

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS E TOXICOLÓGICOS
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA



Efeitos ansiogênicos do óxido nítrico no córtex pré-frontal medial de camundongos

Lígia Scarpa Vilar
ARARAQUARA – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS E TOXICOLÓGICOS
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

Efeitos ansiogênicos do óxido nítrico no córtex pré-frontal medial de camundongos

Lígia Scarpa Vilar

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
Co-Orientador: Dr. Tarciso Tadeu Miguel

ARARAQUARA – SP
2011

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor e dedicação presente em todos os momentos de minha vida. Agradeço pelo apoio, investimento e incentivo em meus estudos.

À República Raparigaz e por todos os momentos lá vividos.

Às companheiras de república Cyntia, Maíra, Anna Maria e Lígia pelos momentos compartilhados e pela amizade. Vocês foram essenciais em Araraquara.

Às amigas e agregadas Bruna e Milena pela amizade verdadeira e por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos Matheus (Capiáu), Luiz (Lobão), Luciano, Renato (Tumolto), Milena, Maíra e Cyntia por estarem comigo desde o início da faculdade. Obrigada pelos momentos inesquecíveis que tivemos juntos.

Às amigas da turma 78 Jamile, Carol, Naiana, Mariana (Pratinha), Thaís (Gêmea), Nathália (Rondeli), Amandinha, Naira (Miyakuda) e Fer Freitas com quem convivi e tenho muita amizade.

Às amigas de infância Carol e Paula por tudo que vivemos juntas e por sempre me incentivarem, mesmo que distantes.

Ao professor Ricardo pela oportunidade fornecida. Agradeço sua orientação, paciência, disponibilidade em ajudar e sua amizade.

Ao grande amigo e co-orientador Tarciso pela enorme contribuição nesse projeto. Sua ajuda e companheirismo foram cruciais para que eu conseguisse finalizar essa etapa. Muito obrigada!

Aos amigos de laboratório Karina, Kelciane, Tatiane, Diego, Ludimila, Sheila, Paula, Tirene, Paulo, Bruna, Matheus, Igor, Tarciso e Ana Cláudia pela ajuda e pelas risadas.

Às técnicas do laboratório Beth e Rô pela grande vontade em ajudar, pela paciência e tempo dedicados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pelo suporte físico e a todos seus funcionários pela atenção.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo.....	07
Lista de Figuras.....	06
1. Introdução.....	09
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1 Sujeitos.....	19
3.2 Cirurgia e administração de drogas no CPFm.....	20
3.3 Fármacos.....	20
3.4 Avaliação dos comportamentos de defesa.....	21
3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	21
3.5 Histologia.....	22
3.6 Análise Estatística.....	23
4. Resultados.....	23
4.1 Sítio de injeção.....	23
4.2 Avaliação do efeito da microinjeção de diferentes doses de NOC-9 no CPFm sobre os índices de ansiedade.....	25
4.2.1 Análise das medidas espaço-temporais.....	25
4.2.2 Análise das medidas complementares ou etológicas.....	27
5. Discussão.....	30
6. Referências Bibliográficas.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia ilustrando o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para camundongos.

Figura 2 A. Fotomicrografia de um corte coronal do prosencéfalo de sujeito representativo demonstrando a localização de um ponto de injeção no subnúcleo infra-límbico (IL) do CPFm.

Figura 2 B. Representação esquemática dos sítios de microinjeção considerados positivos (Legenda: Cg1, Cg2 – Cingulado; PrL – Pré-límbico e IL – Infra-límbico).

Figura 3. Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol/0,2 µL) no CPFm de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCEp (superior).

Figura 4. Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) no CPFm de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD).

Figura 5. Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) no CPFm de camundongos sobre o comportamento de esticar-se (SAP).

Figura 6. Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) no CPFm de camundongos sobre os comportamentos: frequência de entradas na extremidade distal dos braços abertos e Levantamentos.

RESUMO

Medo e a ansiedade são emoções que têm origem nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência, tais como confrontos com o predador ou com animais da mesma espécie.

Em se tratando da espécie humana, estas respostas defensivas eliciadas representariam a ocorrência de transtornos de ansiedade e, a busca por sua compreensão, resultou no desenvolvimento de modelos animais de ansiedade, dentre os quais se destaca o labirinto em cruz elevado (LCE) que é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos.

Com relação aos substratos neurais envolvidos nestas manifestações, cabe destacar a matéria cinzenta periaquedutal bem como estruturas prosencefálicas, como o córtex pré-frontal (CPFm), uma estrutura límbica que tem sido frequentemente descrita como relevante na neurobiologia da ansiedade.

O óxido nítrico (NO) tem sido investigado em diferentes estruturas cerebrais de roedores nas quais foram evidenciadas respostas pró-aversivas. Sendo o CPFm uma estrutura que contém neurônios nitrérgicos, este estudo teve o objetivo de investigar o efeito da facilitação nitrérgica através da injeção intra-CPFm de um doador de NO, o NOC-9 [6-(Hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina], sobre o comportamento de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

Métodos e Resultados: Camundongos Suíços machos (25-35g, n = 53) receberam implante de cânula guia no CPFm. Cinco dias após, os animais receberam microinjeção de veículo ou NOC-9 nas doses de (1,875 nmol; 18,75 nmol; 37,5 nmol ou 75nmol) e, após cinco minutos, foram expostos ao LCE com o

propósito de registrar os níveis de ansiedade e de locomoção. Todos os resultados obtidos foram submetidos a ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan. A injeção de NOC-9, somente na dose de 18,75 nmol, diminuiu a porcentagem de entradas e nas doses de 18,75 e 37,5 nmol, a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. As demais doses não alteraram tais índices. Assim, nenhuma das doses empregadas neste trabalho alterou a locomoção do animal comparada a seu controle. A injeção de NOC-9 nas doses 18,75 e 37,5 nmol reduziu o comportamento de mergulhar a cabeça nos braços abertos do LCE. Com relação ao HD nas áreas protegidas, não houve diferenças significativas entre os grupos e o controle. Somente a dose de 18,75 nmol de NOC-9 reduziu o comportamento de esticar-se nos braços abertos do LCE e intensificou o mesmo comportamento nas áreas protegidas. Somente a dose de 18,75 nmol, reduziu a frequência de entradas na extremidade distal dos braços abertos do aparato. Além disso, demonstrou também uma tendência à redução nas doses de 37,5 e 75 nmol. Com relação aos levantamentos a ANOVA não revelou diferenças significativas em nenhuma das doses de NOC-9.

Conclusões: a microinjeção intra-CPFm de NOC-9 nas doses 18,75 e 37,5, foi eficaz em produzir efeitos ansiogênicos. A análise etológica corroborou os efeitos verificados na análise espaço-temporal no LCE, uma vez que nem a dose mais baixa (1,875 nmol) nem a mais elevada de NOC-9 (75 nmol) provocaram qualquer efeito sobre os comportamentos de avaliação de risco ou de exploração do LCE através da frequência de levantamentos. Assim, o CPFm demonstrou ser uma região importante na mediação das respostas defensivas tendo o NO como um provável neurotransmissor envolvido na elaboração de tais comportamentos.

