied by opposite vasopressin release patterns within the septum in rats bred for low and high anxiety. **Eur. J. Neurosci.**, v.26, n.12, p.3597-605, 2007.

BERMAN, M.E.; TRACY, J.I.; COCCARO, E.F. The serotonin hypothesis of aggression revisited. **Clin. Psychol. Rev.**, v.17, p.651-65, 1997.

BERNIK, M.A.; MINUTTENTAG, N.W. Farmacoeconomia. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1^a. ed., p.409-19, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

BERRIDGE, C.W.; DUNN, A.J. CRF and restraint-stress decrease exploratory behavior in hypophysectomized mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.34, p.517-19, 1989.

BERRIDGE, M.J. Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.24, n.2, p.115-40, 1981.

BITTENCOURT, A.S., et al. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of the rat: Role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v.125, n.1, p.71-89, 2004.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.23, n.7, p.981-91, 1999.

BLANCHARD, D.C., et al. Fluprazine hydrochloride does not decrease defensive behaviors of wild and septal syndrome rats. **Physiol. Behav.**, v.35, n.3, p.349-53, 1985.

BLANCHARD, D.C, et al. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-humans mammals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.25, n.7-8, p.761-70, 2001.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Aggressive behavior in the rat. **Behav. Biol.**, v.21, p.157-61, 1977.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul McLean. **Physiol. Behav.**, v.79, n.3, p.515-24, 2003.

BLANCHARD, R.J., et al. Defensive attack behavior in male and female rats. **Anim. Learn. Behav.**, v.8, p.117-83, 1980.

BLANCHARD R.J, et al. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.**, v.58, n.1-2, p.155-65, 1993.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.13 Suppl, p.S3-14, 1989.

BLANCHARD, R.J.; HORI, K.; BLANCHARD, D.C. Social dominance and individual aggressiveness. **Aggress. Behav.**, v.14, p.195-203, 1988.

BLANCHARD, R.J.; WALL, P.M.; BLANCHARD, D.C. Problems in the study of rodent aggression. **Horm. Behav.**, v.44, p.161-70, 2003.

BLUMBERG, M.S. et al. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. **Behav. Neurosci.**, v.123, n.3, p.564-76, 2009.

BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behav. Brain Sci.**, v.3, p.291-322, 1980.

BOWERS, L.K.; SWISHER, C.B.; BEHBEHANI, M.M. Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. **Brain Res.**, v.981, p.52-7, 2003.

BRAGA, A.A.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. **Neurosci. Lett.**, v.459, p.79-83, 2009.

BRANDÃO, M.L. Mecanismos Básicos e Motivacionais da Dor. In: _____. **As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência**. São Paulo: EPU, p.141-46, 2004.

BRANDÃO, M.L, et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.23, n.6, p.863-75, 1999.

BRANDÃO, M.L, et al. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.25, n.2, p.36-41, 2003.

BREDT, D.S.; FERRIS, C.D.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.16, p.10976-81, 1992.

BRITTON, D.R., et al. Dexamethasone suppresses pituitary-adrenal but not behavioral effects of centrally administered CRF. **Life Sci.**, v.38, p.211-16, 1986.

BRUÑE, B.; LAPETINA, E.G. Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.181, n.2, p.921-6, 1991.

CABRAL, J.C.P., et al. A dor reverte o efeito ansiolítico do L-NAME injetado na Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP) de camundongos. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL – FeSBE, 2003. **Anais da FeSBE**, 01.06.062., 2003.

CADONI, C.; CHIARA, G.D. Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. **J Neurochem.**, v.103, p.487-99, 2007.

CALFA, G.; MOLOSIN, M.; MOLINA, V.A. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. **Behav. Brain Res.**, v.172, n.2, p.324-32, 2006.

CAROBREZ, A.P.; BERTÓGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, n.8, p.1193-205, 2005.

CARRASCO, G.A.; VAN DER KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur. J. Pharmacol.**, v.463, p.235-72, 2003.

CARRIVE, P., et al. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v.78, n.1, p.165-77, 1997.

CARRIVE, P.; WALKER, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and post stress recovery. **Neuroscience**, v.116, n.3, p.897-912, 2003.

CARVALHO-NETTO, E.F., et al. Effects of intra-PAG infusions of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behav. Brain Res.**, v.176, n.2, p.222-9, 2007.

CARVALHO-NETTO, E.F., et al. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.85, n.1, p.140-7, 2006.

CARVALHO-NETTO, E.F., et al. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. **Psychopharmacology (Berl)**, v.204, n.4, p.617-25, 2009.

CASTILHO, V.M.; AVANZI, V.; BRANDAO, M.L. Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.62, n.3, p.425-31, 1999.

CASTILHO, V.M.; BRANDAO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.155, n.2, p.154-62, 2001.

CHALMERS, D.T.; LOVENBERG, T.W.; DE SOUZA, E.B. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF₂) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF₁ receptor mRNA expression. **J. Neurosci.**, v.15, n.10, p.6340-50, 1995.

CHAN, R.K.W., et al. A comparison of two immediate-early genes, *c-fos* and NGF1-b, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. **J Neurosci.**, v.13, p.5126 -38, 1993.

CHANG, C.P., et al. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, v.11, p.1187-95, 1993.

CHARBONNEAU, H., et al. Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Proc. Natl. Ac. Sci. USA**, v.87, n.1, p.288-92, 1990.

CHEN, J., et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. **J. Neurosci.**, v.25, p.2366-75, 2005.

CHEN, R., et al. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.8967-71, 1993.

CHIAVEGATTO, S; NELSON, R.J. Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. **Horm. Behav.**, v.44, n.3, p.233-41, 2003.

CHIAVEGATTO, S.; SCAVONE, C.; CANTERAS, N.S. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. **Neuroreport.**, v.9, n.4, p.571-6, 1998.

CHO, H.J., et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J. Experim. Med.**, v.176, p.599-604, 1992.

CLEMENT, Y.; CHAPOUTHIER, G. Biological bases of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.22, n.5, p.623-33, 1998.

COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav. Brain Res.**, v.87, n.1, p.97-103, 1997.

COIMBRA, N.C., et al. Effects of the blockade of opioid redceptor on defensive reaction elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. **Brain Res.**, v.736, n.1-2, p.348-52, 1996.

CONCEIÇÃO, I.M., et al. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.25, p.831-4, 1992.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Res. Rev.**, v.32, n.2-3, p.476-509, 2000.

CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, v.96, n.3, p.440-7, 2009.

COSTA, A., et al. Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus *in vitro*. **Brain Res.**, v.605, p.187-92, 1993.

COSTE, S.C., et al. Corticotropin-releasing factor receptor type 2-deficient mice display impaired coping behaviors during stress. **Genes Brain Behav.**, v.5, n.2, p.131-38, 2006.

COVINGTON, H.E.; MICZEK, K.A. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". **Psychopharmacology (Berl)**, v.158, p.388-98, 2001.

COVINGTON, H.E. 3RD., et al. NMDA receptors in the rat VTA: a critical site for social stress to intensify cocaine taking. **Psychopharmacology (Berl)**, v.197, p.203-16, 2008.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.49(1), p.171-176, 1994.

CRUZ, F.C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C.S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.80, p.411-7, 2005.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide actions in neurochemistry. **Neurochem. Intern.**, v.29, n.2, p.97-110, 1996a.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide neurotoxicity. **J. Chem. Neuroanat.**, v.10, n.3-4, 1996b.

DE ALMEIDA, R.M., et al. 5-HT(1B) receptors, ventral orbitofrontal cortex, and aggressive behavior in mice. **Psychopharmacol. (Berl)**, v.185, n.4, p.441-50, 2006.

DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.526, n.1-3, p.125-39, 2005.

DE BOER, S.F., et al. Somatodendritic 5-HT(1A) autoreceptors mediate the anti-aggressive actions of 5-HT(1A) receptor agonists in rats: an ethopharmacological study with S-15535, alnespirone, and WAY-100635. **Neuropsychopharmacology**, v.23, n.1, p.20-33, 2000.

DE NOVELLIS, V., et al. Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected biccuculine and EAAs in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.269, p.R131-40, 1995.

DE OLIVEIRA, R.M.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. **Neurosci. and Biobehav. Rev.**, v.25, n.1-2, p.679-85, 2001.

DE OLIVEIRA, C.L.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of L-NOARG on plus maze performance in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v.56, n.1, p.55-9, 1997.

DE OLIVEIRA, R.W.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, v.51, n.6, p.457-64, 2000b.

DE OLIVEIRA, R.M.W., et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci. Lett.**, v.289, n.2, p.123-6, 2000a.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Psychopharmacology**, v.5, n.4, p.305-15, 1991.

DEL CARLO JR., M.; LOESER, R.F. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. **Arthritis and Rheumatism**, v.46, p.394-403, 2002.

DEMAS, G.E., et al. Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **J. Neurosci.**, v.19, n.19, p.RC30, 1-5, 1999.

DEVRIES, A.C.; PERT, A. Conditioned increases in anxiogenic-like behavior following exposure to contextual stimuli associated with cocaine are mediated by corticotropin-releasing factor. **Psychopharmacology (Berl)**, v.137, n.4, p.333-40, 1998.

DOMINGUEZ, J.M. et al. Nitric oxide mediates glutamate-evoked dopamine release in the medial preoptic area. **Neuroscience**, v.125, n.1, p.203-10, 2004.

DOREULEE, N., et al., Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. **Brain Res.**, v.964, p.159-63, 2003.

DUNCAN, G.E.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res.**, v.713, n.1-2, p.79-91, 1996.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, p.161-74, 1977.

EBADI, M.; SHARMA, S.K. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Antioxid. Redox Signal**, v.5, p.319-35, 2003.

ELFERING, S.L.; SARKELA, T.M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.38079-86, 2002.

ELKABIR, D.R., et al. The effects of separate or combined infusions of corticotrophin-releasing factor and vasopressin either intraventricularly or into the amygdala on aggressive and investigative behaviour in the rat. **Regul. Pept.**, v.28, n.2, p.199-214, 1990.

ERB, S.; BROWN, Z.J. A role for corticotropin-releasing factor in the long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. **Behav. Brain Res.**, v.172, n.2, p.360-4, 2006.

FACCIDOMO, S.; BANNAI, M.; MICZEK, K.A. Escalated aggression after alcohol drinking in male mice: dorsal raphé and prefrontal cortex serotonin and 5-HT(1B) receptors. **Neuropsychopharmacology**, v.33, n.12, p.2888-99, 2008.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BLANDER, R. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, p.151-73, 1991.

FARDIN, V.; OLIVERAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat I. The production of behavioral side effects together with analgesia. **Brain Res.**, v.306, n.1-2, p.105-23, 1984a.

FARDIN, V.; OLIVERAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat II. Differential characteristics of the analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. **Brain Res.**, v.306, n.1-2, p.125-39, 1984b.

FARIA, M.S., et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur. J. Pharmacol.**, v.323, p.37-43, 1997.

FARROKHI, C., et al. Effects of the CRF1 antagonist SSR125543A on aggressive behaviors in hamsters. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.77, n.3, p.465-9, 2004.

FERRARI, P.F., et al. Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors, aggression, and anxiety. **Physiol. Behav.**, v.63, n.5, p.821-7, 1998.

FERREIRA, A., et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiol. Behav.**, v.77, n.2-3, p.197-204, 2002.

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Res.**, v.1031, n.2, p.151-63, 2005.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central Nervous System mechanisms of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of Pain**, New York: Churchill Livingstone, p.206-17, 1999.

FIGUEIREDO, M.S.L. Classificação. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1^a. ed., p.29-51, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

FLOR, H.; TURK, D.C. Cognitive and learning aspects. In: WALL, P.D.; MELZACK, R (edited by MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M.). **Textbook of Pain**, 5th ed. Edimburgh: Churchill Livingstone, 2006, p. 241-56.

FORSTER, G.L., et al. Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus increases medial prefrontal cortical serotonin via type 2 receptors and median raphe nucleus activity. **Eur. J. Neurosci.**, v.28, n.2, p.299-310, 2008.

FORSTERMANN, U., et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. **Biochem. and Pharmacol.**, v.50, p.1321-32, 1995.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circulation Res.**, v.93, n.2, p.96-105, 2003.

FRISCH, C., et al. Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. **J. Neurosci.**, v.20, p.6694-700, 2000.

GIANCARLONE, E., et al. Brain serotonin metabolism in isolated aggressive mice. **Biochem. Pharmacol.**, v.17, p.1315-27, 1968.

GAMMIE, S.C., et al. Corticotropin-releasing factor inhibits maternal aggression in mice. **Behav. Neurosci.**, v.118, n.4, p.805-14, 2004.

GALLY, J.A., et al., The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.3547-51, 1990.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v.336, p.385-8, 1988.

GAWIN, F.H. Cocaine Addiction: Psychology and Neurophysiology. **Science**, v.251, p.1580-6, 1991.

GHOSH, D.K.; STUEHR, D.J. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. **Biochemistry**, v.34, n.3, p.801-7, 1995.

GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. **Proc. Assoc. Am. Physician.**, v.111, n.1, p.22-34, 1999.

GOLD, P.W., et al. Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. **J. Mol. Psych.**, v.1, n.4, p.257-64, 1996.

GOSS, S.P.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human lowdensity lipoprotein, **J. Biol. Chem.**, v.272, p.21647-53, 1997.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**, p.135-78, São Paulo: Editora Lemos, 1999.

GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: ROTH, M.; BURROUS, G.P.; NOYES, R. **Handbook of anxiety**, Amsterdam: Elsevier, p.307-54, 1990.

GRAEFF, F.G., et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, v.58, n.1-2, p.123-31, 1993.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v.163, p.467-76, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, n.3, p.239-59, 2004.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.21, n.6, p.791-9, 1997.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR, H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WILLER, P. **Biological Psychiatry**, John Wiley & Sons Ltd, p.1-15, 2002.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**, 2^a Ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GRAY, T.S.; MAGNUSON, D.J. Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. **Peptides**, v.13, n.3, p.451-60, 1992.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D.C; BLANCHARD, R.J. Evidence that the behaviors in the Mouse Defense Test Battery relate to different emotional states: a factor analytical study. **Physiol. Behav.**, v.60, n.5, p.1255-60, 1996.

GRIEBEL, G. et al. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.301, n.1, p.333-45, 2002.

GROSSINI, E., et al. The effect of urocortin II administration on the coronary circulation and cardiac function in the anaesthetized pig is nitric-oxide-dependent. **Eur. J. Pharmacol.**, v.578, p.242-8, 2008

GUILLOT, P.V.; CHAPOUTHIER, G. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. **Behav. Brain Res.**, v.77, n.1-2, p.211-3, 1996.

GUIMARÃES, F.S., et al. Anxiolytic effect in the elevated plus maze of NMDA receptor antagonist AP 7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, v.103, p.91-4, 1991.

GUIMARÃES, F.G., et al. Anxiolytic effect of NO synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**, v.5, p.123-6, 1994.

GUIMARÃES, F.S., et al. Role of nitric oxide on brain regions related to defensive reactions. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, n.8, p.1313-22, 2005.

GUIX, F.X., et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog. Neurobiol.**, v.76, p.126-52, 2005.

HABIB, K.E., et al. Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.97, n.11, p.6079-84, 2000.

HALL, C.W.; BEHBEHANI, M.M. Synaptic effect of nitric oxide enkephalinergic, GABAergic and glutamatergic networks of the rat periaqueductal gray. **Brain Res.**, v.805, n.1-2, p.69-87, 1998.

HAMMACK, S. E., et al. Corticotropin-releasing hormone type 2 receptor in dorsal raphe nucleus mediate the behavioral consequence of incontrolable stress. **J.Neurosci.**, v.23, n.3, p.1019-25, 2003.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.327, n.1, p.1-5, 1984.

