

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

**EFEITOS ANSIOGÊNICOS DO ÓXIDO
NÍTRICO NO NÚCLEO INTERSTICIAL DA
ESTRIA TERMINAL DE CAMUNDONGOS**

MATHEUS PEGORARO FARIA

Araraquara – SP

2011

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

EFEITOS ANSIOGÊNICOS DO ÓXIDO NÍTRICO NO NÚCLEO INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL DE CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Estadual Paulista Júlio
de Mesquita Filho como requisito
para obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico

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

MATHEUS PEGORARO FARIA

Araraquara – SP
2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Nelson** e **Maria José**, que sempre apoiaram minhas decisões e compreenderam a minha dedicação neste trabalho. Por todo seu amor, carinho, sustento, conselhos e pela educação ensinada, nada em minha vida teria acontecido da forma brilhante que foi.

Aos meus irmãos, **Fernanda** e **Eduardo**, pela amizade, companheirismo, paciência e principalmente pelo amor. Por compreenderem minhas ausências em casa nos finais de semana, pelas conversas até madrugada e por serem não só irmãos, mas também amigos.

**“Procure ser um homem de valor, em vez
de ser um homem de sucesso.”**

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMENTOS

Nessa jornada de vinte e cinco anos muitas pessoas foram importantes na minha vida e na minha formação, guardarei com carinho todos vocês.

Em especial:

Aos meus amigos de Franca, **Zé, Joe e Canarinho** que sempre estiveram comigo, tanto nos momentos alegres como nos difíceis. Pelo companheirismo, pela confiança, pelo apoio e principalmente pela amizade que formamos.

Aos meus amigos da república **Quebra Tudo, Novilha, Oxy, PT, Loide, Debi, Tolima, Lobão, Blau Blau, Panda e Gota**, que estiveram comigo nessa fase tão importante da minha vida. Pelas conversas até tarde, pela amizade conquistada, pelas diferenças ignoradas, por aguentarem minha chatice, pelas risadas e por tornar Araraquara muito melhor do que já é.

À minha namorada **Camila**, pela sua dedicação a nós, por todo seu amor, amizade, paciência e companhia. Por participar dessa fase tão importante na minha vida.

Ao meu irmãozinho **Lobão**, que me acompanha desde o primeiro dia de faculdade. Por tudo que passamos aqui, pelas dificuldades da graduação, pelas festas, que não foram poucas, por me fazer rir o tempo todo e por ser esse grande amigo que é.

Por todos meus amigos do batidão, **Lu, Maíra, Lígia, Milena, Tomolto, Bruna, Thá, Lobão e Cyntia**. Pelos encontros nas noitadas, pelos aniversários comemorados, pelas idas ao torresmo e highlander e principalmente pela grande amizade formada nesses maravilhosos anos.

Ao professor **Ricardo**, que me recebeu tão bem no laboratório, pela dedicação aos alunos, por confiar em mim e por tornar mais possível minha ideia de mestrado.

Ao meu co-orientador **Tarciso**, que me ajudou desde o começo no laboratório, pelos valiosos ensinamentos, pelas longas conversas, pela amizade, pela confiança, pelas críticas, pelos conselhos e principalmente por ter me ajudado na decisão mais importante desses cinco anos.

Às técnicas do laboratório **Beth** e **Rô**, por toda sua dedicação, ensinamentos e paciência comigo.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, **Diego, Tati, Ana, Lúgia, Karina, Alexandre, Igor, Bia, Ana Clara, Paulão, Bruna, Paula, Javier, Ludimila, Sheila e Kelciane**.

A **Deus**, por sua presença em minha vida.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA.....	06
RESUMO.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Sujeitos.....	20
3.2 Cirurgia e administração de drogas no BNST.....	20
3.3 Fármacos.....	21
3.4 Avaliação dos comportamentos de defesa.....	21
3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	22
3.5 Histologia.....	23
3.6 Análise Estatística.....	24
4. Resultados.....	24
4.1 Sítio de injeção.....	24
4.2 Avaliação do efeito da microinjeção de diferentes doses de NOC-9 no BNST sobre os índices de ansiedade.....	26
4.2.1 Análise das medidas espaço-temporais.....	26
4.2.2 Análise das medidas complementares ou etológicas.....	27
4.2.2.1 Avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre os índices de ansiedade.....	27
5. Discussão.....	32
6. Referências Bibliográficas.....	37