1 INTRODUÇÃO

Medo e ansiedade são emoções eliciadas 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 confrontos com animais da mesma espécie, exposição a lugares novos, altura e espaços abertos, podem resultar na exibição de um repertório de respostas comportamentais. Estas respostas (luta, fuga, imobilidade, vocalização, etc.) são denominadas reações de defesa e estão acompanhadas da ativação autonômica (taquicardia, hipertensão, defecação, etc; BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD; BLANCHARD, 2003).

As pesquisas e os trabalhos relacionados à ansiedade e ao medo se tornaram relevantes com bases nos estudos originais de Charles Darwin, publicados no seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872, Apud ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). A partir daí, 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, possuem certas respostas em comum no que diz respeito à expressão emocional, tornando possíveis comparações entre o seu comportamento e de outros animais (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Outros estímulos ambientais, como altura excessiva, iluminação intensa, tempestades, incêndio, exposição a lugares novos, também são caracterizados como aversivos e podem provocar as mesmas reações, que são compostas de comportamentos de fuga e/ou ataque defensivo (luta), esquiva ativa e inibitória, congelamento (*freezing*), avaliação de risco ou ainda pela ativação autonômica

como taquicardia, vasoconstrição, aumento da pressão arterial (BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD; BLANCHARD, 2003).

Estas reações, somadas à outras alterações fisiológicas, como liberação de hormônios e neurotransmissores [ex., adrenalina, CRF/ACTH (hormônio adrenocorticotrófico)/cortisol, glutamato, etc.)], preparam o organismo para responder àquela ameaça, seja fugindo da mesma ou enfrentando-a. Esse preparo abrange a exibição das reações acima citadas, sendo todas elas ferramentas importantes para preservação da vida (BLANCHARD et al., 2001, 2003).

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 podem originar os transtornos de ansiedade (BLANCHARD et al., 2001; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004)

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 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. 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.

Como ressalta Hetem (2004), nem sempre é fácil distinguir entre a ansiedade normal e aquela patológica, considerada doença. Segundo esse autor, 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.

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por manifestações psíquicas tais como agressividade, nervosismo, sensação de mal estar, pânico, etc, assim como manifestações somáticas que incluem alterações cardiovasculares (aumento da pressão arterial, taquicardia, etc), gastrointestinais (boca seca, náuseas, diarreia, etc), respiratórias (sensação de falta de ar), dentre outras (HETEM, 2004).

O sistema encefálico de defesa é composto por importantes estruturas que atuam na mediação das reações características de ansiedade e medo, por exemplo, reações de fuga e luta. Dentre elas, pode-se destacar o hipotálamo, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e a amígdala (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). Com relação a essas estruturas, McNaughton e Corr (2004) propuseram que estruturas do chamado sistema de inibição comportamental (SIC) teriam papel fundamental no estado de ansiedade e, neste caso, estruturas como o sistema septo-hipocampal e a amígdala seriam as principais envolvidas no processo. Entretanto, o estado de medo envolveria estruturas mais caudais como o hipotálamo

medial e a matéria cinzenta periaquedutal, mais especificamente a sua parte dorsal (MCPd) que tem sido identificada como um dos principais substratos da aversão no sistema nervoso central (GRAEFF, 2004).

As estruturas acima apresentadas são reconhecidamente relacionadas aos comportamentos defensivos, porém ainda é necessário estudos para o entendimento de outras possíveis vias neurais envolvidas. Neste sentido, há evidências de que o córtex pré-frontal (CPF) seja um sítio chave, desempenhando importante papel em tais comportamentos (MCNAUGHTON; CORR, 2004). Entretanto, por ser uma estrutura prosencefálica, estaria mais relacionado a comportamentos mais sutis e elaborados, ao contrário de estruturas mesencefálicas que estariam mais relacionadas a comportamentos explosivos. Corroborando essas informações, lesões no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos diminuíram os níveis de ansiedade demonstrados pelo aumento do tempo e da frequência de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (GONZALEZ et al., 2000; LACROIX et al., 2000; SHAH et al., 2003), além de aumentar a interação social em ratos (GONZALEZ et al., 2000; SHAH; TREITE, 2003). Assim, estes resultados sugerem que o CPFm é um complexo envolvido na mediação da ansiedade.

O CPFm é uma estrutura límbica complexa, ou seja, está relacionada com a mediação das emoções e é subdividida em três sítios considerados neste trabalho (Figura 2): pré-límbico (PrL), infra-límbico (IL) e cingulado (Cg). O CPFm envia projeções neurais para o caudado putamen e para o núcleo e periferia do núcleo *accumbens*, uma estrutura bastante relacionada com respostas emocionais, sobretudo aquelas associadas ao sistema de recompensa e dependência de drogas psicoativas, além de também integrar respostas relacionadas ao estresse (DENIAU;

CHARPIER; MENETREY, 1996; SESACK; PICKEL, 1992). As três regiões descritas são densamente povoadas por neurônios que secretam e liberam uma variedade de neurotransmissores os quais atuam na mediação de diversas respostas neurais, incluindo-se aquelas relacionadas à ansiedade. Assim, dentre os diferentes sistemas de neurotransmissores no CPFm podemos destacar o ácido gama amino butírico (GABA), o glutamato e também o neurotransmissor atípico óxido nítrico (NO).

Existem importantes evidências da presença de neurônios nitrérgicos nesta estrutura (SAMMUT; WEST, 2008) e estudos apontam a interação do NO com outros neurotransmissores, bem como com outras áreas através de eferências NOS positivas (PRAST; PHILIPPU, 2001). Neste sentido, estudos demonstraram que o córtex pré-frontal envia projeções NOS positivas ao estriado dorsal e ventral (VUILLET et al. 1989; SALIN et al. 1990; KAWAGUCHI, 1997). Além disso, Sammut, Park e West (2007) demonstraram que o aumento da neurotransmissão glutamatérgica corticoestriatal através da estimulação elétrica do CPFm é particularmente eficaz em facilitar a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), assim como a neurotransmissão nitrérgica. Outro importante indício da ação nitrérgica no córtex pré-frontal foi a redução das respostas desencadeadas pela estimulação desta estrutura, após tratamento com uma droga sequestradora de NO, o Carboxi-PT10 (WEST; GRACE, 2004). Finalmente, Montague et al. (1994) demonstraram que a inibição da enzima sintetase de óxido nítrico (NOS; enzima de síntese do NO) com o composto L-NOARG (N ω -nitro-L-arginina) diminuiu a liberação de glutamato e noradrenalina induzidas pela ativação de receptores glutamatérgicos NMDA em neurônios corticais.

O glutamato e o óxido nítrico possuem importantes propriedades excitatórias sobre as sinapses. Porém, o NO é reconhecido como agente excitatório inespecífico, excitando tanto sinapses inibitórias (exemplo gabaérgicas) quanto excitatórias (exemplo glutamatérgicas), podendo levar, em determinadas situações, a efeitos finais duais (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988).

Existem evidências sugestivas de que a ação ansiogênica do glutamato está relacionada com a síntese de óxido nítrico (NO), possivelmente induzida quando seus 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. Tem sido demonstrado papel pró-aversivo do NO, que também pode facilitar a liberação de neurotransmissores como o glutamato e o CRF (fator liberador de corticotrofina, do inglês “corticotropin-releasing factor”) (LEE; KIM; RIVIER, 1999; PRAST; PHILIPPU, 2001; RABER; KOOB; BLOOM, 1995), outro composto com ações sabidamente excitatórias (BALDWIN et al., 1991; BOWERS; BEHBEHANI; SWISHER, 2005; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997; SAHUQUE et al., 2006).