HANEY, M., et al. Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. **Brain Res.**, v.698, p.46-52, 1995.

HAUGER, R.L., et al. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v.5, n.4, p.453-79, 2006.

HAUL, S., et al. Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase. **J. Neurophysiol.**, v.81, p.494-7, 1999.

HAYWARD, L.F.; SCHWARTZ, C.L.; DAVENPORT, P.W. Respiratory response to activation or disinhibition of the dorsal periaqueductal gray in rats. **J. Appl. Physiol.**, v.94, n.3, p.913-22, 2003.

HERESCO-LEVY, U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.27, n.7, p.1113-23, 2003.

HETEM, L.A. Diagnóstico Diferencial. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1^a. ed., p.191-5, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

HOPPER, R.A.; GARTHWAITE, J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. **J. Neurosci.**, v.26, n.45, p.11513-21, 2006.

HUNTLEY, G.W.; VICKERS, J.C.; MORRISON, J.H. Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. **Trends Neurosci.**, v.17, n.12, p.536-43, 1994.

HYMAN, S.E. Addiction to cocaine and amphetamine. **Neuron**, v.16, n.5, p.901-4, 1996.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; XU, S.; CASEY, R.; ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.15, p.378-84, 1995.

IWASE, K., et al. Induction of endothelial nitric oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n.16, p.11929-33, 2000.

JACQUET, Y.F. The NMDA receptor: central role in pain inhibition in rat periaqueductal gray. **Eur. J. Pharmacol.**, v.154, n.3, p.271-6, 1988.

JAFREY, S.R., et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nat. Cell Biol.**, v.3, n.2, p.193-7, 2001.

JENCK, F.; SCHMIDT, P.; KARLI, P. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: an intensity discrimination study. **Brain Res.**, v.378, n.2, p.274-84, 1986.

JOCHMAN, K.A., et al. Corticotropin-releasing factor-1 receptors in the basolateral amygdala mediate stress-induced anorexia. **Behav. Neurosci.**, v.119, n.6, p.1448-58, 2005.

JOHANSON, C.E.; FISCHMAN, M.W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. **Pharmacol. Rev.**, v.41, p.3-52, 1989.

JONES, D.N., et al. The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.138, n.2, p.124-32, 1998.

KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. **Biol. Psych.**, v.25, p.913-28, 1989.

KANO, T., et al. Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. **Neuroscience**, v.86, n.3, p.695-9, 1998.

KAUPP, U.B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. **Trends in Neuroscience**, v.14, n.4, p.150-7, 1991.

KAVOUSSI, R.; ARMSTEAD, P.; COCCARO, E. The neurobiology of impulsive aggression. **Psychiatr. Clin. North Am.**, v.20, n.2, p.395-403, 1997.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.25, p.669-78, 2001.

KELLY, D.D. Stress induced analgesia. **New York: NY Academy of Sciences**, p.467, 1986.

KHARKEVICH, D.A.; CHURUKANOV, V.V. Pharmacological regulation of descending cortical control of the nociceptive processing. **European J. Pharmacol.**, v.375, n.1-3, p.121-31, 1999.

KINSEY, S.G. et al. Repeated Social Defeat Causes Increased Anxiety-Like Behavior and Alters Splenocyte Function in C57BL/6 and CD-1 Mice. **Brain Behav. Immun.**, v.21, n.4, p.458-66, 2007.

KIRBY, L.G.; RICE, K.C.; VALENTINO, R.J. Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacology**, v.22, n.2, p.148-62, 2000.

KISHIMOTO, T., et al. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nat. Genet.**, v.24, p.415-9, 2000.

KOOB, G.F.; HEINRICHS, S.C. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. **Brain Res.**, v.848, n.1-2, p.141-152, 1999.

KOOB, G.F.; SANNA, P.P.; BLOOM, F.E. Neuroscience of Addiction. **Neuron**, v.21, p.467-76, 1998.

KNOWLES, R.G., et al., Formation of of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, n.13, p.5159-62, 1989.

KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res. Bull.**, v.62, p.505-15, 2004.

LAMMMERS, J.H, et al. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced patterns of locomotion and escape jumps in the Rat. **Brain Res.**, v.449, p.294-310, 1988.

LAMPREA, M.R., et al. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Res**, v.950, n.1-2, p.186-94, 2002.

LANG, P.J.; BRADLEY, M.M.; CUTHBERT, B.N. Emotions, motivation and anxiety: Brain mechanisms and psychophysiology. **Biol. Psychiatry**, v.44, n.12, p.1248-63, 1998.

LARIVIERE, W.R.; MELZACK, R. The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia. **Pain**, v.84, n.1, p.1-12, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.N. Animals models of nociception. **Pharmacol. Biochem. Rev.**, v.53, n.4, p.597-62, 2001.

LEE, C.; RODGERS, R.J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Behav. Pharmacol.**, v.2, n.6, p.491-6, 1991.

LEE, S.; KIM, C.K.; RIVIER, C. Nitric oxide stimulates ACTH secretion and the transcription of the genes Encoding for NGFI-B, corticotropin-releasing factor, corticotropin-releasing factor Receptor type 1, and vasopressin in the hypothalamus of the intact rat. **J. Neurosci.**, v.19, n.17, p.7640-7,1999.

LEE, C.; RODGERS, R.J. Antinociceptive effects of plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology**, v.102, p.507-13, 1990.

LENOIR, M.; AHMED, S. H. Heroin-induced reinstatement is specific to compulsive heroin use and dissociable from heroin reward and sensitization. **Neuropsychopharmacology.**, v.32, p.616-24; 2007.

LI, H.; POULOS, T.L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **J. Inorganic Biochem.**, v99, p.293-305, 2005.

LIN, H.C., et al. Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarii of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.407, n.1-2, p.83-9, 2000.

LIU, J.; YU, B.; Corticotropin-releasing factor and Urocortin I modulate excitatory glutamatergic synaptic transmission. **Neuroscience.**, v.24, n.16, p.4020-9, 2004.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, p.180-5, 1987.

LINNOILA, V.M.; VIRKKUNEN, M. Aggression, suicidality, and serotonin. **Clin. Psychiatry.**, v.53 Suppl, p.46-51, 1992.

LITVIN, Y., et al. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **Hor. Behav.**, v.52, n.2, p.244-51, 2007.

LOHSE, M.J.; FORSTERMANN, U.; SCHMIDT, H.H.H.W. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.358, p.111-2, 1998.

LOVENBERG, T.W., et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.836-40, 1995.

LOVICK, T.A. Panic disorder a malfunction of multiple control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? **Neuroscientist**, v.6, p.48-58, 2000.

LOVICK, T.A.; PAUL, H.L. Co-localization of GABA with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurones in the dorsolateral periaqueductal grey matter of the rat. **Neurosci Lett.**, v.272, n.3, p.167-70, 1999.

LU, L., et al. Dopamine-dependent responses to cocaine depend on corticotropin-releasing factor receptor subtypes. **J. Neurochem.**, v.84, n.6, p.1378-86, 2003.

LUKES, J.L., et al. Corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in the dorsal raphe differentially affect serotonin release in the nucleus accumbens. **Eur. J. Pharmacol.**, v.578, n.2-3, p.185-93, 2008.

LUKES, J., et al. Corticotropin-releasing factor receptor antagonism within the dorsal raphe nucleus reduces social anxiety-like behavior after early-life social isolation. **J. Neurosci.**, v.29, n.32, p.9955-60, 2009.

MARI, J.J.; JORGE, M.R. Transtornos psiquiátricos na clínica geral. **Psychiatry on line in Brazil**. Current Issues (2), 1997.

MARIN, M. T.; PLANETA, C. S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. **Brain Res.**, v.1013, p.83-90, 2004.

MARINI, F., et al. Single exposure to social defeat increase corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus. **Brain Res.**, v.1067, p.25-35, 2006.

MARROW, L.P., et al. Encounters with aggressive conspecifics enhance the locomotor-activating effects of cocaine in the rat. **Ad. Biol.**, v.4, p.437-41, 1999.

MARTINS, A.P.; MARRAS, R.A.; GUIMARÃES, F.S. Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal gray. **Neuroreport**, v.8, p.3601-4, 1997.

MARTINS, A.P.; MARRAS, R.A.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of a CRH receptor antagonist in the dorsal periaqueductal gray. **Depress. Anxiety**, v.12, p.99-101, 2000.

MATHEUS, M.G.; GUIMARÃES, F.S. Antagonism of the non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v.132, p.14-8, 1997.

MATSUDA, S., et al. Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. **Neurosci. Res.**, v.26, p.157-70, 1996.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; HERBERT, J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. **Stress**, v.5, p.3-13, 2002.

MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.358, p.127-33, 1998.

MAYER, B., et al. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. Brain nitric oxide is a multi-functional oxido-reductase. **FEBS Lett.**, v.288, p.187-91, 1991.

McDOUGALL, A.; DAMPNEY, R.; BANDLER, R. Cardiovascular components of the defence reaction evoked by excitation of neuronal cell bodies in the midbrain periaqueductal grey of the cat. **Neurosci. Lett.**, v.60, n.1, p.69-75, 1985.

McMILLAN, K.; MASTERS, B.S. Prokaryotic expression of heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. **Biochemistry**, v.34, n.11, p.3686-93, 1995.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.28, 285-305, 2004.

MEERLO, P., et al. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. **J. Neuroendocrinol.**, v.11, p.925-33, 1999.

MEERLO, P., et al. Changes in behavior and body weight following a single or double social defeat in rats. **Stress**, v.1, p.21-32, 1996.

MELE, A., et al. Effects of corticotropin releasing factor and sauvagine on social behavior of isolated mice. **Peptides**, v.8, n.5, p.935-8, 1987.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav. Brain Res.**, v.203, n.2, p.180-7, 2009.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.**, v.1047, n.1, p.97-104, 2005.

MERCHANTHALER, I. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. **Peptides**, v.5, p.53-69, 1984.

MICZEK, K.A. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: Differential effects of d-amphetamine and cocaine. **Psychopharmacology**, v.60, p.253-59, 1979.

MICZEK, K.A., et al. Aggression and defeat: persistent effects on cocaine self-administration and gene expression in peptidergic and aminergic mesocorticolimbic circuits. **Neurosci. Behav. Rev.**, v.27, p.787-802, 2004.

MICZEK, K.A.; CONVINGTON, H.E.; YAP, J.J. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacol. Ther.** v.120, n.2, p.122-8, 2008.

MICZEK, K.A., et al. d-amphetamine "cue" generalizes to social defeat stress: behavioral sensitization and attenuated accumbens dopamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v.147, p.190-9, 1999.

MICZEK K.A, et al. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. **Psychopharmacology (Berl)**, v.121, n.1, p.38-56, 1995.

MICZEK, K.A. Intraspecies aggression in rats: effects of d-amphetamine and chlordiazepoxide. **Psychopharmacologia**, v.39, n.4, p.275-301, 1974.

MICZEK, K.A.; O'DONNELL, J.M. Alcohol and chlordiazepoxide increase suppressed aggression in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.69, n.1, p.39-44, 1980.

MICZEK, K.A.; THOMPSON, M.L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science**, v.214, p.1520-2, 1982.

MIGUEL, T.T. **Antinociceção induzida pelo medo**: efeito da inibição da óxido nítrico sintase na matéria cinzenta periaquedutal de camundongos. 2006. 105 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Defensive behavior and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray depend on nitric oxide synthesis. **Brain Res.**, v.1076, p.42-8, 2006.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, v.66, p.355-474, 2002.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v.57, p.1-164, 1999.

MILAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, v.70, p.83-244, 2003.

MISERENDINO, M.J.; NESTLER, E.J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Res.**, v.674, p.299-306, 1995.

MOLCHANOV, M.L.; GUIMARAES, F.S. Anxiolytic-like effects of AP-7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.160, n.1, p.30-8, 2002.

MOREIRA, F.A.; MOLCHANOV, M.L.; GUIMARAES, F.S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.171, n.2, p.199-203, 2004.

MORGAN, M.M.; WHITNEY, P. K.; GOLD, M.S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal region of the rat periaqueductal gray. **Brain Res.**, v.804, p.159-166, 1998.

MOS, J.; OLIVIER, B.; VAN OORSCHOT, R. Maternal aggression towards different sized male opponents: effect of chlordiazepoxide treatment of the mothers and d-amphetamine treatment of the intruders. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.26, n.3, p.577-84, 1987.

MUNGRUE, I.M., et al. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? **Acta Physiol. Scand.**, v.179, p.123-35, 2003.

NAKANE, M., et al. Phosphorylation by calcaim calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.180, n.3, p.1396-402, 1991.

NAKAMURA, T; GOLD, G.H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. **Nature**, v.325, n.6103, p.442-4, 1987.

NEDERGAARD, M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. **Science**, v.263, n.5154, p.1768-71, 1994.

NESTLER, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat. Neurosci.**, v.11, p.1445-9, 2005.

NEWMAN, I.D.; VEENEMA, A.H.; BEIDERBECK, D.I. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. **Front. Behav. Neurosci.**, v.4, p.1-16, 2010.

NIKULINA, E.M., et al. Behavioral sensitization to cocaine after a brief social stress is accompanied by changes in fos expression in the murine brainstem. **Brain Res.**, v.810, p.200-10, 1998.

NIKULINA, E.M.; MICZEK, K.A. Post- vs presynaptic sites of action of 5HT1A and 5HT1B receptor agonists in regulation of mouse aggressive behavior. **Behav. Pharmacol.**, v.10, p.S67, 1999.

NISHIKAWA, H., et al. A role of corticotropin-releasing factor in repeated cold stress-induced anxiety like behavior during forced swimming and elevated plus-maze test in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v.27, n.3, p.352-6, 2004.

NOWICKY, A.V.; BINDMAN, L.J. The nitric oxide synthase inhibitor, N-monomethyl-L-arginine blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons in vitro. **J. Neurophysiol.**, v.70, p.1255-9, 1993.

NUNES-DE-SOUZA, R.L, et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v.150, n.3, p.300-10, 2000.

NYBERG, J.M.; VEKOVISCHEVA, O.; SANDNABBA, N.K. Anxiety profiles of mice selectively bred for intermale aggression. **Behav. Genet.**, v.33, n.5, p.503-11, 2003.

O'BRIEN, C.P., et al. Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? **J. Psychopharmacol.**, v.12, p.15-22, 1998.

OKADA, D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. **J. Neurochem.**, v.59, n.4, p.1203-10, 1992.

OLIVIER, B. Serotonin and aggression. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1036, p.382-92, 2004.

OLIVIER, B.; VAN OORSCHOT, R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. **Eur. J. Pharmacol.**, v.526, n.1-3, p.207-17, 2005.

ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A.J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat analysis using laser with focal microscopy. **Brain Res.**, v.610, n.2, p.317-24, 1993.

PAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. **Ann. Med.**, v.27, n.3, p.369-77, 1995.

PALANZA, P., et al. Effects of chlordiazepoxide on maternal aggression in mice depend on experience of resident and sex of intruder. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.54, n.1, p.175-82, 1996.

PANDOSSIO, J.E.; MOLINA, V.A.; BRANDAO, M.L. Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test. **Behav. Brain Res.**, v.109, n.1, p.19-25, 2000.

PATON, J. F.; KASPAROV, S.; PATERSON, D.J. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. **Trends Neurosci.**, v.25, p.626-31, 2001.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, California, USA, 2001.

PELLOUX, Y. ; COSTENTIN, J. ; DUTERTE-BOUCHER, D. Anxiety increases the place conditioning induced by cocaine in rats. **Behav. Brain Res.**, v.117, p.311-6, 2009.