JUSTIFICATIVA

Este trabalho de conclusão de curso é parte de um projeto de pesquisa do laboratório de Neuropsicofarmacologia da FCFAr/UNESP- Araraquara, intitulado “Papel do Fator de Liberação de Corticotrofina (CRF) e do Complexo Óxido Nítrico-GMPc na Neurobiologia das Reações de Defesa em Camundongos”. Neste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) estão apresentados resultados de relevada importância e contribuição para a continuidade do projeto de pesquisa que consistiu do estudo do perfil de atuação do fármaco NOC-9 [6-(Hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina]. Resultados importantes foram obtidos com relação à atuação do fármaco estudado e seu efeito sobre a ansiedade. Estes resultados servirão de base para futuros experimentos no desenvolvimento do projeto de pesquisa proposto. Com base nos experimentos realizados e os resultados obtidos, será proposto na época da defesa do trabalho de conclusão de curso, a alteração do título para **“EFEITOS ANSIOGÊNICOS DO ÓXIDO NÍTRICO NO NÚCLEO INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL DE CAMUNDONGOS”**. O título proposto é mais adequado às atividades de pesquisa realizadas no período no laboratório de neuropsicofarmacologia da FCFAr/UNESP.

RESUMO

Reações de defesa são respostas 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. O medo e a ansiedade são emoções que tem origem nestas reações, as quais envolvem respostas comportamentais e autonômicas e são acompanhadas da liberação de hormônios e neurotransmissores com função de preparar o organismo para responder àquela ameaça, seja fugindo ou enfrentando-a. 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), o qual se baseia na aversão natural de roedores a espaços abertos.

Com relação aos substratos neurais envolvidos nestas manifestações, cabe destaque estruturas mesencefálicas, como a matéria cinzenta periaquedutal e núcleos da rafe, bem como prosencefálicas, como o complexo amidalóide e o córtex pré-frontal. O chamado complexo amidalóide ou amígdala estendida compreende estruturas límbicas do prosencéfalo basal, incluindo-se o núcleo intersticial da estria terminal (do inglês: bed nucleus of stria terminalis, BNST) como uma área promissora no estudo da ansiedade. Uma variedade de neurotransmissores tem sido descrita como participante da mediação das respostas emocionais no BNST. Dentre eles, o chamado neurotransmissor atípico óxido nítrico (NO) tem sido investigado em diferentes estruturas cerebrais de roedores nas quais foram evidenciadas respostas pró-aversivas.

Sendo o BNST uma estrutura que contém neurônios nitrérgicos, este estudo teve o objetivo de investigar o efeito da facilitação nitrérgica através da injeção intra-BNST de um doador de NO, o NOC-9, sobre o comportamento de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

Métodos e Resultados: Camundongos Suíços machos (25-35g, N = 36) foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia bilateralmente no BNST. Cinco dias após, os animais receberam microinjeção de veículo ou NOC-9 nas doses de (37,5 nmol ou 75nmol) e, em seguida foram colocados em uma cuba de vidro, onde foi analisado o tempo, em segundos, de exibição do comportamento de congelamento. Após cinco minutos, os animais foram expostos ao LCE com o propósito de registrar os níveis de ansiedade (porcentagem de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos) e a locomoção (frequência de entrada nos braços fechados). Todos os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan, exceto em alguns casos, onde foi necessário realizar análise não paramétrica de Kruskal-Wallis.

A injeção de NOC-9 (ambas as doses) induziu o comportamento de congelamento no período (5 minutos) que antecede a exposição ao labirinto em cruz elevado ($p < 0.05$). Além disso, a injeção de NOC-9 não alterou a porcentagem de entradas ($p > 0,05$), mas diminuiu, nas mesmas doses (37,5 e 75nmol), a porcentagem de tempo gasto ($p < 0,05$) nos braços abertos do LCE. Finalmente, com relação às medidas complementares ou etológicas analisadas no LCE, foram observadas algumas ações de caráter ansiogênico do NOC-9, corroborando os resultados obtidos na análise espaço-temporal. Neste sentido,