Tomadas em conjunto, tais evidências são sugestivas de que o NO pode interferir na modulação de respostas defensivas no CPFm.

O NO é um gás inorgânico incolor, altamente reativo por apresentar um elétron desemparelhado em sua órbita externa (GUIX et al., 2005). No organismo é considerado um neurotransmissor atípico, devido a sua alta difusibilidade através de membranas biológicas e por não ser armazenado em vesículas sendo produzido quando necessário e, então, rapidamente degradado (GALLY et al., 1990). Este

composto é produzido a partir da reação entre a L-arginina e o oxigênio que é catalisada sob a ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e seu cofator, o fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH – MAYER et al. 1991; LOHSE; FORSTERMANN; SCHMIDT, 1998). Assim, a oxidação da L-arginina leva à produção de L-citrulina e NO.

Existem três isoformas da NOS: NOS I ou NOS_n, presente nos neurônios, a NOS II ou NOS_i, induzida ou 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 constitutivas e tem suas atividades reguladas pela cálcio-calmodulina intracelular (KNOWLES et al., 1989; SHENG et al., 1992). Por exemplo, a presença de acetilcolina ou agonistas de NMDA aumentam a concentração plasmática de cálcio, levando a uma ativação destas isoformas. Outro importante ponto de controle baseia-se na fosforilação de resíduos específicos da NOS III, através da PKA (proteína quinase dependente de AMPc) que diminui sua atividade (BRUÑE; LAPETINA, 1991; NAKANE et al., 1991; BREDT; FERRIS; SNYDER, 1992). Por outro lado, a atividade da isoforma II é independente da concentração de cálcio, pois seu sítio de ligação apresenta enorme afinidade pelo complexo cálcio-calmodulina e, por isso, é ativada mesmo em baixas concentrações deste íon (EBADI; SHARMA, 2003). Esta enzima é induzida na presença de lipopolissacarídeos bacterianos e/ou citocinas produzidas em resposta à presença destes (por ex: gamainterferona; STUEHR; GRIFFITH, 1992; FORSTERMANN et al., 1995; IADECOLA et al., 1995; MAYER; ANDREW, 1998).

As enzimas NOS apresentam atividade oxigenase e redutase, porém associadas a diferentes domínios catalíticos. O grupamento heme está presente no domínio oxigenase e a cálcio-calmodulina, o dinucleotídeo adenina flavina (FAD), mononucleotídeo flavina (FMN) e NADPH se ligam no domínio redutase (STUEHR, 1999). Desta forma, os elétrons do NADPH são transferidos ao ferro hêmico que está ligado ao oxigênio, catalisando a oxidação da L-arginina (GUIX et al., 2005; ABU-SOUD; STUEHR, 1993). A transferência de elétrons do domínio redutase para o oxigenase é regulada pela cálcio-calmodulina (MCMILLAN; MASTERS, 1995; RICHARDS; MARLETTA, 1994; GHOSH; STUEHR, 1995; LI; POULOS, 2005) e, por isso, o cálcio é necessário para essa transformação, com exceção das isoenzimas NOS_i onde o complexo permanece ligado à enzima mesmo sob concentrações muito baixas do íon cálcio (CHO et al., 1992; SALERNO et al., 1997).

O NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) combinando-se com seu grupo heme, que levará à formação de GMP cíclico (GMPc – FRIEBE; KOESLING, 2003) como segundo mensageiro e importante regulador de efeitos fisiológicos. Apesar de ser este seu principal mecanismo de ação, o NO pode ainda reagir com diversos metais, tióis e espécies de oxigênio e, assim, alterar proteínas, DNA e lipídios (YUN; DAWSON; DAWSON, 1997).

Existem evidências que 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, neurotoxicidade (excitotoxicidade), neuroproteção, liberação de hormônios (PRAST; PHILIPPU, 2001), ansiedade e comportamento defensivo (GUIMARÃES et al., 2005; MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, em preparação), entre outros.

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. Dessa forma, destaca-se a 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, Figura 1), amplamente utilizado como importante ferramenta para estudar comportamentos que expressam ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1990; PELLOW et al., 1985). 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). Este modelo baseia-se no medo natural de roedores a espaços abertos e é freqüentemente utilizado para avaliar a ansiedade, o potencial ansiolítico ou ansiogênico de drogas e como importante ferramenta no auxílio para o entendimento de mecanismos subjacentes aos comportamentos relacionados à ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985; RODGERS;

COLE, 1994). O LCE consiste de uma plataforma elevada do solo contendo dois braços fechados unidos perpendicularmente a dois braços abertos que caracterizam a situação aversiva. Portanto, nessa situação as estruturas pertencentes ao sistema encefálico de defesa são ativadas (DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993). Os níveis de ansiedade são avaliados pela esquia dos braços abertos (% de entradas e % de permanência nos braços abertos), enquanto a atividade locomotora é avaliada pela frequência absoluta de entradas nos braços fechados (PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994).

Assim, com base nos estudos citados anteriormente que ressaltam o papel excitatório do NO no CPFm, somados a presença de neurônios nitrérgicos nessa estrutura (SAMMUT; WEST, 2008), torna-se relevante a investigação do papel que o NO exerce na modulação das respostas defensivas nesta área encefálica.



Figura 1 - Fotografia ilustrando o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para camundongos.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da facilitação nitrérgica (através de um doador de NO, o NOC-9) no córtex pré-frontal medial sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 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.

3.2 Cirurgia e administração de drogas no CPFm

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 (100 e 10 mg/Kg, respectivamente). A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico, seguindo-se as coordenadas estereotáticas descritas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Para implantação da cânula guia objetivando atingir o CPFm, as seguintes coordenadas foram utilizadas: 1,8 mm anterior e 0,3 mm lateral (unilateral, sempre lado direito por padronização) ao bregma (encontro das suturas) e 2,0 mm ventral à superfície do crânio. A ponta da cânula guia foi posicionada + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções no CPFm foi feita através da inserção no interior da cânula guia de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento, conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microsseringa (marca Hamilton). Uma bomba de infusão foi programada para injetar as concentrações de 1,875 nmol; 18,75 nmol; 37,5 nmol ou 75 nmol de NOC-9 ou veículo. Após a microinjeção, a agulha de injeção permanecia por mais 30 segundos no interior da cânula guia para garantir escoamento e infusão da solução. 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.

3.3 Fármacos

Foi utilizado NOC-9 [6-(Hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina] um doador de óxido nítrico (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009), nas doses de 1,875 nmol/0,2µL; 18,75 nmol/0,2µL; 37,5 nmol/0,1µL ou 75 nmol/0,2µL. O fármaco foi solubilizado em TRIS-HCl em pH 10.

3.4 Avaliação dos comportamentos de defesa

Imediatamente após a injeção intra-CPFm das diferentes doses do NOC-9 ou veículo, os camundongos foram colocados em uma arena de vidro e após cinco minutos, foram expostos ao LCE durante cinco minutos para avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre os índices de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado.

3.4.1 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é similar ao descrito por Lister (1987) o qual 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. As paredes dos braços fechados são de vidro transparente e o assoalho de madeira do tipo fórmica.

Uma câmera filmadora, ligada a um aparelho de DVD e a uma TV, foi posicionada para gravar os experimentos, registrando todos os comportamentos do animal para posterior análise.