PELLOW, S., et al. M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v.14, p.149-67, 1985.

PERRIN, M., et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.2969-73, 1995.

PICHOT, P. Panic: attaque et trouble. Historique du mot et des concepts. *L'encéphale*, V:3-8, 1996. *Apud* HETEM, L.A.B., 2004. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1^a. ed., p.3-27, 2004.

PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Mol. Brain Res.**, v.18,n.3, p.195-200, 1993.

PRADO, W.A. Medicamentos analgésicos de ação central. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. Atheneu: São Paulo, 1999, p. 175-95.

PRAST, H., et al. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.354, n.6, p.731-5, 1996.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as a modulator of neuronal function. **Prog. Neurobiol.**, v.64, p.51-9, 2001.

PRICE, M.L., et al. Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. **Neuropsychopharmacology.**, v.18, n.6, p.492-502, 1998.

PRZEGALINSKI, E., et al. Effects of CP 154,526, a CRF1 receptor antagonist, on behavioral responses to cocaine in rats. **Neuropeptides**, v.39, n.5, p.525-33, 2005.

PULLIAM, J.V.K., et al. Social defeat stress produces prolonged alterations in acoustic startle and body weight gain in male Long Evans rats. **J. Psych. Res.**, v.44, p.106-11, 2010.

RABER, J.; KOOB, G.F.; BLOOM, F.E. Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.272, n.2, p.815-24, 1995.

KARANTH, S.; LYSON, K.; McCANN, S.M. Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, n.8, p.3383-7, 1993.

RADI, R., et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch. Biochem. and Biophys.**; v.288, p.481-7, 1991.

RAJA, S.N., et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: WALL, P.D.; MELZACK, R (edited by MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M.). **Textbook of Pain**, 5th ed. Edimburgh: Churchill Livingstone, 2006, p.3-33.

REIF, A., et al. Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. **Eur. J. Neurosci.**, v.20, p.885-95, 2004.

REMIE, R.; VAN DONGEN, J.J.; RENSEMA, J.W. Permanent cannulation of the jugular vein (acc. to Steffens). In: VAN DONGEN, J.J., et al. **Manual of microsurgery on the laboratory rat**, v.4. Elsevier, Amsterdam, p.159–69, 1990.

RESNICK, R.B.; RESNICK, E.B. Cocaine abuse and its treatment. **Psychiat. Clin. North Am.**, v.7, n.4, p.713-28, 1984.

RICHARDS, M.K.; MARLETTA, M.A. Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. **Biochemistry**, v.33, n.49, p.14723-32, 1994.

RICHARDSON, N.R.; ROBERTS, D.C.S. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. **J. Neurosci.**, v.66, p.1-11, 1996.

ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res Rev.**, v.396, p.157-98, 1986.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v.96, n.1, p.103-14, 2001.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res. Rev.**, v.18; p.247-91, 1993.

ROCHES, K.E.; LESHNER, A.I. ACTH and vasopressin treatments immediately after a defeat increase future submissiveness in male mice. **Science**, v.204, p.1343-4, 1979.

RODAROS, D. et al. Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v.150, p.8-13, 2007.

RODGERS, R.J., et al. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus maze: profile and comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. **Behav. Pharmacol.**, v.3, n.6, p.621-34, 1992.

RODGERS, R.J. Neuropharmacological Aspects of Adaptive Pain Inhibition in Murine "Victims" of Aggression. **Aggres. Behav.**, v.21, p.29-39, 1995.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDRIE, C.A. **Ethology and Psychopharmacology**, p.9-44, 1994.

RODGERS, R.J.; LEE, C.; SHEPHERD, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology (Berl)**, v.106, n.1, p.102-10, 1992.

ROGERIO, R.; TAKAHASHI, R.N. Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.43, p.631-3, 1992.

ROSEN, J.B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol. Rev.**, v.105, n.2, p.325-50, 1998.

SANDNABBA, N.K. Territorial behavior and social organization as a function of the level of aggressiveness in male mice. **Ethology**, v.103, p.566-77, 1997.

SAHUQUE, L.L., et al. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology (Berl)**, v.186, n.1, p.122-32, 2006.

SALERNO, J.C., et al. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chemistry**; v.272, p.29769-77, 1997.

SARNYAI, Z. Brain corticotropin-releasing factor mediates 'anxiety-like' behavior induced by cocaine withdrawal in rats. **Brain Res.**, v.657, p.89-97, 1995.

SAWCHENKO, P.E., et al. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. **Prog Brain Res.**, v.107, p.201-22, 1996.

SCHENBERG, L.C., et al. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, p.1279-98, 2005.

SCHMIDT, H.H.; LOHMANN, S.M.; WALTER, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1178, n.2, p.153-75, 1992.

SCHUMAN, E.M., et al. An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.11958-62, 1994.

SECCIA, M. et al. Inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation by nitric oxide: a study using donors with different half-time of NO release. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.220, n.2, p.306-9, 1996.

SEEBURG, P.H. The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.14, n.8, p.297-303, 1993.

SHAHAM, Y.; ERB, S.; STEWART, J. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. **Brain Res. Rev.**, v.33, n.1, p.13-33, 1999.

SHENG, H.; HUGHES, M.L.; MURAD, F.; BRIGGS, C.A. Evidence that nitric oxide mediates the cyclic GMP response to synaptic activity in the rat superior cervical ganglion. **Brain Res.**, v.597, n.2, p.343-5, 1992.

SHIPLEY, M.T., et al. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: R. Bandler. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. Plenum Press., New York, p.417-48, 1991.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H.R.; NUNES DE SOUZA, R.L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse: Role of endogenous opioidis. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.14, n4, p.481-90, 1990.

SILVEIRA, M.C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F.G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.**, v.56, n.1, p.115-8, 1993.

SILVEIRA M.C.L.; GRAEFF, F.G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABA A receptor agonist. **Behav. Neural Biol.**, v.157, p.226-32, 1992.

SISTIAGA, A.; MIRAS-PORTUGAL, M.T.; SÁNCHEZ-PRIETO, J. Modulation of glutamate release by a nitric oxide/cyclic GMP-dependent pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v.321, n.2, p.247-57, 1997.

SKORZEWSKA, A., et al. The effect of CRF and a-helical CRF(9–41) on rat fear responses and amino acids release in the central nucleus of the amygdala. **Neuropharmacology**, v.57, p.148-56, 2009.

SMITH, G.W., et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. **Neuron**, v.20, p.1093-102, 1998.

SOUTHAM, E.; EAST, S.J.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. **Journal of Neurochem.**, v.56, n.6, p.2072-81, 1991.

SPOTTS JV, SHONTZ FC Drug-induced ego states. I. Cocaine: phenomenology and implications. **Int. J. Addict.**, v.19, p.119-51, 1984.

STAUB, D.R.; EVANS, A.K.; LOWRY, C.A. Evidence supporting a role for corticotropin-releasing factor type 2 (CRF2) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. **Brain Res.**, v.1070, p.77-89, 2006.

STECKLER, T.; HOLSBOER, F. Enhanced conditioned approach responses in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. **Behav. Brain Res.**, v.102, p.151-63, 1999.

STENZEL-POORE, M.P.; HEINRICHS, S.C.; RIVEST, S.; KOOB, G.F.; VALE, W.W. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a model of anxiogenic behavior. **J. Neurosci.**, v.14, n.5, p.2579-84, 1994.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology (Berl)**, v.90, n.2, p.166-9, 1986.

STUEHR, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1411, p.217-30, 1999.

STUEHR, D.J.; GRIFFITH, O.W. Mammalian nitric oxide synthases. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.65, p.287-346, 1992.

SWANSON, L.W., et al. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v.36, p.165-86, 1983.

SUDA, T., et al. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. **Peptides**, v.25, n.10, p.1689-701, 2004.

TAKAHASHI, A.; DEBOLD, J.F.; MICZEK, K.A. Dorsal raphe nucleus inactivation by GABA receptor agonists enhances inter-male aggression in mice. In: 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C., USA, 2008.

TAKAHASHI, L.K., et al. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Res.**, v.902, p.135-42, 2001.

TAUKULIS, H.K.; GOGGIN, C.E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. **Behav. Neural. Biol.**, v.53, p.205-16, 1990.

TERMAN, G.W., et al. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. **Science**, v.226, n.4680, p.1270-7, 1984.

TERUI, K., et al. Coronary vasodilatation and positive inotropism by urocortin in the isolated rat heart. **J. Endocrinol.**, v.169, p.177-83, 2001.

TIMPL, P., et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. **Nat. Genet.**, v.19, p.162-6, 1998.

THOMSEN, M.; CAINE, S.B. Intravenous self-administration in mice: Practical consideration, **Behav. Gen.**, v.37, p.101-18, 2007.

TORNATZKY, W.; MICZEK, K.A. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. **Physiol. Behav.**, v.53, p.983-93, 1993.

TRABACE, L.; KENDRICK, K.M. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. **J. Neurochem.**, v.75, n.4, p.1664-74, 2000.

VALE, W., et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science.**, v.213, n.4514, p.1394-7, 1981.

VAN DER VEGT, B.J., et al. Enhanced sensitivity of postsynaptic serotonin-1A receptors in rats and mice with high trait aggression. **Physiol. Behav.**, v.74, n.1-2, p.205-11, 2001.

VAN GAALLEN, M.M., et al. Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. **Eur. J. Neurosci.**, v.15, n.12, p.2007-15, 2002.

VAN PETT, K., et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **J. Comp. Neurol.**, v.428, p.191-212, 2000.

VIANA, M.B.; GRAEFF, F.G.; LÖSCHMANN, P.A. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.58, n.1, p.167-72, 1997.

VINCENT, S.R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of the nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v.46, p.755-84, 1992.

VITA, N., et al. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotropin releasing factor receptors. **FEBS Lett.**, v.335, p.1-5, 1993.

WANAT, M.J., et al. Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of Ih. **J. Physiol.**, v.586, n.8, p.2157-70, 2008.

WANG, B., et al. Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. **Neuroscience**, v.25, n.22, p.5389-96, 2005.

WILBERT-LAMPEN, U., et al. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: A potential link between stress and endothelial dysfunction? **J. Psychoss. Res.**, v.61, p.453-60, 2006.

WILSON, T., et al. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. **Science**, v.252, p.1296-300, 1991.

WOOD, P.L., et al. Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate-quisqualate and kainate-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. **J. Neurochem.**, v.55, p.346-8, 1990.

YAP, J.J., et al. Behavioral sensitization due to social defeat stress in mice: antagonism at mGluR5 and NMDA receptors. **Psychopharmacology.**, v.179, p.230-9, 2005.

YAP, J.J.; MICZEK, K.A. Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.192, p.261-73, 2007.

YUN, H.Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Mol. Psych.**, v.2, n.4, p.300-10, 1997.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1^a. ed., p.55-73, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

APÊNDICE

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice

Tarciso Tadeu Miguel^a, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza^{a,b,*}^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar, Rod. Araraquara-Jau, km 01, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil^bLab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rod. Araraquara-Jau, km 01, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 23 August 2008

Available online 4 September 2008

Keywords:

NMDA receptor

Anxiety

Nitric oxide

nNOS

Periaqueductal gray

Mice

ABSTRACT

Glutamate-NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor activation within the periaqueductal gray (PAG) leads to antinociceptive, autonomic and behavioral responses characterized as the fear reaction. We have recently demonstrated that the vigorous defensive-like behaviors (e.g. jumping and running) and antinociception induced by intra-PAG injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) were completely blocked by prior infusion of N^ω-propyl-L-arginine (NPLA), a specific neuronal nitric oxide synthesis (nNOS) enzyme inhibitor, into the same midbrain structure. It remains unclear however, whether the inhibition of nNOS within the mouse PAG changes the anxiety-like behavior *per se* or the effects of the inhibition of nNOS depend on the suppression of downstream of glutamate-NMDA receptor activation. This study investigated whether intra-PAG infusion of NPLA (i) attenuates anxiety in the elevated plus-maze (EPM) and (ii) antagonizes the anxiogenic-like effects induced by intra-PAG injection of NMDA. Test sessions were videotaped and subsequently scored for conventional indices of anxiety (percentage of open arm entries and percentage of open arm time) and locomotor activity (closed arm entries). Results showed that intra-PAG infusions of NPLA (0.2, 0.4 or 0.8 nmol/0.1 μl) did not alter significantly any behavioral response in the EPM when compared to control group (Experiment 1). Intra-PAG infusion of NMDA (0 and 0.02 nmol/0.1 μl; a dose that does not provoke vigorous defensive behaviors *per se* in mice) significantly reduced open arm exploration, confirming an anxiogenic-like effect (Experiment 2). When injected into the PAG 10 min prior local NMDA injection (0.02 nmol/0.1 μl), NPLA (0.4 nmol/0.1 μl) was able to revert the anxiogenic-like effect of glutamate-NMDA receptor activation. Neither intra-PAG infusion of NMDA nor NPLA altered closed arm entries, a widely used measure of locomotor activity in the EPM. These results suggest that intra-PAG nitric oxide synthesis

* Corresponding author. Lab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rod. Araraquara-Jau, km 01, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. Fax: +55 16 3301 6980.

E-mail address: souzar@fcar.unesp.br (R.L. Nunes-de-Souza).

Abbreviations: NADPHnicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NMDAN-methyl-D-aspartate; NPLAN^ω-propyl-L-arginine; NOnitric oxide; NOSnitric oxide synthase; eNOSendothelial nitric oxide synthase; iNOSinducible nitric oxide synthase; nNOSneuronal nitric oxide synthase; PAGPeriaqueductal gray; dPAGdorsal periaqueductal gray; dlPAGdorsolateral periaqueductal gray; EPMelevated plus-maze; AP-72-amino-7-phosphonoheptanoic acid; CNScentral nervous system; AMPAα-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; RETrat exposure test

does not play a role on anxiety-like behavior elicited during EPM exposure; however its synthesis is important for the proaversive effects produced by activation of glutamate-NMDA receptors located within this limbic midbrain structure.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrical or chemical stimulation of the midbrain periaqueductal gray (PAG) elicits autonomic (e.g., tachycardia, defecation) and behavioral (e.g., jumping, running, immobility) responses characterized as fear reaction. In addition, many lines of evidence have indicated that besides fundamentally controlling fear-like responses—fight and flight (for review, see Graeff, 2004), the PAG modulates less vigorous defensive responses related to anxiety such as threat avoidance and risk assessment (Teixeira and Carobrez, 1999; McNaughton and Corr, 2004; Mendes-Gomes and Nunes-de-Souza, 2005; Bertoglio and Zangrossi, 2006; Carvalho-Netto et al., 2007).

Chemical stimulation of the PAG can be carried out by local glutamate-NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor activation, for example with the exogenous excitatory amino acid N-methyl-D-aspartate (NMDA). When injected into the dorsal columns of the PAG (dPAG), NMDA elicits fight and flight reactions in rats (e.g., Bandler, 1988; Bittencourt et al., 2004) and mice (e.g., Miguel and Nunes-de-Souza, 2006), whereas local microinjection of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP-7), a competitive NMDA receptor antagonist, produces antiaversive-like effects in the elevated plus-maze test (EPM; Guimarães et al., 1991), a widely used animal model of anxiety.