Os seguintes comportamentos foram registrados: frequência de entradas nos braços abertos (número de vezes em que o animal cruzava com as quatro patas linha divisória de cada braço), porcentagem de entradas nos braços abertos $[(\text{entrada nos braços abertos}/\text{total de entradas}) \times 100]$, porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos $[(\text{tempo no braço aberto}/300) \times 100]$ - utilizados como índices de ansiedade; frequência de entradas nos braços fechados (número

de vezes em que o animal cruzava com as quatro patas linha divisória de cada braço). Além da análise espaço-temporal acima descrita, foram analisados as seguintes medidas complementares ou etológicas:

- a. Mergulho da cabeça (HD: do inglês “head dipping”, movimento de inclinar a cabeça além dos limites do aparato em direção ao solo da sala) em compartimento não protegido (braços abertos, HD desprotegido) ou protegido (centro do aparato, HD Protegido).
- b. Comportamento de esticar-se (SAP: do inglês “stretched-attend postures”, movimento com o tronco e cabeça para frente, esticando-se e retornando à posição inicial sem concluir o passo a frente com as patas traseiras), também realizado em compartimento não protegido (braços abertos, SAP desprotegido) ou protegido (centro do aparato, SAP Protegido).
- c. Frequência de entradas na porção distal dos braços abertos (10 cm distais dos braços abertos)
- d. Frequência de levantamentos (postura do animal em posição bípede com as patas dianteiras apoiadas ou não nas paredes do aparelho)

3.5 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.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA monofatorial, seguida pelo teste de post-hoc de Duncan. Em todos os casos um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Sítio de injeção

A Figura 2 exemplifica um corte histológico demonstrando o córtex pré-frontal medial, alvo dos experimentos realizados neste trabalho. Abaixo, uma fotomicrografia de um ponto de infusão para melhor visualização e localização da estrutura (2A). A seção corresponde a + 1,70 mm a partir do bregma, de acordo com o Atlas para encéfalo de camundongos de Paxinos e Franklin (2001). Em 2B está a representação esquemática obtida do Atlas de Paxinos e Franklin (2001) das figuras e as distâncias do bregma (encontro das suturas) do animal.

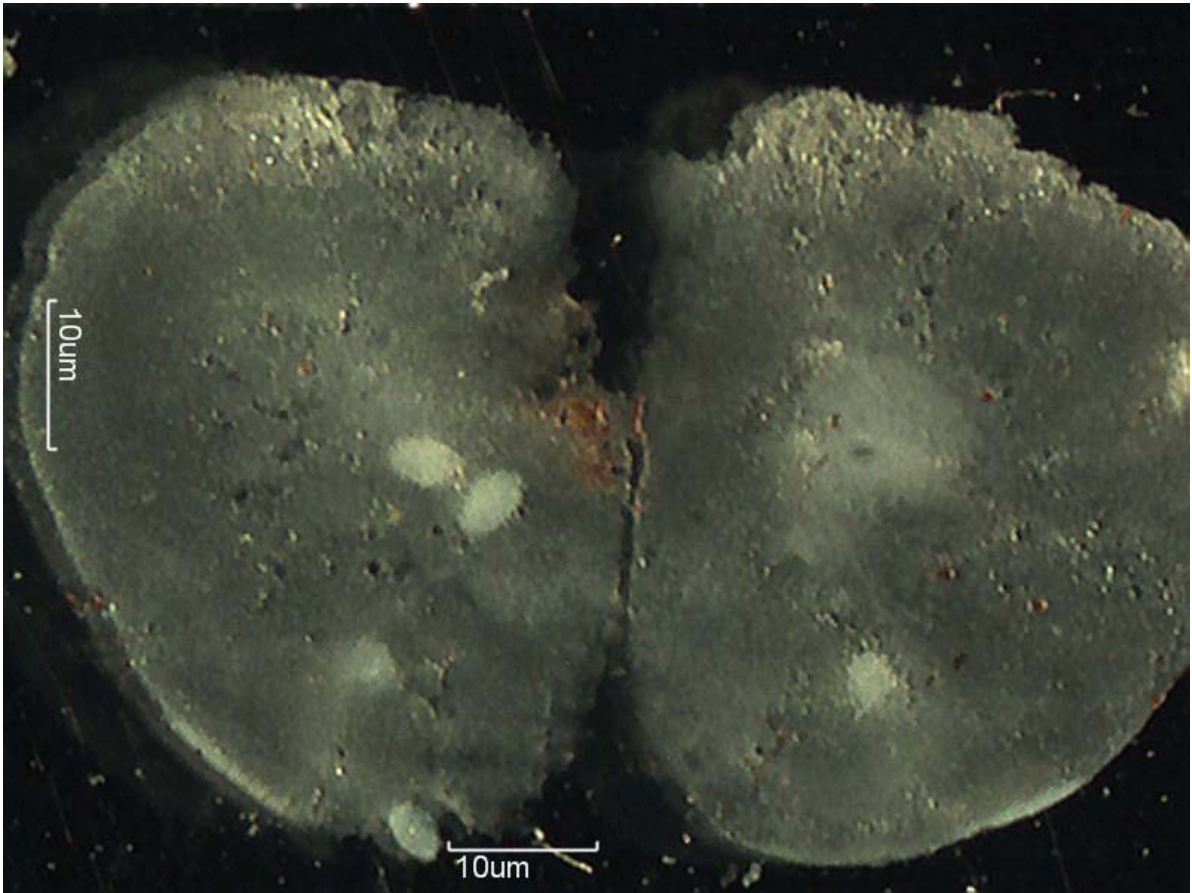


Figura 2A - Fotomicrografia de um corte coronal do prosencéfalo de sujeito representativo demonstrando a localização de um ponto de injeção no subnúcleo infra-límbico (IL) do CPFm.