Glutamate is a ubiquitous excitatory amino acid in the CNS. Besides activates the ionotropic NMDA receptor, glutamate also activates other two ion channel coupled receptors, the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor and kainate receptor (Heresco-Levy, 2003; Ozawa et al., 1998; Huntley et al., 1994; Seeburg, 1993) and a G-protein coupled receptor (metabotropic receptor). These receptors are largely expressed in the PAG (Schubert et al., 1996; Onstott et al., 1993; Albin and Gilman, 1990). Glutamate-NMDA receptor activation leads to cellular calcium influx which triggers a cascade of intracellular events including activation of nitric oxide synthase (NOS), enzyme that produces nitric oxide (NO) by conversion of L-arginine to L-citroline, having NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) and Ca^{2+} as co-factors (Heresco-Levy, 2003; Mayer et al., 1991; Garthwaite et al., 1989). There are at least three NOS isoforms: an inducible (iNOS) involved in immunological reactions, activated by factors released in pathological events, such as cytokines that can induce large releasing of NO. Two other NOS are constitutive forms, which are present in vasa endothelium (endothelial NOS—eNOS) and in neurons (neuronal NOS—nNOS) (Guix et al., 2005; Mungrue et al., 2003; Prast and Philippu, 2001; Lamas et al., 1992).

Similarly to the proaversive effects produced by glutamate-NMDA receptor agonists, injection of NO donors into the dorsolateral column of the PAG (dlPAG) produces fight and flight reactions in rats (De Oliveira et al., 2000). On the other hand, administration in this same region of NOS inhibitors, guanylate cyclase inhibitors and a NO scavenger (Guimarães

et al., 2005; De Oliveira and Guimarães, 1999; Guimarães et al., 1994) provokes anxiolytic-like effects in the EPM.

In a recent study Miguel and Nunes-de-Souza (2006) showed that intra-PAG injection of N^ω-propyl-L-arginine (NPLA), a specific nNOS inhibitor, completely blocked the vigorous defensive behavioral reactions (e.g., jumping, running, immobility) and antinociception induced by NMDA infusion into the same site in mice. However, it remains unclear whether the inhibition of nNOS within the mouse PAG changes the anxiety-like behavior *per se* or the effects of the inhibition of nNOS depend on the suppression of downstream of glutamate-NMDA receptor activation. This study investigated whether intra-PAG infusion of NPLA (i) attenuates anxiety in the elevated plus-maze and (ii) antagonizes the anxiogenic-like effects induced by intra-PAG injection of NMDA (at a dose that does not provoke vigorous defensive behaviors *per se* in mice).

2. Results

Histology confirmed that a total of 108 mice had cannula placements in the PAG (Fig. 1). Forty-six mice were used in the Experiment 1 [Saline ($n=15$), NPLA 0.2 nmol ($n=12$), 0.4 nmol ($n=10$), 0.8 nmol ($n=9$)], 31 mice were used in the Experiment 2 [Saline ($n=15$) and NMDA 0.02 nmol ($n=16$)] while 31 mice were used in the Experiment 3 [saline + saline ($n=8$), saline + NMDA ($n=8$), NPLA + saline ($n=7$), NPLA + NMDA ($n=8$)].

2.1. Experiment 1: lack of effects of intra-PAG injection of NPLA on the behavior of mice in the EPM

Fig. 2 shows that intra-PAG injection of NPLA (0, 0.2, 0.4 or 0.8 nmol/0.1 μl) neither changed the anxiety indices [one-way ANOVA for percent open arm entries ($F_{3,42}=0.65$, $p>0.05$), percent open arm time ($F_{3,42}=0.53$, $p>0.05$)] nor affected locomotor activity [one-way ANOVA for closed arm entries ($F_{3,42}=1.54$, $p>0.05$)] in the EPM.

2.2. Experiment 2: anxiogenic-like effects of intra-PAG injection of NMDA in mice exposed to the EPM

The effects of intra-PAG injection of NMDA (0.02 nmol/0.1 μl) on the behavior of mice exposed to the EPM are shown in Fig. 3. Student t-test revealed that injection of NMDA into the PAG decreased percent of open arm entries [t-test (29)=2.16, $p<0.05$] and percent open arm time [(t-test (29)=3.00, $p<0.05$)] while did not significantly change closed arm entries [(t-test (29)=−0.59, $p>0.05$)].

2.3. Experiment 3: blockade of the intra-PAG NMDA anxiogenic-like effects produced by prior local infusion of NPLA

Fig. 4 shows the effects of intra-PAG NPLA pretreatment on anxiogenic-like responses to local infusion of NMDA. Two-

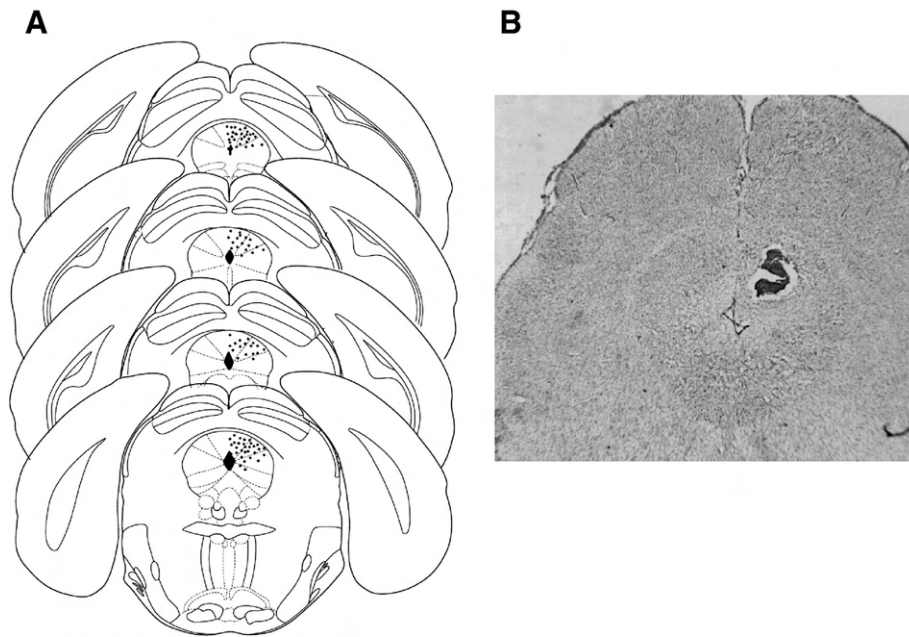


Fig. 1 – (A) A schematic representation of microinfusion sites within the midbrain periaqueductal gray (PAG) of the mouse. The number of points in the figure is less than the total number of mice because of the overlaps. **(B)** Photomicrograph of midbrain coronal section from a representative subject showing an injection site into the PAG. Section corresponds to -4.24 mm from bregma in the atlas of Paxinos and Franklin (2001).

way ANOVA revealed no significant effects for NPLA pretreatment factor on anxiety indices [percent open arm entries ($F_{1,27}=0.38$; $p>0.05$), percent open arm time ($F_{1,27}=0.37$;

$p>0.05$)] and locomotor activity [closed arm entries ($F_{1,27}=1.39$; $p>0.05$)], however showed significant differences for NMDA treatment factor [percent open arm entries ($F_{1,27}=5.18$;

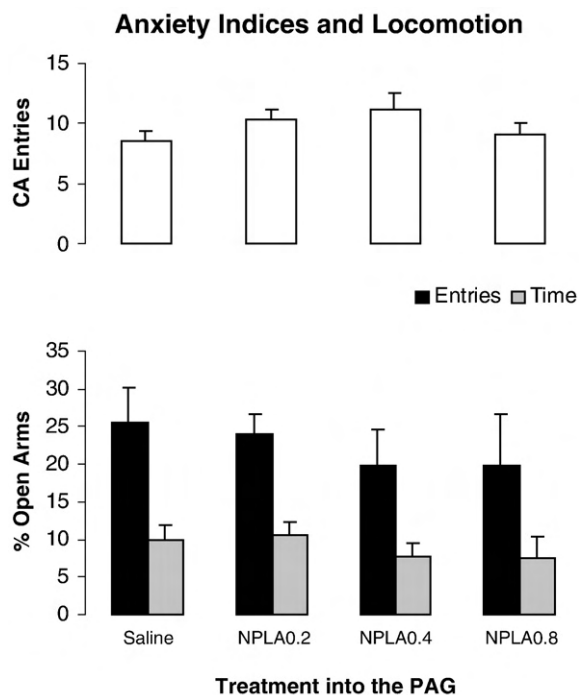


Fig. 2 – Effects of NPLA microinjection (0, 0.2, 0.4 or 0.8 nmol/0.1 μ l; $n=9-15$) into the PAG on closed arm entries, percent open arm entries and percent open arm time in the EPM. Data are presented as mean values ($\pm$ SEM).

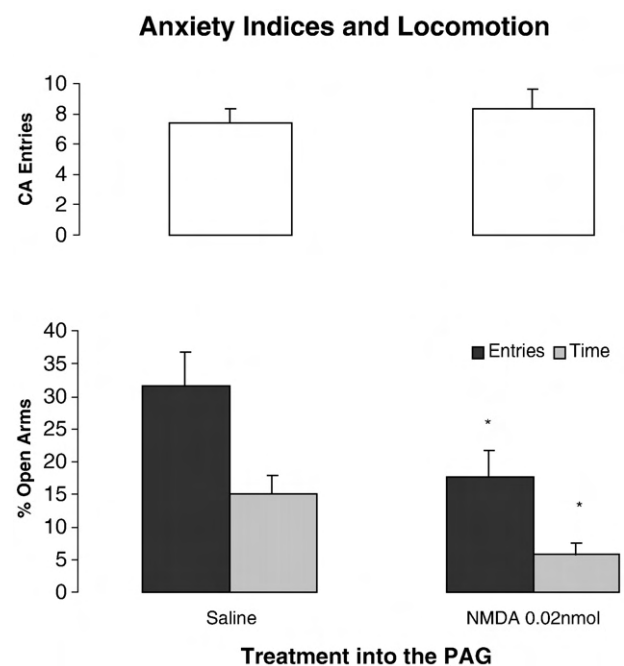


Fig. 3 – Effects of NMDA microinjection (0 or 0.02 nmol/0.1 μ l; $n=15-16$) into the PAG on closed arm entries, percent open arm entries and percent open arm time in the EPM. Data are presented as mean values ($\pm$ SEM). * $p<0.05$ compared to control group (saline).

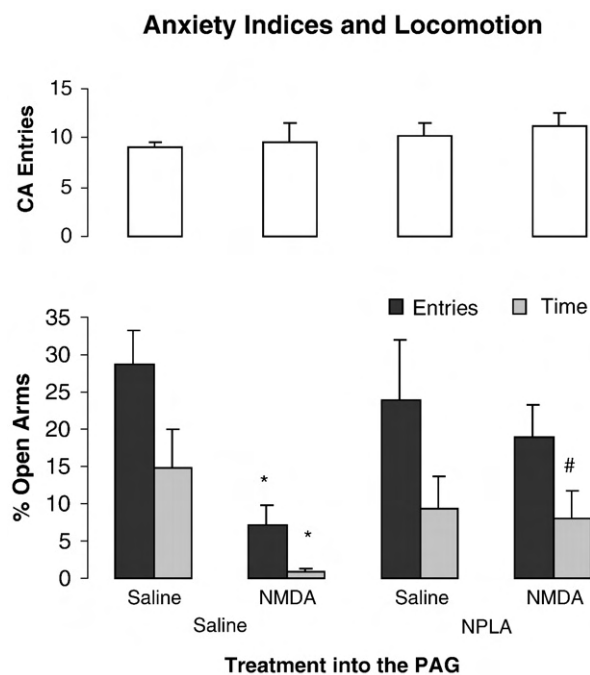


Fig. 4 – Effects of combined microinfusions of NPLA (0 or 0.4 nmol/0.1 μ l) and NMDA (0 or 0.02 nmol/0.1 μ l) into the PAG on closed arm entries, percent open arm entries and percent open arm time in the EPM. Data are presented as mean values ($\pm$ SEM). $n=7-8$. * $p<0.05$ versus control (saline+saline) condition group; # $p<0.05$ versus saline+NMDA condition.

$p<0.05$), percent open arm time ($F_{3,27}=7.08$; $p<0.05$) as well as for NPLA pretreatment $\times$ NMDA treatment interaction [percent open arm entries ($F_{1,27}=4.51$; $p<0.05$), percent open arm time ($F_{1,27}=5.01$; $p<0.05$)] on anxiety indices. Post hoc between group comparisons revealed that both percent open arm entries and percent open arm time were significantly reduced by intra-PAG NMDA (saline+NMDA) injection compared to control group (saline+saline, $p<0.01$). In addition, intra-PAG NPLA pretreatment attenuated or completely blocked responses to NMDA (percent open arm entries $p=0.06$; percent open arm time $p<0.01$, respectively). Importantly, no significant effects for NMDA treatment factor or NPLA pretreatment $\times$ NMDA treatment interaction were observed for closed arm entries ($F_{1,27}=0.0$, $p>0.05$ and $F_{1,27}=0.22$, $p>0.05$, respectively).

3. Discussion

The main results of the present study indicate that the defensive behavior elicited by EPM exposure does not depend on NO synthesis within the mouse PAG. However, the anxiogenic-like effect induced by intra-PAG injection of NMDA is attenuated or completely blocked by local inhibition of nNOS, suggesting the anxiogenic role of NO is related to activation of glutamate-NMDA receptor in this midbrain structure in mice.

It has been emphasized in the literature a dual role of NO on anxiety and defensive reaction. Supporting the anxiogenic

hypothesis are studies demonstrating that systemic or central injections of different NOS inhibitors were able to induce anxiolytic-like effects in different anxiety tests including the EPM (Volke et al., 1995; Guimarães et al., 1994; Forestiero et al., 2006; Miguel and Nunes-de-Souza, 2006). On the other hand, antianxiety-like effect of NO has also been proposed (Quock and Nguyen, 1992; De Oliveira et al., 1997; Kittner et al., 2003). A dual profile of NO has been emphasized not only for emotional states. For instance, a bidirectional role of NO has been reported for nociception (Sousa and Prado, 2001; Prado et al., 2002) and neurotoxicity (Dawson et al., 1993; Prast and Philippu, 2001). In the present study inhibition of NO synthesis within the mouse PAG *per se* neither increased nor decreased anxiety assessed in the EPM (Exp. 1). Considering that intra-PAG infusion of 0.4 nmol NPLA completely blocked vigorous defensive-like behaviors (e.g. jumping and running) induced by NMDA (0.04 nmol) infusion into the same site (Miguel and Nunes-de-Souza, 2006) it is intriguing that intra-PAG NPLA infusions of this nNOS inhibitor at doses of 0.2, 0.4 or 0.8 nmol have failed to attenuate anxiety in the EPM. Present results suggest that the aversive experience in the EPM is not sufficient to induce an anxiogenic amount of NO synthesis within the mouse PAG. In other words, it is likely that intra-PAG NO does not play a role on anxiety elicited during EPM exposure.

Intra-PAG injection of NMDA at a dose that did not produce any vigorous defensive-like behavior (0.02 nmol/0.1 μ l) led mice to explore less the open arms of the EPM (Exp. 2). This anxiogenic-like effect of NMDA was characterized by a selective reduction in percent open arm entries and percent open arm time, the two main measures used as indices of anxiety in the EPM. Importantly, intra-PAG NMDA did not alter closed arm entries, the parameter widely used to measure general locomotor activity in the maze [e.g., File, 1992; Rodgers and Johnson, 1995]. Present results corroborate previous findings demonstrating an anxiogenic-like effect provoked by glutamate-NMDA receptor activation within the midbrain periaqueductal gray [e.g., Bandler, 1988; Bittencourt et al., 2004; Miguel and Nunes-de-Souza, 2006].

The results of Experiment 3 demonstrated that the enhancement in anxiety-like behavior induced by intra-PAG NMDA was attenuated (% open arm entries) and completely blocked (% open arm time) by prior local infusion of NPLA. As shown in Exp. 1, in which intra-PAG NPLA did not alter anxiety *per se*, animals that received NPLA+saline also did not exhibit any significantly different behavior in the mouse EPM when compared to control group (saline+saline injected animals). NMDA injected animals (NMDA+saline group), in turn, confirmed the results of Exp. 2, showing an anxiogenic-like profile of this NMDA receptor agonist. These results indicate that glutamate-NMDA receptor activation within the mouse PAG induces NO synthesis, which in turn leads to an enhancement of anxiety in the EPM. It is particularly important to note that either the anxiogenic-like effects of intra-PAG NMDA or the blockade of such effects with prior infusion of NPLA were seen in the absence of changes to the primary index of general locomotor activity in the maze, namely, closed arm entries (e.g., File, 1992; Rodgers and Johnson, 1995).

The mechanisms involved in the apparently contrasting effects of intra-PAG NPLA on anxiety (i.e., it blocked the

anxiogenic-like effects of NMDA infusion but failed to attenuate anxiety when injected alone) are not clear. It is likely that the PAG nitrgergic modulation of the defensive behavior depends on the magnitude of the aversive stimulus that animals are submitted. For instance, we have emphasized that the vigorous defensive-like behaviors provoked by intra-PAG NMDA were completely antagonized by local infusion of NPLA at a similar dose used in the present study (Miguel and Nunes-de-Souza, 2006). On the other hand, we have recently observed that NPLA infusion into the PAG attenuates *per se* the avoidance of the predator in the Rat Exposure Test (RET, unpublished results), an animal model of defensive behavior based on the prey-predator interaction (Yang et al., 2004), in which a subject mouse (prey) is allowed to seek or avoid the predator stimulus (rat) and thus regulate its own exposure to threat. In addition, intra-PAG NPLA also reverted the proaversive-like effect of NMDA injected into the same structure, suggesting a modulatory role for NO on defensive behavior induced by glutamate-NMDA receptor activation within the PAG (unpublished results). Taken together these findings are suggestive that the defensive response evaluated in the mouse EPM does not depend on NO synthesis within this limbic midbrain structure.

The PAG is anatomically and functionally divided in four longitudinal columns that run parallel to the aqueduct — the dorsomedial and dorsolateral (dorsal portion), lateral (lateral portion) and ventrolateral (ventral portion) columns (Bandler and Shipley, 1994; Carrive, 1993). It has been emphasized that serotonergic neurons from ventrolateral portion of PAG (vlPAG) are implicated in the suppression of “fight/flight” sympathetic and behavioral responses elicited by stimulation of dorsal PAG (Johnson et al., 2004). Furthermore, it has been suggested that serotonin receptor and GABA/benzodiazepine receptor modulate the aversive-like effects of nitric oxide in the dorsolateral PAG of rats (Moreira and Guimarães, 2004). Considering that in the present study, approximately 85% of the injection sites were located at dorsal PAG, the lack of intra-PAG NPLA effects on anxiety might be due endogenous serotonin and/or GABA inhibitory action on glutamate-NMDA receptors containing neurons. Although attractive, this hypothesis remains to be empirically tested e.g. with combined intra-dPAG injections of direct serotonin or benzodiazepine receptors antagonists and nNOS inhibitors.

Corroborating previous evidences that have emphasized that mice exhibit different defensive behavioral profile when compared to rats (Blanchard et al., 2001; 2003; Jardim et al., 1999; Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004), which could implicate distinct neurobiological underlying mechanisms, the lack of intra-PAG NPLA effects on anxiety in the mouse EPM contrasts with previous findings reported with the rat EPM. For instance, it has been demonstrated by Guimarães and colleagues (1994), that administration of L-NAME and L-NOARG into the dPAG produces anti-anxiety effects in the rat EPM. However, these compounds are not selective nNOS inhibitors, since they also inhibit eNOS (Pfeiffer et al., 1996). Considering there is evidence indicating the presence of eNOS within the PAG (Paakkari and Lindsberg, 1995; Iwase et al., 2000), it is reasonable to suggest that not only nNOS may play a role on anxiety modulation in the rodents PAG. Supporting this assumption are findings showing that also eNOS, beyond

nNOS, contributes to the long-term potentiation (LTP) phenomenon in the hippocampus (Hopper and Garthwaite, 2006). These authors have emphasized the importance of an integrated action of both isoenzymes (nNOS and eNOS) in the LTP. Further evidences demonstrating the relevance of the eNOS in other biological processes previously thought to be exclusive of nNOS action are synaptic plasticity, neurochemical and behavioral regulation (Kano et al., 1998; Demas et al., 1999; Haul et al., 1999; Frisch et al., 2000; Doreulee et al., 2003). Taken together, these findings and the present results (Exp. 1) raise the hypothesis that NO role on anxiety in the EPM seems to depend on a combined action of both enzyme isoforms within the mouse PAG. Further studies seem to be relevant to confirm the anxiolytic-like profile of the eNOS in this midbrain structure.

4. Experimental procedures

4.1. Subjects

Subjects were male Swiss adults mice weighing 25–35 g (São Paulo State University – UNESP, SP, Brazil), housed in groups of 10 per cage (cage size: 41×34×16 cm). They were maintained under a normal 12-h light cycle (lights on: 7:00 a.m.) in a temperature (23±1 °C) and humidity (55±5%) controlled environment. Food and drinking water were freely available except during the brief test periods. All mice were experimentally naïve and used only once.

4.2. Drugs

The drugs used were N^ω-propyl-L-arginine (NPLA – Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA), a highly selective and potent inhibitor of nNOS (K_i=57nM), which displays 3158-fold and 149-fold selectivity over iNOS and eNOS, respectively (Zhang et al., 1997) and N-methyl-D-aspartate (NMDA, Sigma-Brazil) dissolved in physiological saline (NaCl 0.9%). The doses used were based on previous studies (El-Haddad et al., 2002; Kakoki et al., 2001; Miguel and Nunes-de-Souza, 2006; Zhang et al., 1997).

4.3. Surgery and microinjection

Mice were implanted with 7-mm stainless steel guide cannula (26-gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltda, Brazil) under anaesthesia with Ketamine (anaesthetic, 80 mg/Kg) plus Xylasin (muscle relaxing, 8 mg/kg). Guide cannula was fixed to the skull using dental acrylic and jeweler's screws. Stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2001) for the PAG were, respectively, 4.1 mm posterior to bregma, 1.3 mm lateral to the midline, and 2.2 mm ventral to the skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical. A dummy cannula (33-gauge, stainless steel wire; Fishtex Industry and Commerce of plastics Ltda.), inserted into each guide cannula immediately after of surgery, served to reduce the incidence of occlusion.

Five to seven days after surgical recovery, solutions were injected into the PAG by microinjection units (33-gauge stainless steel cannula; Insight Equipamentos Científicos

Ltda, Brazil), which extended 1.0 mm beyond the tips of the guide cannula. Each microinjection unit was attached to a 5- μ l Hamilton microsyringe via polyethylene tubing (PE-10), and administration was controlled by an infusion pump (BI 2000, Insight Equipamentos Científicos Ltda, Brazil) programmed to deliver a volume at rate of 0.1 μ l (volume injected) over a period of 30 s. The microinjection procedure consisted of gently restraining the animal, removing of dummy cannula, inserting the injection unit in situ for a further 60 s. Confirmation of successful infusion was obtained by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing.

4.4. Elevated plus-maze and behavioral analysis

The basic EPM design was very similar to that originally described by [Lister \(1987\)](#) and comprised two open arms (30 $\times$ 5 $\times$ 0.25 cm) and two closed arms (30 $\times$ 5 $\times$ 15 cm) connected via a common central platform (5 $\times$ 5 cm). The apparatus was constructed from wood (floor) and transparent glass (clear walls) and was raised to a height of 38.5 cm above floor level.

Eight to 10 min (see also Section 4.5. Procedure) following drug microinfusion (see below) into the PAG, each mouse was placed in an individual holding cage and then transported to the maze. Testing commenced by placing the subject on the central platform of the maze (facing an open arm), following which the experimenter immediately withdrew to an adjacent laboratory. The videotaped test sessions were 5 min in duration and, between subjects, the maze was thoroughly cleaned with 20% alcohol. All experiments were performed under normal laboratory illumination (1 $\times$ 100 W white light) during the light phase of the light–dark cycle.

Videotapes were scored by a highly trained observer using an ethological analysis package developed by Dr. Morato's group at Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (personal communication). Behaviors scored were the frequencies of open and closed arm entries (entry = all four paws into an arm) and the time spent in open arm of the maze. These data were used to calculate percentage of open arm entries ($[\text{open}/\text{total}] \times 100$) and percentage of time spent in each zone of the maze (e.g. $[\text{time in compartment}/300] \times 100$).

4.5. Procedure

4.5.1. Experiment 1: effects of intra-PAG injection of NPLA on the behavior mice in the EPM

On test days, animals were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 30 min prior to testing. Mice were then microinjected with NPLA (0, 0.2, 0.4, 0.8 nmol/0.1 μ l) and 10 min later they were individually placed in the central platform of the EPM for recording the behavioral measures (see above) during a period of 5 min.

4.5.2. Experiment 2: effects of intra-PAG injection of NMDA on the behavior of mice in the EPM

As described for Exp. 1, after a period of habituation to the experimental room, animals received intra-PAG microinjection of NMDA (0 or 0.02 nmol/0.1 μ l) and 8 min later they were individually placed in the central platform of the EPM for recording the behavioral measures (see above) during a period of 5 min.

4.5.3. Experiment 3: effects of intra-PAG injection of NPLA on the anxiogenic effect of local infusion of NMDA

Two groups of mice were initially injected with NPLA (0 or 0.4 nmol/0.1 μ l) intra-PAG and 10 min later they were divided in other two groups and received NMDA (0 or 0.02 nmol/0.1 μ l) into the same midbrain site. Eight minutes after the second intra-PAG injection, each mouse was placed in central platform of the EPM for recording the behavioral measures (see above) during a period of 5 min.

4.6. Statistical analysis

All results were initially submitted to Levene's test for homogeneity of variance. Where Levene's test yielded significance, results were transformed to log, square root or cube root and confirmed for homogeneity of variance before being submitted to one- or two-way analyses of variance (ANOVA). The following data sets were log transformed: % open arm entries (Exp. 1 and Exp. 3) and frequency of closed arm entries (Exp. 3). In addition, % open arm time results were transformed to cube root (Exp. 3). Data from Exp. 3 were initially analyzed by two-way independent ANOVA [Factor 1: pretreatment (NPLA); Factor 2: treatment (NMDA)]. Significant F tests were followed by Duncan's multiple range tests. In all cases, a P value of 0.05 or less was required for significance.

4.7. Histology

At the end of testing, all the animals were deeply anaesthetized with sodium thiopental and received a microinfusion of 1% Evans blue (according to the microinjection procedure described above). Brains were removed and injection sites were verified histologically according to the atlas of [Paxinos and Franklin \(2001\)](#). Data from animals with injection sites outside the PAG were excluded from the study. Final sample sizes in Experiment 1 ranged between 9 and 15, in Experiment 2, between 15 and 16 and, finally, in Experiment 3, between 7 and 8.

4.8. Ethics

The experiments carried out in this study are in compliance with the norms of Brazilian Neuroscience and Behavior Society (SBNeC), based on the US National Institutes of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP, CNPq and PADG/FCF-Unesp. T. T. Miguel was recipient of FAPESP and R. L. Nunes-de-Souza received a CNPq research fellowship

REFERENCES

- Albin, R.L., Gilman, S., 1990. Autoradiographic localization of inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitter receptors in human normal and olivopontocerebellar atrophy cerebellar cortex. *Brain Res.* 522 (1), 37–45.

- Bandler, R., 1988. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation, suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region. In: Epstein, A., Horrisson, A. (Eds.), *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*, 13. New York Academic Press, pp. 67–74.
- Bandler, R., Shipley, M.T., 1994. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.* 17 (9), 379–389.
- Bertoglio, L.J., Zangrossi Jr., H., 2006. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. *Behav. Pharmacol.* 17 (7), 589–596 Erratum in: *Behav. Pharmacol.* 2006, 17(8), 737.
- Bittencourt, A.S., Carobrez, A.P., Zamprogno, L.P., Tufik, S., Schenberg, L.C., 2004. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125 (1), 71–89.
- Blanchard, D.C., Griebel, G., Blanchard, R.J., 2001. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25 (3), 205–218.
- Blanchard, R.J., Wall, P.M., Blanchard, D.C., 2003. Problems in the study of rodent aggression. *Horm. Behav.* 44 (3), 161–170.
- Carriave, P., 1993. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res.* 58 (1–2), 27–47.
- Carvalho-Netto, E.F., Litvin, Y., Nunes-de-Souza, R.L., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2007. Effects of intra-PAG infusions of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. *Behav. Brain Res.* 176 (2), 222–229.
- Carvalho-Netto, E.F., Nunes-de-Souza, R.L., 2004. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behav. Brain Res.* 148 (1–2), 119–132.
- Dawson, T.M., Steiner, J.P., Dawson, V.L., Dinerman, J.L., Uhl, G.R., Snyder, S.H., 1993. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (21), 9808–9812.
- De Oliveira, C.L., Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., 1997. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmac. Biochem. Behav.* 56 (1), 55–59.
- De Oliveira, R.W., Guimarães, F.S., 1999. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (12), 1529–1532.
- De Oliveira, R.W., Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., 2000. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.* 51 (6), 457–464.
- Demas, G.E., Kriegsfeld, L.J., Blackshaw, S., Huang, P., Gammie, P., Nelson, R.J., Snyder, S.H., 1999. Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *J. Neurosci.* 19(19), RC30, 1–5.
- Doreulee, N., Sergeeva, O.A., Yanovsky, Y., Chepkova, A.N., Selbach, O., Godecke, A., Schrader, J., Haas, H.L., 2003. Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Brain Res.* 964 (1), 159–163.
- El-Haddad, M.A., Chao, C.R., Ma, S.X., Ross, M.G., 2002. Neuronal NO modulates spontaneous and ANG II-stimulated fetal swallowing behavior in the near-term ovine fetus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282 (5), R1521–R1527.
- File, S.E., 1992. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J.M., Heal, D.J., Marsden, C.A. (Eds.), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 25–44.
- Forestiero, D., Manfrim, C.M., Guimarães, F.S., De Oliveira, R.M., 2006. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 184 (2), 166–172.
- Frisch, C., Dere, E., Silva, M.A., Godecke, A., Schrader, J., Huston, J.P., 2000. Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. *J. Neurosci.* 20 (17), 6694–6700.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., Moncada, S., 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172 (4–5), 413–416.
- Graeff, F.G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (3), 239–259.
- Guimarães, F.S., Bejjamini, V., Moreira, F.A., Aguiar, D.C., de Lucca, A.C., 2005. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (8), 1313–1322.
- Guimarães, F.S., Carobrez, A.P., De Aguiar, J.C., Graeff, F.G., 1991. Anxiolytic effect in the elevated plus maze of NMDA receptor antagonist AP 7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103 (1), 91–94.
- Guimarães, F.S., De Aguiar, J.C., Del Bel, E.A., Ballejo, G., 1994. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* 5 (15), 1929–1932.
- Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., Muñhoz, F.J., 2005. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76 (2), 126–152.
- Haul, S., Godecke, A., Schrader, J., Haas, H.L., Luhman, H.J., 1999. Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase. *J. Neurophysiol.* 81 (2), 494–497.
- Heresco-Levy, U., 2003. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27 (7), 1113–1123.
- Hopper, R.A., Garthwaite, J., 2006. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 26 (45), 11513–11521.
- Huntley, G.W., Vickers, J.C., Morrisson, J.H., 1994. Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *Trends Neurosci.* 17 (12), 536–543.
- Iwase, K., Miyataka, K., Shimizu, A., Nagasaki, A., Gotoh, T., Mori, M., Takiguchi, M., 2000. Induction of endothelial nitric oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *J. Biol. Chem.* 275 (16), 11929–11933.
- Jardim, M.C., Nogueira, R.L., Graeff, F.G., Nunes-de-Souza, R.L., 1999. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Res. Bull.* 48 (4), 407–411.
- Johnson, P.L., Lightman, S.L., Lowry, C.A., 2004. A functional subset of serotonergic neurons in the rat ventrolateral periaqueductal gray implicated in the inhibition of sympathoexcitation and panic. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1018, 58–64.
- Kakoki, M., Zou, A.P., Mattson, D.L., 2001. The influence of nitric oxide synthase 1 on blood flow and interstitial nitric oxide in the kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281 (1), R91–97.
- Kano, T., Shimizu-Sasamata, M., Huang, P.L., Moskowitz, M.A., Lo, E.H., 1998. Effects of nitric oxide synthase gene knockout neurotransmitter release in vivo. *Neuroscience* 86 (3), 695–699.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schulteis, N., Krugel, U., Illes, P., 2003. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology* 28 (4), 435–444.

- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., Michel, T., 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (14), 6348–6352.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92 (2), 180–185.
- Mayer, B., John, M., Heinzel, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., Bohme, E., 1991. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288 (1–2), 187–191.
- McNaughton, N., Corr, P.J., 2004. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (3), 285–305.
- Mendes-Gomes, J., Nunes-de-Souza, R.L., 2005. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Res.* 1047 (1), 97–104.
- Miguel, T.T., Nunes-de-Souza, R.L., 2006. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res.* 1076 (1), 42–48.
- Moreira, F.A., Guimarães, F.S., 2004. Benzodiazepine receptor and serotonin 2A receptor modulate the aversive-like effects of nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 176 (3–4), 362–368.
- Mungrue, I.N., Bredt, D.S., Stewart, D.J., Husain, M., 2003. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol. Scand.* 179 (2), 123–135.
- Onstott, D., Mayer, B., Beitz, A.J., 1993. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res.* 610 (2), 317–324.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54 (5), 581–618.
- Paakkari, I., Lindsberg, P., 1995. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann. Med.* 27 (3), 369–377.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, California, USA.
- Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., Mayer, B., 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* 18 (6), 1433–1440.
- Prado, W.A., Schiavon, V.F., Cunha, F.Q., 2002. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain rats. *Eur. J. Pharmacol.* 441 (1–2), 57–65.
- Prast, H., Philippu, A., 2001. Nitric oxide as a modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64 (1), 51–68.
- Quock, R.M., Nguyen, E., 1992. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.* 51 (25), PL255–PL260.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52 (2), 297–303.
- Schubert, K., Shaikh, M.B., Siegel, A., 1996. NMDA receptors in the midbrain periaqueductal gray mediate hypothalamically evoked hissing behavior in the cat. *Brain Res.* 726 (1–2), 80–90.
- Seeburg, P.H., 1993. The TIPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (8), 297–303.
- Sousa, A.M., Prado, W.A., 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 897 (1–2), 9–19.
- Teixeira, K.V., Carobrez, A.P., 1999. Effects of glycine or (+/–)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav. Neurosci.* 113 (1), 196–203.
- Volke, V., Köks, S., Vasar, E., Bourin, M., Bradwejn, J., Männistö, P.T., 1995. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport* 6 (10), 1413–1416.
- Yang, M., Augustsson, H., Markham, C.M., Hubbard, D.T., Webster, D., Wall, P.M., Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 2004. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiol. Behav.* 81 (3), 465–473.
- Zhang, H.Q., Fast, W., Marletta, M.A., Martasek, P., Silverman, R.B., 1997. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N^ω-propyl-L-arginine. *J. Med. Chem.* 40 (24), 3869–3870.



Role of nitric oxide in the periaqueductal gray in defensive behavior in mice: influence of prior local N-methyl-D-aspartate receptor activation and aversive condition

Ricardo Luiz Nunes-de-Souza^{1,2,3}, Tarciso Tadeu Miguel^{1,3}, Karina Santos Gomes^{2,3}, Juliana Sayuri Fugimoto³, Joyce Mendes-Gomes^{2,3}, Vanessa Cristiane Santana Amaral^{1,3}, and Eduardo Ferreira de Carvalho-Netto⁴

¹ Universidade Federal de São Carlos-Universidade Estadual Paulista, Brasil

² Universidade de São Paulo, Brasil

³ Universidade Estadual Paulista, Brasil

⁴ University of Cincinnati, USA

Abstract

Glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation within the dorsal column of the periaqueductal gray (dPAG) leads to antinociceptive, autonomic, and behavioral responses characterized as the fear reaction. Activation of NMDA receptors in the brain increases nitric oxide (NO) synthesis, and NO has been proposed to be a mediator of the aversive action of glutamate. This paper reviews a series of studies investigating the effects of neuronal NO synthase (nNOS) inhibition in the dPAG of mice in different aversive conditions. nNOS inhibition by infusion of N ω -propyl-L-arginine (NPLA) prevents fear-like reactions (e.g., jumping, running, freezing) induced by NMDA receptor stimulation within the dPAG and produces anti-aversive effects when injected into the same midbrain site in mice confronted with a predator. Interestingly, nNOS inhibition within the dPAG does not change anxiety-like behavior in mice exposed to the elevated plus maze (EPM), but it reverses the effect of an anxiogenic dose of NMDA injected into the same site in animals subjected to the EPM. Altogether, the results support a role for glutamate NMDA receptors and NO in the dPAG in the regulation of defensive behaviors in mice. However, dPAG nitrergic modulation of anxiety-like behavior appears to depend on the magnitude of the aversive stimulus. **Keywords:** periaqueductal gray matter (PAG), NMDA receptors, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), elevated plus maze (EPM), rat exposure test (RET), mouse.

Received 20 April 2010; received in revised form 31 May 2010; accepted 31 May 2010. Available on line 26 June 2010

Introduction

The dorsal portion of the periaqueductal gray (dPAG) has been identified as the principal substrate of aversive states in the midbrain (Graeff, 2004). Electrical or chemical stimulation of the dPAG elicits autonomic (e.g., tachycardia, defecation) and behavioral (e.g., jumping, running, immobility) responses characterized as the fear reaction. Additionally, many lines of evidence have indicated that in addition to fundamentally controlling fear-

like fight and flight responses (for review, see Graeff, 2004), the PAG modulates less vigorous defensive responses related to anxiety, such as threat avoidance and risk assessment (Bertoglio & Zangrossi, 2006; Carvalho-Netto, Litvin, Nunes-de-Souza, Blanchard, & Blanchard, 2007; McNaughton & Corr, 2004; Mendes-Gomes & Nunes-de-Souza, 2005, 2009; Teixeira & Carobrez, 1999;).

Chemical stimulation of the PAG can be performed by local glutamate NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor activation. When injected into the dPAG, NMDA

Ricardo Luiz Nunes-de-Souza, Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCAR-UNESP (Araraquara), São Carlos, SP, Brasil; Lab. Neuropsicofarmacologia, FCFAR-UNESP, Araraquara, SP, Brasil; Instituto de Neurociências & Comportamento - INeC, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Tarciso Tadeu Miguel and Vanessa Cristiane Santana Amaral, Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCAR-UNESP Araraquara, São Carlos, SP, Brasil; Lab. Neuropsicofarmacologia, FCFAR-UNESP, Araraquara, SP, Brasil. Karina Santos Gomes, Lab. Neuropsicofarmacologia, FCFAR-

UNESP, Araraquara, SP, Brasil; Instituto de Neurociências & Comportamento - INeC, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Juliana Sayuri Fugimoto, Lab. Neuropsicofarmacologia, FCFAR-UNESP, Araraquara, SP, Brasil. Joyce Mendes-Gomes, Lab. Neuropsicofarmacologia, FCFAR-UNESP, Araraquara, SP, Brasil. Eduardo Ferreira de Carvalho-Netto, Genome Research Institute, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, USA. Correspondence regarding this article should be directed to: Ricardo Luiz Nunes-de-Souza. Phone: +55-16-33016983. Fax: +55-16-33016980. E-mail address: souzarn@fcfar.unesp.br

receptor agonists elicit fight and flight reactions in rats (e.g., Bandler, 1988; Bittencourt, Carobrez, Zamprogno, Tufik, & Schenberg, 2004) and mice (e.g., Beckett, Lawrence, Marsden, & Marshall, 1992), whereas local microinjection of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP-7), a competitive NMDA receptor antagonist, produces antiaversive-like effects in the elevated plus maze (EPM; Guimarães, Carobrez, De Aguiar, & Graeff, 1991), a widely used animal model of anxiety.

Glutamate is a ubiquitous excitatory amino acid in the central nervous system. In addition to activating ionotropic NMDA receptors, glutamate is also able to activate two other ion channel-coupled receptors, the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor and kainate receptor (Heresco-Levy, 2003; Huntley, Vickers, & Morrison, 1994; Ozawa, Kamiya, & Tsuzuki, 1998; Seeburg, 1993), and a G-protein-coupled receptor (metabotropic receptor). These receptors are largely expressed in the PAG (Albin & Gilman, 1990; Onstott, Mayer, & Beitz, 1993; Schubert, Shaikh, & Siegel, 1996). Glutamate NMDA receptor activation leads to cellular calcium influx, which triggers a cascade of intracellular events, including activation of nitric oxide synthase (NOS), an enzyme that produces nitric oxide (NO) by converting L-arginine to L-citrulline, with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and Ca^{2+} as co-factors (Garthwaite, Garthwaite, Palmer, & Moncada, 1989; Heresco-Levy, 2003; Mayer et al., 1991). NOS has at least three isoforms. Inducible NOS (iNOS) is involved in immunological reactions and activated by factors released during pathological events, such as cytokines that can induce a substantial release of NO. Two other NOS isoforms are constitutive forms that are present in vase endothelia (endothelial NOS [eNOS]) and neurons (neuronal NOS [nNOS]) (Guix, Uribealago, Coma, & Muñoz, 2005; Lamas, Marsden, Li, Tempst, & Michel, 1992; Mungrue, Bredt, Stewart, & Husain, 2003; Prast & Philippu, 2001).

Similar to the proaversive effects produced by glutamate NMDA receptor agonists, injection of NO donors into the dorsolateral column of the PAG (dIPAG) produces fight and flight reactions in rats (De Oliveira, Del-Bel, & Guimarães, 2001). In contrast, administration of NOS inhibitors, guanylate cyclase inhibitors, and a NO scavenger in this same region induces anxiolytic-like effects in the EPM (De Oliveira & Guimarães, 1999; Guimarães, Beijamini, Moreira, Aguiar, & de Lucca, 2005; Guimarães, De Aguiar, Del Bel, & Ballejo, 1994).

This paper attempts to show that the roles played by glutamate NMDA receptors and the NO complex within the dPAG in defensive behavior in mice appear to depend on the magnitude or nature of the aversive stimuli. Whereas chemical stimulation of the dPAG elicits defensive reactions that are blocked by local infusion of a nNOS inhibitor, the behavioral defensive

responses induced by a more naturalistic situation (e.g., exposure to the EPM) are sensitive to NOS inhibition only in animals pretreated with an NMDA receptor agonist in the same midbrain structure. However, when exposed to a more aversive situation (e.g., confrontation by a predator), inhibition of nNOS within the dPAG attenuates defensive-like behaviors in mice.

Defensive-like responses induced by chemical stimulation of the dPAG with NMDA infusion in mice: effects of nNOS inhibition

As widely demonstrated in many laboratories (e.g., Bandler & Carrive, 1988; Bittencourt et al., 2004; Blanchard & Blanchard, 1988; Carvalho-Netto, Markham, Blanchard, Nunes-de-Souza, & Blanchard, 2006), chemical stimulation of the dPAG (e.g., with NMDA infusion) induces a set of behavioral responses, such as jumping, running, and freezing, that last approximately 5 minutes. Immediately after (and sometimes *during*) intra-dPAG NMDA infusion, animals exhibit a sequence of apparently disoriented jumps intercalated with running. These explosive motor behaviors, especially jumping, last approximately 60-90 seconds and are followed by running intercalated with periods of freezing for 60-120 seconds. These defensive-like behaviors are followed by a sequence of non-aversively motivated behaviors (e.g., walking and rearing). Figure 1 illustrates the effects of intra-dPAG injection of NMDA (.04 nmol) on jumping and rearing frequency and on running and freezing time (in seconds) over 5 minutes in mice pretreated with saline or .2-.4 nmol N^ω-propyl-L-arginine (NPLA, a highly selective and potent inhibitor of nNOS; $K_i = 57$ nM) that displays 3158-fold and 149-fold selectivity for iNOS and eNOS, respectively (Zhang, Fast, Marletta, Martasek, & Silverman, 1997), in the same midbrain site. Intra-dPAG infusions of NPLA (.4 nmol) changed the defensive behaviors induced by intra-dPAG injections of NMDA. The excitatory amino acid induced a sudden sequence of jumping and running behaviors that were followed by a period of freezing. These results corroborate many previous studies (Bandler, 1988; Bandler & Carrive, 1988; Beckett et al., 1992; De Oliveira et al., 2001; Molchanov & Guimaraes, 1999), which demonstrated that intra-PAG injections of glutamate receptor agonists produce defensive reactions in rodents. NPLA antagonized these NMDA-induced behavioral effects, suggesting that NO release within the PAG plays a role in defensive behavior. Intra-dPAG infusion of NMDA did not alter rearing frequency, but higher-dose NPLA increased this vertical exploratory behavior, an effect that was independent of the treatment combination (i.e. saline or NMDA). The increase in rearing frequency suggests that this nNOS inhibitor (.2 and .4 nmol) does not provoke motor disruption, an effect previously reported with

systemic injections of other NOS inhibitors (Del Bel, da Silva, & Guimaraes, 1998; Del Bel, Souza, Guimaraes, da Silva, & Nucci-da-Silva, 2002; Del Bel, da Silva, Guimaraes, & Bermudez-Echeverry, 2004). Intra-dPAG NPLA injections appear to selectively reduce NMDA-induced behavioral responses (e.g., jumping, running, freezing) in mice. Altogether, these results suggest that NO, synthesized after glutamate NMDA receptor activation within the dPAG, may modulate defensive behaviors in this midbrain structure.

However, intra-dPAG NPLA fails to alter defensive behavior when mice are exposed to a more naturalistic situation (e.g., the EPM). The results shown below suggest that the role played by NO in emotional responsiveness appears to be dependent on glutamate NMDA receptor activation, at least within the mouse dPAG, and the type of aversive stimulus exposure.

Inhibition of nNOS within the dPAG fails to alter anxiety-like behavior in the mouse EPM

Figure 2 shows that inhibition of NO synthesis within the mouse dPAG neither increased nor decreased anxiety-like behavior in the EPM. Intra-dPAG infusion

of .4 nmol NPLA completely blocked vigorous defensive-like behaviors (e.g., jumping and running) induced by NMDA infusion (.04 nmol) into the same site (Figure 1), and intra-dPAG NPLA infusions of this nNOS inhibitor at doses of .2, .4, and .8 nmol failed to attenuate anxiety-like behavior in the EPM (Figure 2). The failure of intra-dPAG NPLA to affect anxiety-like behavior suggests that the aversive experience in the EPM is not sufficient to induce an anxiogenic amount of NO synthesis within the mouse dPAG, suggesting that intra-dPAG NO likely does not play a role in anxiety-like behavior elicited during EPM exposure in mice.