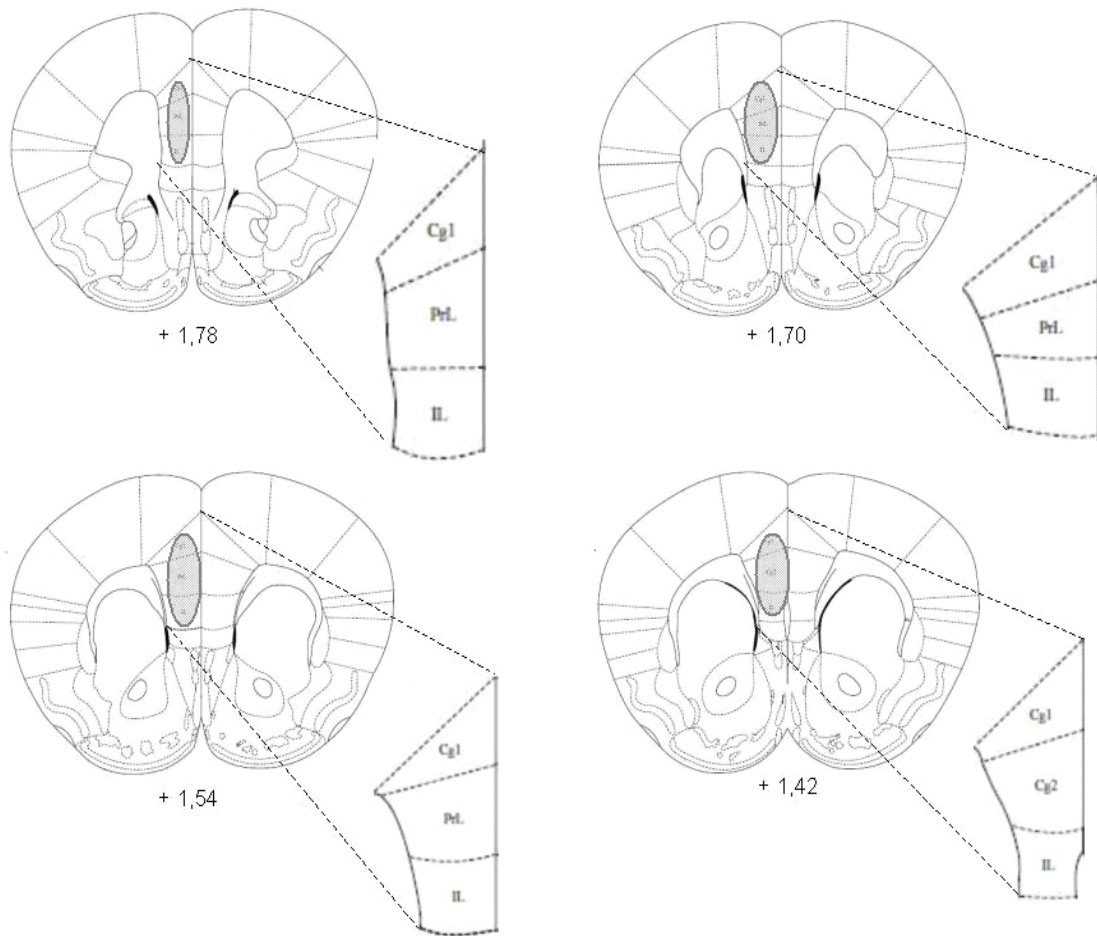


Figura 2 B - Representação esquemática dos sítios de microinjeção considerados positivos (Legenda: Cg1, Cg2 – Cingulado; PrL – Pré-límbico e IL – Infra-límbico).

4.2 Avaliação do efeito da microinjeção de diferentes doses de NOC-9 no CPFm sobre os índices de ansiedade

4.2.1 Análise das medidas espaço-temporais

A Figura 3 mostra os índices de ansiedade (porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) avaliados em animais submetidos ao LCE padrão após

receberem injeção intra-CPFm de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol). A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que a injeção de NOC-9, somente na dose de 18,75 nmol, diminuiu a porcentagem de entradas ($F_{4,48} = 3,49$; $p < 0,05$) e nas doses de 18,75 e 37,5 nmol, a porcentagem de tempo gasto ($F_{4,48} = 3,9$; $p < 0,05$) nos braços abertos do LCE. As demais doses não alteraram tais índices. Embora a ANOVA tenha também revelado diferenças significativas do tratamento sobre a frequência de entradas nos braços fechados do aparato ($F_{4,48} = 2,6$; $p < 0,05$) comparações posteriores (Teste post hoc de Duncan) indicaram que nenhuma das doses alterou essa medida quando comparada ao controle (veículo), apenas a dose de 37,5 nmol foi diferente da dose de 18,75 nmol. Assim, nenhuma das doses empregadas neste trabalho alterou a locomoção do animal.

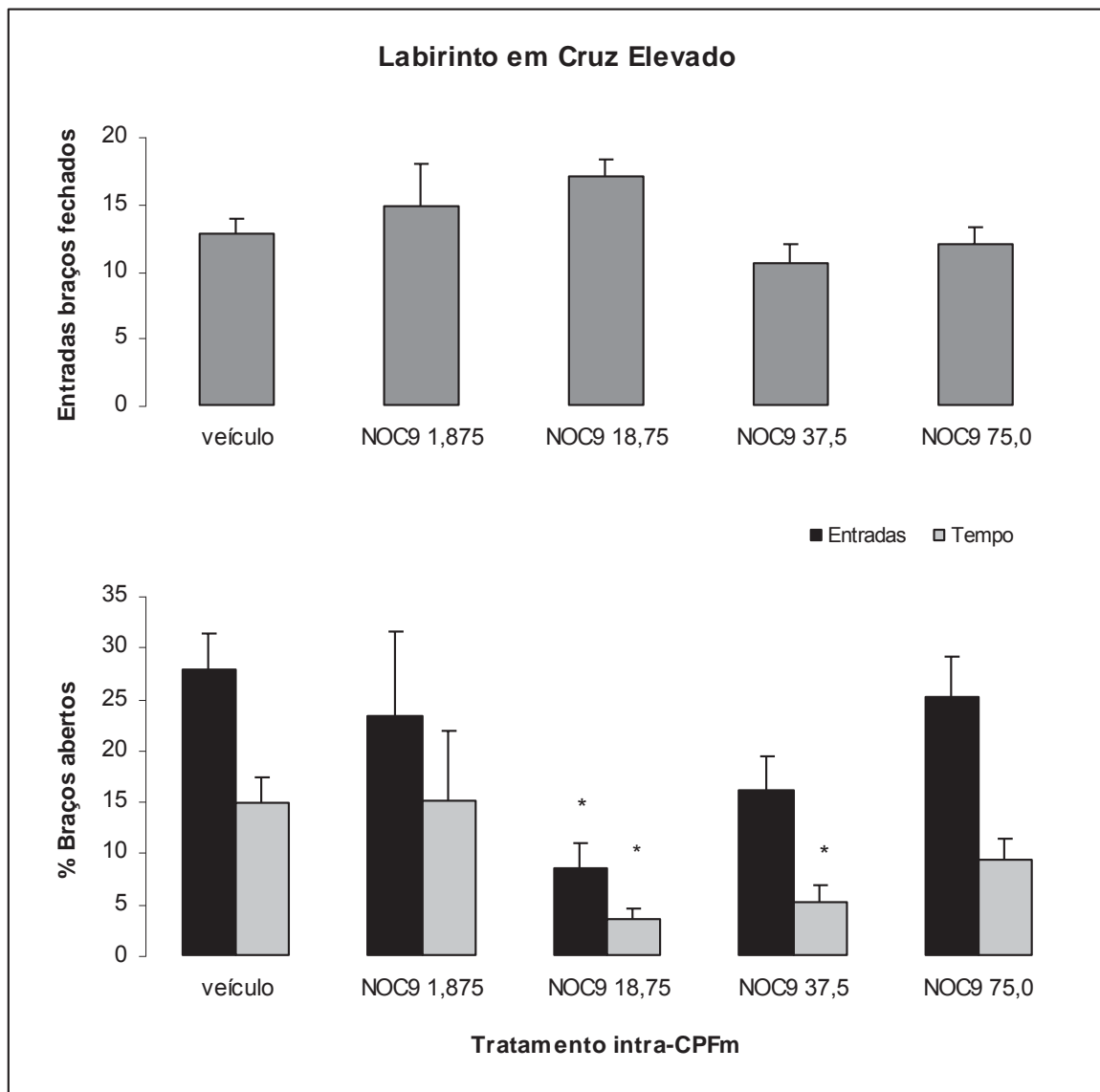


Figura 3 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol/0,2 μ L) no CPFm de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCEp (superior). As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 6-15 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.2.2 Análise das medidas complementares ou etológicas

As Figuras 4, 5 e 6 mostram os efeitos da injeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) sobre as medidas comportamentais complementares ou

etológicas: HD desprotegido, HD protegido, SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade distal dos braços abertos e frequência de levantamentos.