Inhibition of nNOS within the dPAG attenuates anxiety-like behavior induced by intra-dPAG NMDA infusion in the mouse EPM

Although intra-dPAG NPLA failed to alter indices of anxiety in the mouse EPM, NO synthesis appears to be important for the anxiogenic-like effects induced by local infusion of NMDA. We found that intra-dPAG injection of NMDA at a dose that did not produce any vigorous defensive-like behavior (.02 nmol/.1 μ l) led mice to explore the open arms of the EPM less

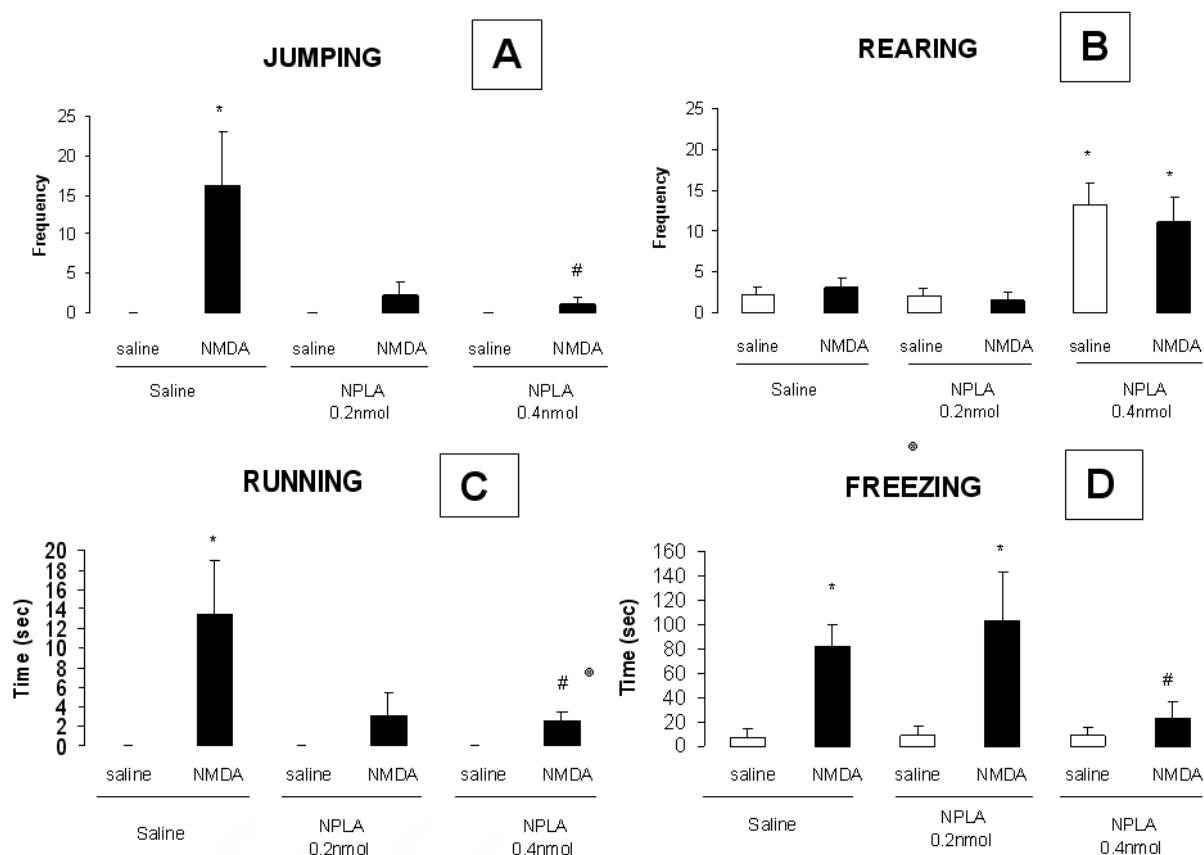


Figure 1. Effects of intra-dPAG injection of NMDA (0.04 nmol) on (A) jumping frequency, (B) rearing frequency, (C) running time (s), and (D) freezing time (s) over 5 min in mice pretreated with saline or NPLA (0.2-0.4 nmol) into the same midbrain site ($n = 9-14$; see text for details). * $p < .05$, compared with Saline+Saline; # $p < .05$, compared with Saline+NMDA (adapted from Miguel & Nunes-de-Souza, 2006).

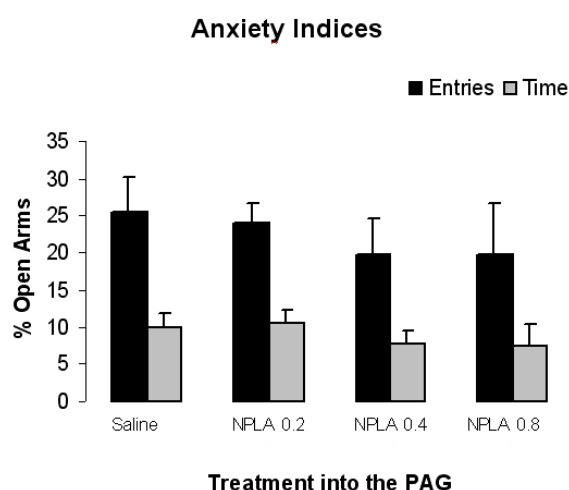


Figure 2. Effects of NPLA microinjection (0, .2, .4, and .8 nmol/0.1 μ l; $n = 9-15$) into the dPAG on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time in the EPM. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (reproduced from Miguel & Nunes-de-Souza, 2008).

(Figure 3). This anxiogenic-like effect of NMDA was characterized by a selective reduction in the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, the two main measures used as indices of anxiety in the EPM (e.g., File, 1992; Rodgers & Johnson, 1995). These results corroborate previous findings that demonstrated an anxiogenic-like effect induced by glutamate NMDA receptor activation within the midbrain PAG in rodents (e.g., Bandler, 1988; Bittencourt et al., 2004).

Interestingly, when injected into the dPAG, NPLA completely blocked the enhancement of anxiety-like behavior induced by intra-PAG NMDA. As shown in Figure 4, intra-dPAG NPLA reversed the anxiogenic-like effects produced by local infusion of NMDA. Importantly, animals that received intra-dPAG injection of NPLA (NPLA + saline) did not exhibit any significantly different behavior in the mouse EPM compared with

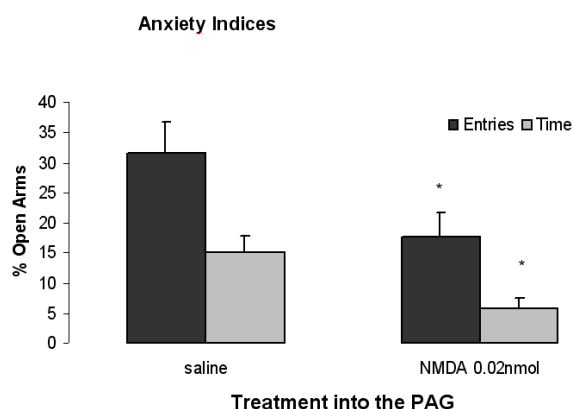


Figure 3. Effects of NMDA microinjection (0 and .02 nmol/.1 μ l; $n = 15-16$) into the dPAG on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time in the EPM. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < .05$, compared with control group (saline) (reproduced from Miguel & Nunes-de-Souza, 2008).

the control group (saline + saline). NMDA-injected animals (NMDA + saline), in turn, confirmed the results shown in Figure 3, showing an anxiogenic-like profile of this NMDA receptor agonist. These results indicate that glutamate NMDA receptor activation within the mouse PAG induces NO synthesis, which in turn leads to enhanced anxiety-like behavior in the EPM.

The mechanisms involved in the apparently contrasting effects of intra-dPAG NPLA on anxiety-like behavior (i.e., blockade of the anxiogenic-like effects of NMDA but inability to attenuate anxiety-like behavior when injected alone) are not clear. In fact, the existing data suggest that glutamatergic activation appears to be necessary to observe the effects of NO. However, this does not exclude a possible intrinsic anxiogenic-like effect of glutamate release during the exposure of mice to the EPM. Measuring glutamate release or NMDA receptor activation within the dPAG during the exposure of mice to the EPM would be interesting. In this context, we recently found that glutamate NMDA receptor blockade by intra-dPAG infusion of the NMDA receptor antagonist AP-7 attenuated anxiety-like behavior in mice exposed to the EPM (Figure 5). Intra-dPAG injection of AP-7 (.2 nmol/.1 μ l) increased open arm exploration without affecting closed arm entries (results not shown), suggesting a selective effect of this NMDA receptor antagonist on anxiety-like behavior. This anxiolytic-like profile produced by NMDA receptor blockade within the PAG was previously demonstrated in rats exposed to the EPM (Guimarães et al, 1991; Molchanov & Guimarães, 2002).

The mechanisms underlying these apparently contrasting effects of intra-dPAG AP-7 and NPLA on anxiety-like behavior remain unclear. The results showing that intra-dPAG injection of AP-7 and NPLA

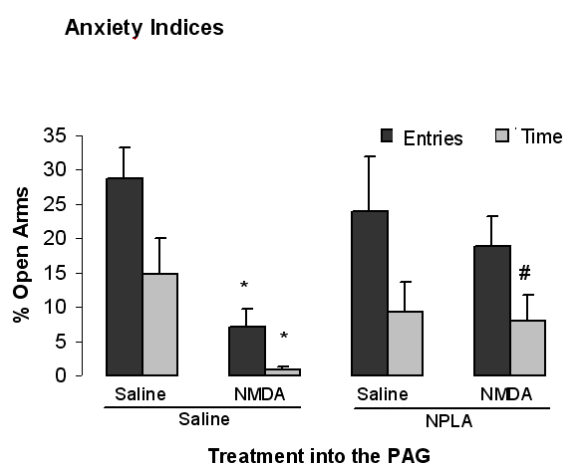


Figure 4. Effects of combined microinfusions of NPLA (0 and .4 nmol/.1 μ l) and NMDA (0 and .02 nmol/.1 μ l) into the dPAG on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time in the EPM. Data are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 7-8$). * $p < .05$, compared with control group (saline + saline); # $p < .05$, compared with saline + NMDA group (adapted from Miguel & Nunes-de-Souza, 2008).

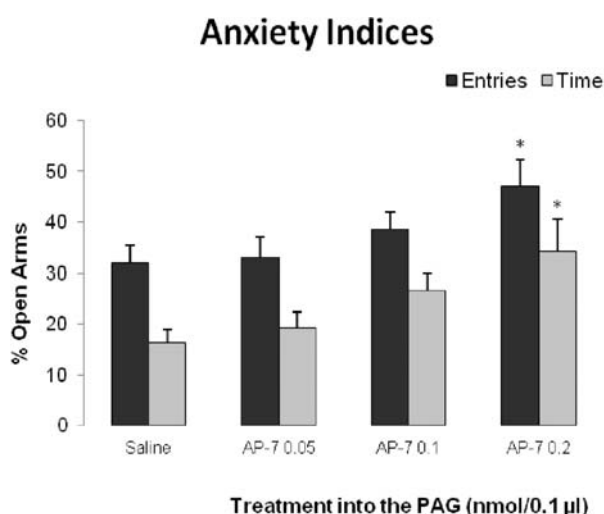


Figure 5. Effects of AP-7 microinjection (0, .05, .1, and .2 nmol/.1 μ l; $n = 8-15$) into the dPAG on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time in the EPM. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < .05$, compared with control group (saline).

attenuated and did not alter, respectively, anxiety-like behavior when injected alone suggest that the anxiogenic-like effect of glutamate NMDA receptor activation may not be completely dependent on NO synthesis. The anxiogenic-like effect of NO appears to depend on NMDA receptor “hyperactivation” within the mouse dPAG, whereas glutamate NMDA receptor activation appears to play a tonic role in anxiety-like behavior. If so, then NMDA receptor activation would lead to neuronal excitation without affecting NO release. Ca^{2+} influx via NMDA receptor activation has

been demonstrated to trigger subsequent and persistent changes in the expression of AMPA receptors, and these receptors are responsible for a substantial portion of basal excitatory postsynaptic potential (e.g., MacDonald, Jackson, & Beazely, 2006).

Considering that intra-dPAG nNOS inhibition attenuated anxiety-like behavior only in animals pretreated with an NMDA receptor agonist, dPAG nitrergic modulation of defensive behavior may depend on the magnitude of the aversive stimulus to which mice are subjected. To test this hypothesis, we investigated the effects of intra-dPAG infusion of NPLA on defensive behavior in mice confronted by a predator (rat).

Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by a predator

The rat exposure test (RET, Figure 6) is an animal model of anxiety based on the predator-prey (rat-mouse) interaction. The RET was developed and validated to facilitate the measurement of avoidance and risk assessment behaviors in mice (Yang et al., 2004). Testing procedures are conducted in a clear polycarbonate cage (exposure chamber) covered with a black polycarbonate lid. The exposure chamber is divided into two equally sized compartments by a wire mesh screen (surface and predator compartment). The home cage is a box made of black Plexiglas on three sides and clear Plexiglas on the fourth side to facilitate videotaping. The home chamber is connected to the exposure cage by a clear Plexiglas tube tunnel. Rats have been shown to be predators of mice both in nature and in the laboratory (Calvo-

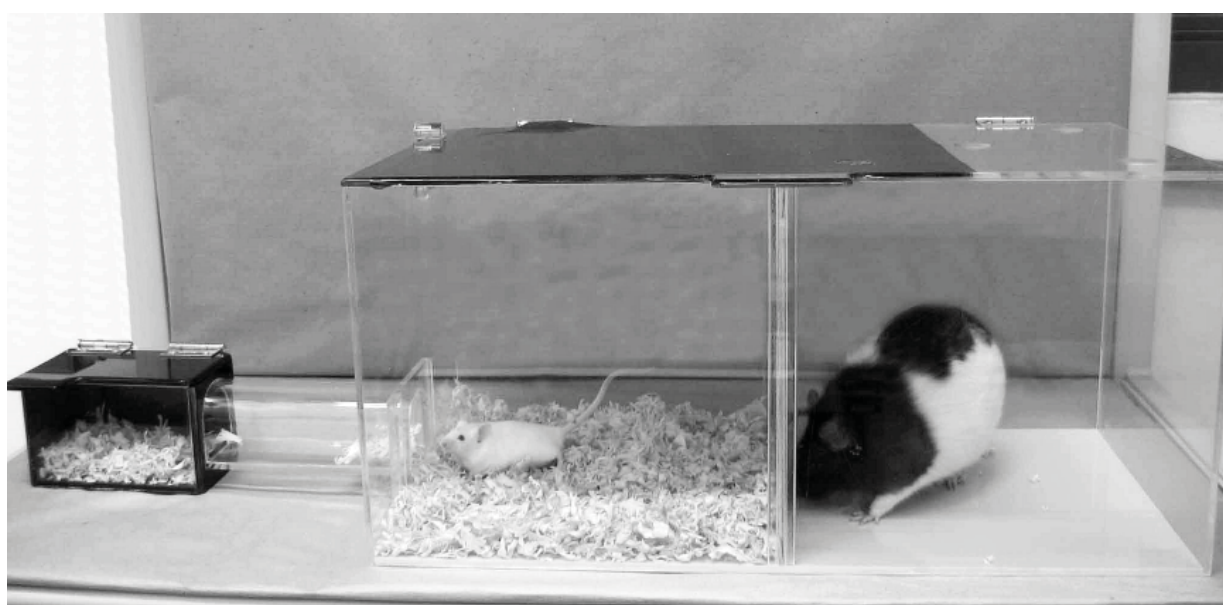


Figure 6. Photograph of rat exposure test apparatus. The predator (rat) is placed in the right half of the exposure cage, which is divided into two equally sized compartments by a wire mesh screen (surface and predator compartments) (reproduced from Amaral et al., 2010).