ANOVA monofatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de NOC-9, nas doses 18,75 e 37,5 nmol, reduziu o comportamento de mergulhar com a cabeça nos braços abertos do LCE (área desprotegida, HD desprotegido; $F_{4,48} = 3,8$; $p < 0,05$; Figura 4). Com relação ao HD nas áreas protegidas (HD protegido), não houve diferenças significativas entre os grupos e o controle ($F_{4,48} = 0,2$; $p = 0,95$; Figura 4).

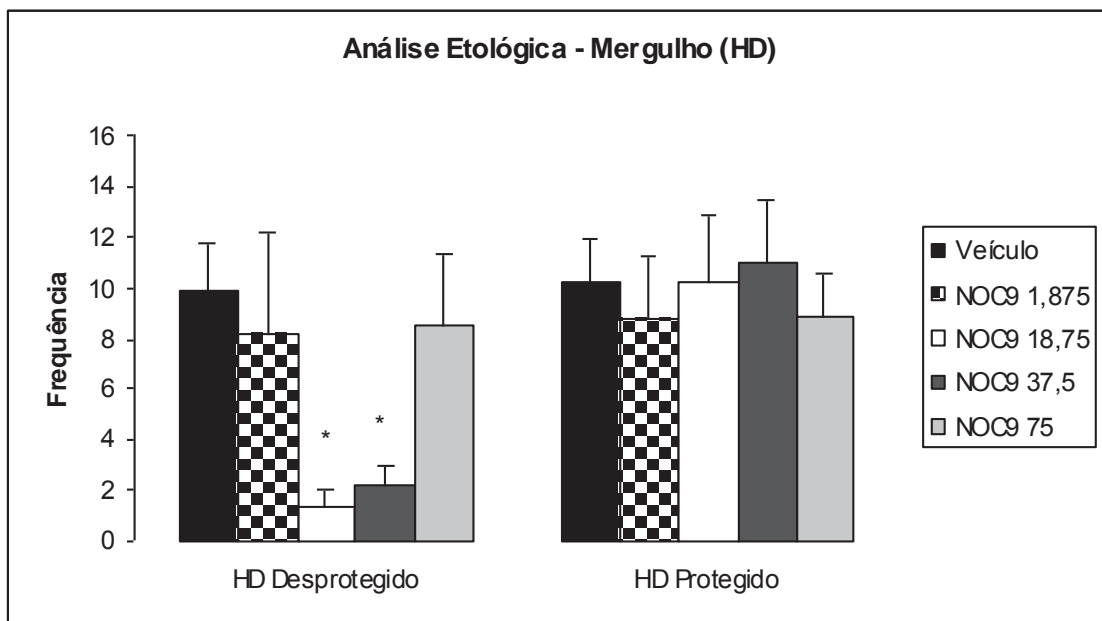


Figura 4 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) no CPFm de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD). As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 6-15 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

ANOVA monofatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de NOC-9, somente na dose de 18,75 nmol, reduziu o comportamento de

esticar-se (SAP) nos braços abertos do LCE (área desprotegida, SAP desprotegido; $p < 0,05$; Figura 5) e intensificou o mesmo comportamento nas áreas protegidas (SAP protegido; $F_{4,48} = 3,1$; $p < 0,05$; Figura 5). As demais doses de NOC-9 estudadas não provocaram diferenças significativas comparadas ao controle (Figura 5).

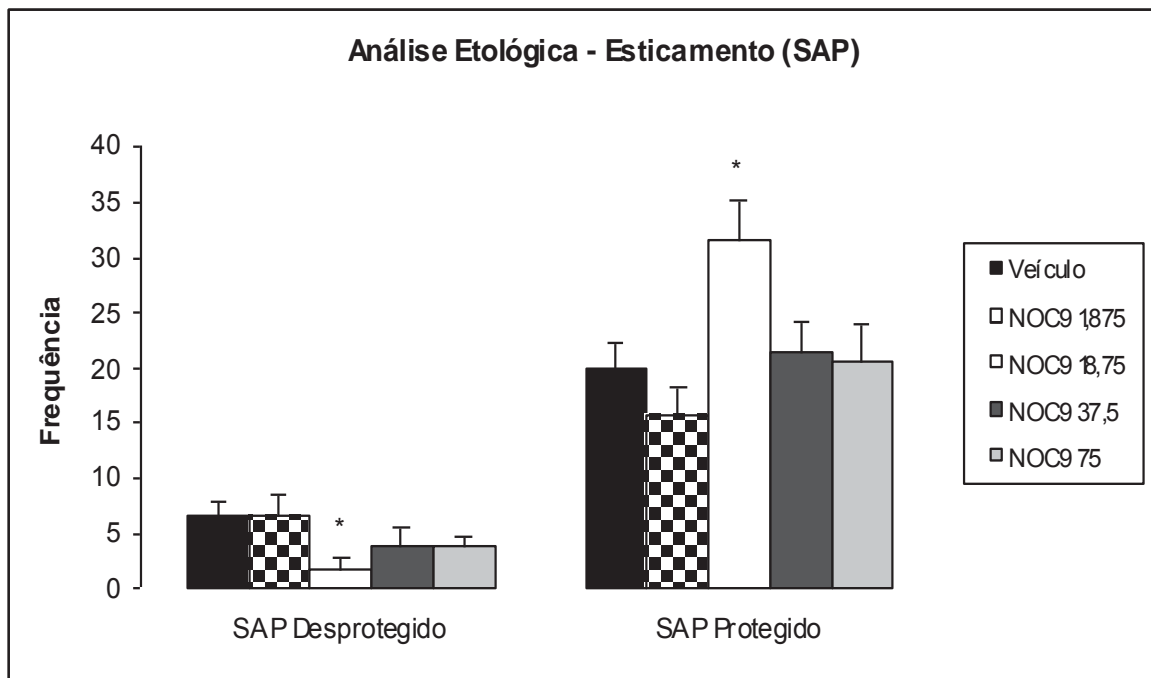


Figura 5 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) no CPFm de camundongos sobre o comportamento de esticar-se (SAP). As colunas representam as médias (\pm EPM). $N = 6-15$ animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

A Figura 6 mostra as frequências de entradas na extremidade distal dos braços abertos e de levantamentos. A ANOVA monofatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de NOC-9, somente na dose de 18,75 nmol, reduziu a frequência de entradas na extremidade distal dos braços abertos do aparato ($F_{4,48} = 2,9$; $p < 0,05$). Além disso, demonstrou também uma tendência à

redução nas doses de 37,5 e 75 nmol ($p= 0,08$ e $0,09$, respectivamente). Com relação à frequência de levantamentos, a ANOVA não revelou diferenças significativas com todas as doses de NOC-9 ($F_{4,48} = 1,9$; $p= 0,12$).

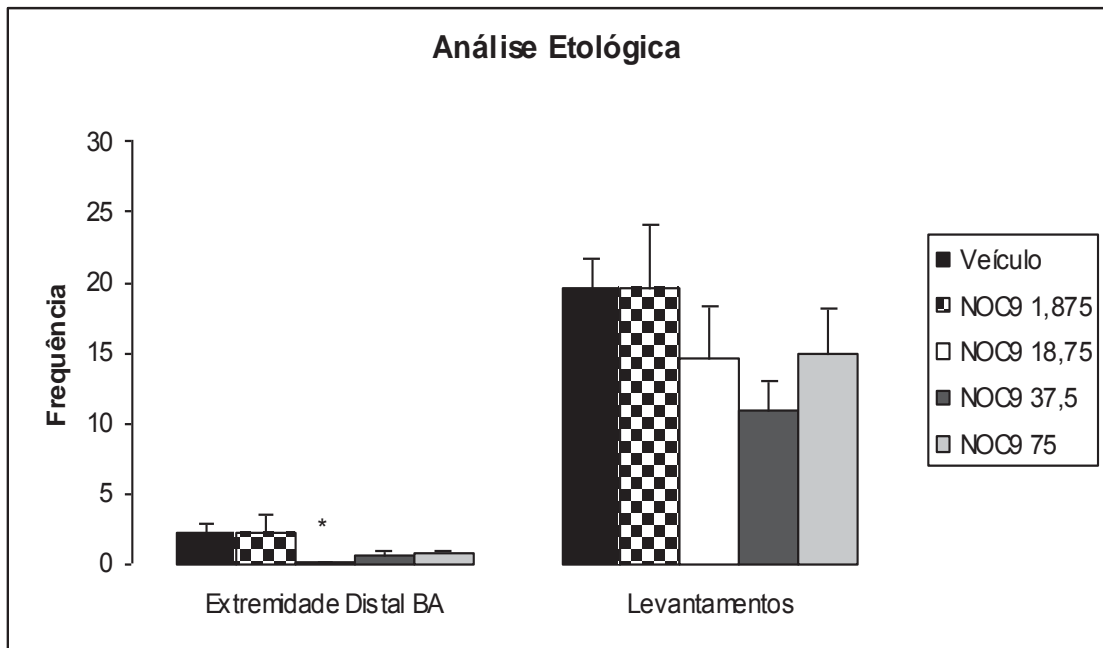


Figura 6 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 1,875, 18,75, 37,5 ou 75 nmol) no CPFm de camundongos sobre os comportamentos: frequência de entradas na extremidade distal dos braços abertos e Levantamentos. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 6-15 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

5 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados, a microinjeção intra-CPFm de NOC-9, nas doses 18,75 e 37,5 nmol, foi eficaz em produzir efeitos ansiogênicos evidenciados pela diminuição da exploração dos braços abertos do LCE e pela alteração nos comportamentos de avaliação de risco, tais como o comportamento de

esticar-se, mergulhar a cabeça e exploração da extremidade distal dos braços abertos. De modo interessante, cabe ressaltar que o mesmo fármaco em doses semelhantes àquela utilizada neste estudo, quando microinjetado em outra estrutura envolvida na mediação de respostas defensivas, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), provocou reações comportamentais explosivas, expressas por saltos e corridas, além de produzir congelamento (MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2011, em preparação). Além disso, resultados recentes ainda não publicados de nosso laboratório demonstraram que a microinjeção de NOC-9 no núcleo intersticial da estria terminal (BNST) uma estrutura pertencente ao complexo amigdaloide também envolvida na mediação da ansiedade, não provocou respostas comportamentais explosivas, porém induziu congelamento. Neste estudo, nenhum animal apresentou comportamentos como saltos e corridas ou congelamento após a microinjeção de NOC-9 no CPFm. Tomados em conjunto, estes resultados demonstram que a excitação provocada pela liberação de NO, através do doador, induz diferentes respostas, sendo que em todos os casos indicam aumento da ansiedade e/ou aversão, caracterizando diferentes tipos de mediações nos diferentes tipos de respostas de defesa exercida pelos sítios encefálicos.

Estes resultados corroboram os estudos de McNaughton e Corr (2004), os quais propõem uma hierarquia encefálica no controle dos comportamentos defensivos. Dessa forma, a ativação de estruturas mais caudais como a MCP estaria envolvida com o estado de medo (perigo real) e, portanto, com a exibição de respostas mais explosivas e reações de fuga e luta, tal como acontece após injeção de NOC-9 na MCP (MIGUEL, GOMES, NUNES-DE-SOUZA, em preparação). Por outro lado, estruturas mais rostrais, como o CPFm, estariam relacionadas com a

mediação da ansiedade (perigo potencial) e, portanto, com a exibição de respostas mais refinadas e elaboradas, quer sejam os comportamentos de avaliação de risco ou ainda as respostas observadas na exposição ao LCE, tal como observado no presente estudo. Neste sentido, os resultados obtidos com a injeção de NOC-9 no BNST (III Fórum em Neurobiologia do Estresse, 2011) também demonstraram um padrão intermediário de resposta defensiva, uma vez que não foram observados comportamentos explosivos, apenas a exibição de congelamento. Conforme descrito no presente estudo, tampouco congelamento foi observado com a injeção de NOC-9 no CPFm, sugerindo um papel hierarquicamente diferente desta estrutura límbica prosencefálica na modulação da expressão de comportamentos defensivos.

Além disso, a administração 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) presente na MCP (ONSTOTT; MAYER; BEITZ, 1993; VINCENT; KIMURA, 1992), atenuou a ansiedade avaliada no LCE em ratos (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 1997, 2001; GUIMARÃES et al., 1994), fortalecendo a participação do NO nas respostas de defesa.

Com relação ao córtex pré-frontal, Montague et al. (1994) demonstraram que a inibição da NOS com L-NOARG diminuiu a liberação de glutamato e noradrenalina induzidas pela ativação de receptores NMDA em neurônios corticais, sugerindo que a ação glutamatérgica é dependente de NO.

No entanto, há evidências de que a injeção de doadores de NO em áreas como a MCP produza efeitos tanto excitatórios como inibitórios, provavelmente devido à atuação em diferentes populações de neurônios. Assim, segundo Hall e Behbehani (1998), os efeitos excitatórios do NO são bloqueados na presença de

CNQX (antagonista de receptores AMPA) ou MK801 (antagonista de receptores NMDA), enquanto, por outro lado, a bicuculina (antagonista de receptor GABA) ou a naloxona (antagonista de receptores opióides) antagonizam os efeitos inibitórios dos doadores de NO. Tais resultados indicam que o NO deve influenciar a liberação pré-sináptica tanto de glutamato (excitatório) quanto de GABA e encefalinas (inibitórios), residindo neste fenômeno, o papel dual do NO, fato que muitas vezes torna difícil a interpretação e entendimento de seus efeitos.

Além disso, devem-se ressaltar as características físico-químicas do NO. Devido à sua alta lipossolubilidade (GALLY, 1990), o NO pode atuar não somente como mensageiro retrógrado local, mas também em neurônios distantes de seu local de ação. Assim, é provável que pequenas alterações na concentração local de NO sejam determinantes para provocar a resposta.