Torrent, Brain, & Martinez, 1999; O'Boyle 1974, 1975). When confronted by rats, both wild and laboratory mice show clear innate defensive behaviors (Blanchard et al., 1998). Recent studies have attempted to identify possible neurotransmitter systems and hormonal changes (e.g., plasma corticosterone) involved in the modulation of defensive responses in mice exposed to the RET (Amaral, Gomes, & Nunes-de-Souza, 2010; Carvalho-Netto et al., 2007; Litvin, Pentowski, Blanchard, & Blanchard, 2007; Martinez, Carvalho-Netto, Amaral, Nunes-de-Souza, & Canteras, 2008).

In this context, we recently found that NPLA infusion into the dPAG attenuates the avoidance of the predator in the RET (Carvalho-Netto, Gomes, Amaral, & Nunes-de-Souza, 2009). Figure 7 shows the dose-response curve for NPLA treatment. The highest dose (.4 nmol) increased the time in the surface compartment and in contact with the wire screen barrier between the mouse and predator. Additionally, intra-dPAG NPLA (.4 nmol) markedly reduced the duration of freezing behavior and risk assessment behavior, indicating that NPLA significantly reduced the spatiotemporal (avoidance) and ethological (freezing and risk assessment) measures of the RET, supporting the hypothesis of a potential role for the nitric oxide system in the dPAG in the regulation of anxiety-like behavior. Moreover, intra-dPAG NPLA also reversed the proaversive-like effect of NMDA injected into the same structure, suggesting a modulatory role for NO in defensive behavior induced by glutamate NMDA receptor activation within the dPAG (Carvalho-Netto et al., 2009).

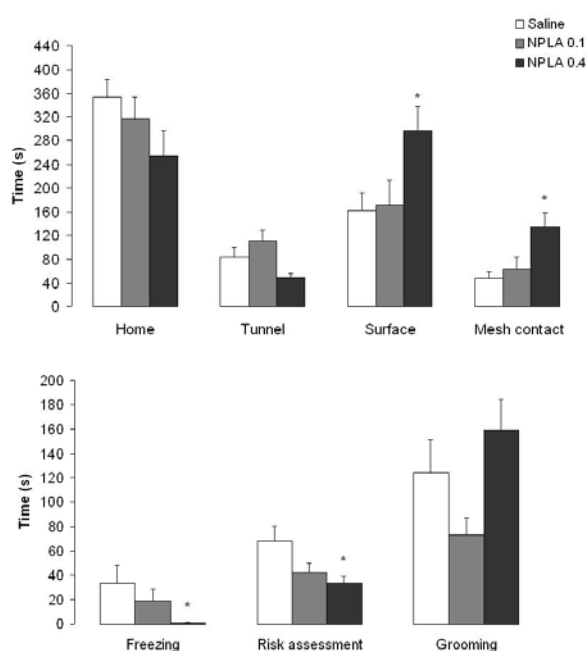


Figure 7. Effects of NPLA microinjection (.1 and .4 nmol/.1 μ l; $n = 9-15$) into the dPAG on the behaviors of mice in the RET. Each bar represents the mean $\pm$ SEM. * $p < .05$, compared with control group (reproduced from Carvalho-Netto et al., 2009).

Final considerations

Based on previous studies (for review, see De Oliveira et al., 2001; Guimarães et al. 2005) and the present discussion, the effects of NPLA may represent an inhibition of NO production mediated by endogenous glutamatergic activation via NMDA receptors. Indeed, NMDA receptor activation has been established as the main stimulus for NO production in the central nervous system (for review, see Esplagues, 2002), and reciprocal regulatory mechanisms between these two neuronal pathways (glutamatergic and nitrgergic) are likely to occur in the dPAG (Lin, Kang, Wan, Huang, & Tseng, 2000). An elegant study reported by Beijamini and Guimarães (2006) showed that exposure to a cat activated NOS-expressing neurons in the rat dPAG, an effect that was attenuated by prior intracerebroventricular microinjection of AP-7, a competitive NMDA receptor antagonist.

However, the failure of intra-dPAG NPLA to affect anxiety-like behavior in the EPM suggests that nitrgergic neurotransmission located within this midbrain structure appears to not be recruited during the exposure of mice to this widely used animal model of anxiety. The scope of the present review was not to extensively compare the roles of glutamate NMDA receptors and NO in the dPAG on defensive behaviors in rats and mice. The existing literature suggests that the defensive response evaluated in the mouse EPM does not depend on NO synthesis within this limbic midbrain structure.

Previous studies have shown that mice exhibit a different behavioral defensive profile compared with rats (Blanchard et al., 1997; Blanchard, Griebel, & Blanchard, 2001; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004; Gomes et al., 2009; Jardim, Nogueira, Graeff, & Nunes-de-Souza, 1999), suggesting species-specific neurobiological mechanisms. The inability of intra-dPAG NPLA to affect anxiety-like behavior in the mouse EPM contrasts with previous findings reported with the rat EPM. For example, Guimarães et al. (1994) showed that administration of N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and L-N^G-nitro arginine (L-NOARG) into the dPAG produced anxiolytic-like effects in the rat EPM. Altogether, these results suggest that the different effects of NO formation in the dPAG in rats and mice reflect a higher aversive state generated by the EPM in rats compared with mice. Importantly, however, L-NAME and L-NOARG are not selective nNOS inhibitors because they also inhibit eNOS (Pfeiffer, Leopold, Schmidt, Brunner, & Mayer, 1996). Considering the evidence indicating the presence of eNOS within the PAG (Iwase et al., 2001; Paakkari & Lindsberg, 1995), mechanisms other than, or in addition to, those involving nNOS in the rodent PAG may play a role in the modulation of anxiety-like behavior. Supporting this hypothesis are findings showing that eNOS also contributes to long-term potentiation (LTP)

in the hippocampus (Hopper & Garthwaite, 2006). These authors emphasized the importance of an integrated action of both isoenzymes (nNOS and eNOS) in LTP. Synaptic plasticity and neurochemical and behavioral evidence demonstrate the relevance of eNOS in other biological processes previously believed to be exclusive of nNOS action (Demas et al., 1999; Doreulee et al., 2003; Frisch et al., 2000; Haul, Godecke, Schrader, Haas, & Luhmann, 1999; Kano, Shimizu-Sasamata, Huang, Moskowitz, & Lo, 1998). Altogether, these findings suggest that the role of NO in anxiety-like behavior in the EPM appears to depend on the combined action of both enzyme isoforms within the mouse PAG. Further studies are required to confirm the anxiolytic-like profile of eNOS in this midbrain structure.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP, CNPq, and PADCF/FCF Unesp for financial support.

References

- Albin, R.L., & Gilman, S. (1990). Autoradiographic localization of inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitter receptors in human normal and olivopontocerebellar atrophy cerebellar cortex. *Brain Research*, 522, 37-45.
- Amaral, V.C.S., Gomes, K.S., & Nunes-de-Souza, R.L. (2010). Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. *Hormones and Behavior*, 57, 128-133.
- Bandler, R. (1988). Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region. In: A.N. Epstein & A.R. Horison (Eds.), *Progress in psychobiology and physiological psychology*, vol. 13 (pp. 67-154). San Diego: Academic Press.
- Bandler, R., & Carrive, P. (1988). Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. *Brain Research*, 439, 95-106.
- Beckett, S.R., Lawrence, A.J., Marsden, C.A., & Marshall, P.W. (1992). Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 108, 110-114.
- Bejjamini, V., & Guimarães, F.S. (2006). c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behavioural Brain Research*, 170, 52-61.
- Bertoglio, L.J., & Zangrossi, H., Jr. (2006). Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. *Behavioural Pharmacology*, 17, 589-596 [erratum: 17, 737].
- Bittencourt, A.S., Carobrez, A.P., Zamprogno, L.P., Tufik, S., & Schenberg, L.C. (2005). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, 125, 71-89.
- Blanchard, D.C., & Blanchard, R.J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39, 43-68.
- Blanchard, D.C., Griebel, G., & Blanchard, R.J. (2001). Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 205-218.
- Blanchard, R.J., Griebel, G., Henrie, J.A., & Blanchard, D.C. (1997). Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 783-789.
- Blanchard, R.J., Hebert, M.A., Ferrari, P.F., Palanza, P., Figueira, R., Blanchard, D.C., & Parmigiani, S. (1998). Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiology and Behavior*, 65, 201-209.
- Calvo-Torrent, A., Brain, P.F., & Martinez, M. (1999). Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology and Behavior*, 67, 189-196.
- Carvalho-Netto, E.F., Gomes, K.S., Amaral, V.C.S., & Nunes-de-Souza, R.L. (2009). Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology*, 204, 617-625.
- Carvalho-Netto, E.F., Litvin, Y., Nunes-de-Souza, R.L., Blanchard, D.C., & Blanchard, R.J. (2007). Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. *Behavioural Brain Research*, 176, 222-229.
- Carvalho-Netto, E.F., Markham, C., Blanchard, D.C., Nunes-de-Souza, R.L., & Blanchard, R.J. (2006). Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85, 140-147.
- Carvalho-Netto, E.F., & Nunes-de-Souza, R.L. (2004). Use of elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*, 148, 119-132.
- De Oliveira, R.W., & Guimarães, F.S. (1999). Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1529-1532.
- De Oliveira, R.M., Del Bel, E.A., & Guimaraes, F.S. (2001). Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 679-685.
- Del Bel, E.A., da Silva, C.A., & Guimaraes, F.S. (1998). Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors. *General Pharmacology*, 30, 245-248.
- Del Bel, E.A., da Silva, C.A., Guimaraes, F.S., & Bermudez-Echeverry, M. (2004). Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *European Journal of Pharmacology*, 485, 175-181.
- Del Bel, E.A., Souza, A.S., Guimaraes, F.S., da Silva, C.A., & Nuccida-Silva, L.P. (2002). Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacology*, 161, 32-37.
- Demas, G.E., Kriegsfeld, L.J., Blackshaw, S., Huang, P., Gammie, S.C., Nelson, R.J., & Snyder, S.H. (1999). Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Neuroscience*, 19, RC30.
- Doreulee, N., Sergeeva, O.A., Yanovsky, Y., Chepkova, A.N., Selbach, O., Godecke, A., Schrader, J., & Haas, H.L. (2003). Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Brain Research*, 964, 159-163.
- Espluggues, J. (2002). NO as a signaling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*, 135, 1079-1095.
- File, S.E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. In: J.M. Elliott, D.J. Heal & C.A. Marsden (Eds.), *Experimental approaches to anxiety and depression* (pp. 25-44). Chichester: Wiley.
- Frisch, C., Dere, E., Silva, M.A., Godecke, A., Schrader, J., & Huston, J.P. (2000). Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. *Journal of Neuroscience*, 20, 6694-6700.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., & Moncada, S. (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology*, 172, 413-416.
- Gomes, K.S., Carvalho-Netto, E.F., Monte, K.C., Acco, B., Nogueira, P.J., & Nunes-de-Souza, R.L. (2009). Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, 78, 323-327.
- Graeff, F.G. (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 239-259.
- Guimarães, F.S., Bejjamini, V., Moreira, F.A., Aguiar, D.C., & de Lucca, A.C. (2005). Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 1313-1322.
- Guimarães, F.S., Carobrez, A.P., De Aguiar, J.C., & Graeff, F.G. (1991). Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, 103, 91-94.

- Guimarães, F.S., De Aguiar, J.C., Del Bel, E.A., & Ballejo, G. (1994). Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport*, 5, 1929-1932.
- Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., & Muñoz, F.J. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, 76, 126-152.
- Haul, S., Godecke, A., Schrader, J., Haas, H.L., & Luhmann, H.J. (1999). Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Neurophysiology*, 81, 494-497.
- Heresco-Levy, U. (2003). Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27, 1113-1123.
- Hopper, R.A., & Garthwaite, J. (2006). Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 26, 11513-11521.
- Huntley, G.W., Vickers, J.C., & Morrisson, J.H. (1994). Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *Trends in Neurosciences*, 17, 536-543.
- Iwase, K., Miyataka, K., Shimizu, A., Nagasaki, A., Gotoh, T., Mori, M., & Takiguchi, M. (2000). Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 11929-11933.
- Jardim, M.C., Nogueira, R.L., Graeff, F.G., & Nunes-de-Souza, R.L. (1999). Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Research Bulletin*, 48, 407-411.
- Kano, T., Shimizu-Sasamata, M., Huang, P.L., Moskowitz, M.A., & Lo, E.H. (1998). Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release *in vivo*. *Neuroscience*, 86, 695-699.
- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., & Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6348-6352.
- Lin, H.C., Kang, B.H., Wan, F.J., Huang, S.T., & Tseng, C.J. (2000). Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarius of rats. *European Journal of Pharmacology*, 407, 83-89.
- Litvin, Y., Pentowski, N.S., Blanchard, D.C., & Blanchard, R.J. (2007). CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. *Hormones and Behavior*, 52, 244-251.
- MacDonald, J.F., Jackson, M.F., & Beazely, M.A. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Critical Reviews in Neurobiology*, 18, 71-84.
- Martinez, R.C., Carvalho-Netto, E.F., Amaral, V.C.S., Nunes-de-Souza, R.L., & Canteras, N.S. (2008). Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behavioural Brain Research*, 192, 185-190.
- Mayer, B., John, M., Heinzel, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., & Bohme, E. (1991). Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Letters*, 288, 187-191.
- McNaughton, N., & Corr, P.J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 285-305.
- Mendes-Gomes, J., & Nunes-de-Souza, R.L. (2005). Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Research*, 1047, 97-104.
- Mendes-Gomes, J., & Nunes-de-Souza, R.L. (2009). Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: influence of concurrent nociceptive stimulation. *Behavioural Brain Research*, 203, 180-187.
- Miguel, T.T., & Nunes-de-Souza, R.L. (2006). Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Research*, 1076, 42-48.
- Miguel, T.T., & Nunes-de-Souza, R.L. (2008). Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Research*, 1240, 39-46.
- Molchanov, M.L., & Guimaraes, F.S. (1999). Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1533-1537.
- Molchanov, M.L., & Guimaraes, F.S. (2002). Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology*, 160, 30-38.
- Mungrue, I.N., Bredt, D.S., Stewart, D.J., & Husain, M. (2003). From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiologica Scandinavica*, 179, 123-135.
- O'Boyle, M. (1974). Rats and mice together: the predatory nature of the rat's mouse-killing response. *Psychological Bulletin*, 81, 261-269.
- O'Boyle, M. (1975). The rat as a predator. *Psychological Bulletin*, 82, 460-462.
- Onstott, D., Mayer, B., & Beitz, A.J. (1993). Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research*, 610, 317-324.
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54, 581-618.
- Paakkari, I., & Lindsberg, P. (1995). Nitric oxide in the central nervous system. *Annals of Medicine*, 27, 369-377.
- Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., & Mayer, B. (1996). Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine. *British Journal of Pharmacology*, 118, 1433-1440.
- Prast, H., & Philippu, A. (2001). Nitric oxide as a modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*, 64, 51-68.
- Rodgers, R.J., & Johnson, N.J.T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52, 297-303.
- Schubert, K., Shaikh, M.B., & Siegel, A. (1996). NMDA receptors in the midbrain periaqueductal gray mediate hypothalamically evoked hissing behavior in the cat. *Brain Research*, 726, 80-90.
- Seeburg, P.H. (1993). The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14, 297-303.
- Teixeira, K.V., & Carobrez, A.P. (1999). Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behavioral Neuroscience*, 113, 196-203.
- Yang, M., Augustsson H., Markham, C.M., Hubbard D.T., Webster D., Wall, P.M., Blanchard, R.J., & Blanchard, D.C. (2004). The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology and Behavior*, 81, 465-473.
- Zhang, H.Q., Fast, W., Marletta, M.A., Martasek, P., & Silverman, R.B. (1997). Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N^ω-propyl-L-arginine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 3869-3870.