Os resultados anteriores de Hall e Behbehani (1998), obtidos com compostos relacionados ao NO, podem ser úteis na compreensão dos observados no presente estudo, em que se observou uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido. Neste sentido, a dose mais baixa de NOC-9 (1,875 nmol) foi inócua por provavelmente não provocar uma liberação suficiente de NO, para desencadear seu efeito excitatório e ansiogênico. Entretanto, de modo curioso, a dose mais elevada (75 nmol) também não provocou efeito final algum sobre a ansiedade. Baseando-se nos resultados prévios (HALL; BEHBEHANI, 1998; PRAST; PHILIPPU, 2001), a dose mais elevada pode ter provocado uma liberação intensa de NO, o qual, por sua vez poderia exercer sua influência excitatória tanto em vias glutamatérgicas (excitatórias) sabidamente ansiogênicas em outros sítios (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2008), como em vias GABAérgicas (inibitórias), cuja ativação em diversas

estruturas, incluindo-se o CPFm (SHA; SJOVOLD; TREIT, 2004) produz efeito ansiolítico. Desta forma, a ativação das duas vias produziria um efeito final nulo, o que foi evidenciado na dose de 75 nmol.

O mesmo padrão de resposta foi observado por Guimarães et al. (1994) em que a microinjeção intra-MCP de inibidores da NOS, L-NAME (10-200 nmol 0,5µL) e L-NOARG (10-100 nmol) produziram efeitos ansiolíticos no LCE. Entretanto, as doses mais elevadas de ambas as drogas levaram a efeitos ansiogênicos, caracterizando-se mais uma vez a ocorrência de uma curva dose-resposta do tipo “U” invertido. Os mesmos autores observaram que a injeção intra-MCP de azul de metileno (10, 30 ou 100 nmol/0,5 µL), um inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), atenuou o comportamento defensivo, porém apenas com a dose de 30nmol caracterizando também uma curva dose-resposta com o mesmo padrão anterior (GUIMARÃES et al., 1999).

A avaliação das medidas complementares ou etológicas corroborou os efeitos verificados com a análise das medidas espaço-temporais no LCE, uma vez que nem a dose mais baixa (1,875 nmol) nem a mais elevada (75 nmol) de NOC-9 provocaram qualquer efeito sobre os comportamentos de avaliação de risco ou de exploração do LCE, através da frequência de levantamentos. Além disso, as doses intermediárias (18,75 e 37,5 nmol) provocaram alterações de tais comportamentos, expressos pela diminuição da avaliação de risco em áreas desprotegidas. Em doses intermediárias de NOC-9, a exploração destas áreas foi diminuída e houve aumento da avaliação de risco em áreas protegidas, sugerindo um aumento da cautela e da hesitação em deixar estas áreas protegidas para explorar as desprotegidas (braços abertos). Além disso, o tratamento com NOC-9 (18,75 nmol) provocou decréscimo

na exploração da extremidade distal dos braços abertos, indicando que tal região do LCE passou a apresentar-se mais aversiva para estes animais que para os animais controles.

Cabe ressaltar que a dose de 18,75 nmol provocou uma ação ansiogênica mais robusta, alterando um maior número de medidas etológicas que a dose 37,5 nmol. Esse perfil pode ser confirmado quando se leva em consideração também a análise das medidas espaço-temporais, uma vez que a dose de 18,75 provocou alteração dos dois índices de ansiedade (porcentagens de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE), enquanto a dose de 37,5 alterou somente o índice porcentagem de tempo. Portanto, a partir de uma concentração ideal de NOC-9, que segundo este estudo seria a de 18,75 nmol, o aumento da concentração deste composto provocaria efeitos excitatórios inespecíficos, o que levaria a um efeito ansiogênico mais ameno, mas ainda presente como na dose de 37,5 nmol ou na abolição de tal efeito como observado na dose de 75 nmol.

Finalmente, a dose de 18,75 nmol foi a que melhor se pôde observar o efeito ansiogênico do NOC-9 no CPFm de camundongos. Esta constatação se deu tanto na análise das medidas comportamentais espaço-temporais como etológicas. Diante disso, a dose de 18,75 nmol será utilizada em experimentos futuros voltados a caracterizar o papel dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e CRFérgicos nos efeitos pró-aversivos desencadeados pela facilitação nitrérgica no CPFm.

6 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.

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

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

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.

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

BOWERS, L.K.; BEHBEHANI, M.M; SWISHER, C.B. 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, 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.

BRETT, 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.

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.

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.

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

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.

DENIAU, J.M.; CHARPIER, S.; MENETREY, A. The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. **Neuroscience**, v.73, p.761–781, 1996.

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.

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.

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.

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.

FARIA, et al.

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.

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.

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.

GONZALEZ, L.E. et al. Medial prefrontal transection enhances social interaction: Behavioral studies. **Brain Research**, v.886, p.7-15, 2000.

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

GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1^a. ed., p.55-73, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

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.

GUIMARÃES et al. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport.**, v.5, n.15, p.1929-32, 1994.

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.; DE OLIVEIRA, R.W. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Braz J Med Biol Res.**, v.32, n.12, p.1529-32, 1999.

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.

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

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

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.

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.

KAWAGUCHI, Y. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. **Neurosci. Res.**, v.27, p.1-8, 1997.

KNOWLES, R.G., et al., Formation 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.

LACROIX, L.; FELDON, J.; HEIDBREDER, C.A.; SPINELLI, S. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behav. Neurosci.**, v.114, n.6, p.1119–1130, 2000.

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.

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.

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

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

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.

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

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.

MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedebergs 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 Let.**, v.288, p.187-91, 1991.

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.

MIGUEL, T.T.; GOMES, K.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Blocked of defensive behavior – and nociception – induced by nitric oxide with CRFr1 antagonist within the dorsal periaqueductal gray matter in mice: a one way path?, em fase de elaboração.

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.**, v.1240, p.39-46, 2008.

MONTAGUE, P.R. et al. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. **Science**. V.263, n.5149, p.973-7, 1994.

NAKANE, M., et al. Phosphorylation by calcium 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.

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

RANG, P.H.; DALE, M.M.; FLOWER, J.R.; RITTER, J.M. **Farmacologia.** Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

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.

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.

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.

SALIN, P. et al. Somatostatin-immunoreactive neurons in the rat striatum: effects of corticostriatal and nigrostriatal dopaminergic lesions. **Brain Res.**, v.521, p.23–32, 1990.

SAMMUT, S.; PARK, D.J.; WEST, A.R. Frontal cortical afferents facilitate striatal nitric oxide transmission in vivo via a NMDA receptor and neuronal NOS-dependent mechanism. **J Neurochem.**, v.103, n.3, p.1145-56, 2007.

SAMMUT, S.; WEST, A.R. Acute cocaine administration increases NO efflux in the rat prefrontal cortex via a neuronal NOS-dependent mechanism. **Synapse**. v.62, n.9, p.710-3, 2008.

SESACK, S.R.; PICKEL, V.M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v.320, p.145–160, 1992.

SHAH, A.A.; TREITE, D. Excitotoxic lesions of the medial PFC attenuate fear responses in the EPM, social interaction and shock probe burying tests. **Brain Res.**, v.969, p.183–194, 2003.

SHAH, A.A.; SJOVOLD, T.; TREIT, D. Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. **Brain Res.**, v.1028, n.1, p.112-5, 2004.

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.

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.

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.

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.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; 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.

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

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

VINCENT, S.R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of the nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v.46, p.755-84, 1992.

VUILLET, J. et al. Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. **Neurosci. Lett.**, v.100, p.99-104, 1989.

WEST, A.R.; GRACE, A.A. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. **J Neurosci.**, v.24, n.8, p.1924-35, 2004.

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.

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.; 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.

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.