o comportamento de mergulhar com a cabeça nos braços abertos do LCE (área desprotegida, HD desprotegido), foi diminuído no grupo que recebeu NOC-9 75 nmol. Nesta dose, o NOC-9 reduziu o comportamento de esticar-se (SAP) nos braços abertos do LCE (área desprotegida, SAP desprotegido). A injeção de NOC-9 na dose de 37,5 nmol reduziu ($p < 0.05$) e a dose de 75 nmol demonstrou tendência ($p = 0,07$) a reduzir a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do aparato. Por fim, a dose de 37,5 nmol de NOC-9 reduziu o número de levantamentos, efeito não observado com a dose de 75nmol.

Conclusões: a injeção de NOC-9 no BNST de camundongos, em ambas as doses utilizadas neste estudo, foi eficaz em induzir efeito ansiogênico, tal como observado pela diminuição da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Embora não tenha sido evidenciado efeito no outro índice de ansiedade (porcentagem de entradas nos braços abertos), a hipótese do papel ansiogênico do óxido nítrico no BNST parece estar fortalecida pela indução do comportamento de congelamento, observado nos cinco minutos posteriores à injeção do NOC-9. Apoiando o perfil ansiogênico do NO nesta estrutura límbica estão os efeitos do NOC-9 nas medidas complementares ou etológicas registradas no LCE. Assim, sugere-se que o BNST é um sítio de importância na mediação das reações de defesa moduladas pela ativação da via do óxido nítrico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: labirinto em cruz elevado.....	16
Figura 2(A): fotomicrografia do corte coronal do encéfalo.....	25
Figura 2(B): representação dos sítios de microinjeção positivos.....	26
Figura 3: tempo (em segundos) de congelamento na cuba de vidro.....	27
Figura 4: porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e frequência de entradas no braço fechado.....	28
Figura 5: frequência de execução do comportamento de mergulho (HD).....	30
Figura 6: frequência de execução do comportamento de esticamento (SAP).....	31
Figura 7: frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e de levantamentos.....	32

1 INTRODUÇÃO

Os confrontos dos animais com situações aversivas que induzem medo e ansiedade resultam na expressão de uma série de respostas comportamentais defensivas (luta, fuga, imobilidade, vocalização, etc.), bem como ativação neurovegetativa (taquicardia, hipertensão, defecação, etc.) e neuroendócrina (Graeff, 1990).

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 confrontos com co-específicos, podem resultar na exibição de reações de defesa, coordenadas pela ativação de determinadas áreas encefálicas que conjuntamente compõem o sistema encefálico de defesa, com objetivo de manter e proteger a vida (Graeff, 1990). Outros estímulos ambientais, tais como altura excessiva, iluminação intensa,

tempestades, incêndio, exposição a lugares novos, também são caracterizados como aversivos.

Frente a estes estímulos aversivos, os animais geralmente utilizam uma de quatro estratégias defensivas comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão (Adams, 1979; Marks. 1987; Blanchard & Blanchard, 1988). A decisão de escolha de uma particular estratégia leva em conta vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou ambiente.

Embora tais alterações sejam importantes 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 na ausência de situações ameaçadoras podem indicar a ocorrência de transtornos de ansiedade (BLANCHARD et al., 2001; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Embora haja numerosos estudos relacionando comportamentos defensivos com o medo e a ansiedade, a compreensão da função e da importância das vias neurais e neurotransmissores envolvidos na modulação dessas respostas, ainda é carente de investigação.

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 antinocicepção, participando diretamente da modulação de 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).

Com relação à amígdala, sabe-se que esta estrutura prosencefálica desempenha função crítica em vários componentes das respostas defensivas, como congelamento, sobressalto, antinocicepção e alterações 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 medo envolveria estruturas mais caudais, como por exemplo, o hipotálamo medial e a matéria cinzenta periaquedutal, enquanto 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.

O chamado complexo amidalóide ou amígdala estendida compreende estruturas límbicas do prosencéfalo basal, incluindo-se o núcleo intersticial da estria terminal (do inglês: bed nucleus of stria terminalis, BNST), uma área encefálica promissora no estudo da ansiedade, haja vista o envolvimento de neurotransmissores nesta estrutura na mediação de respostas comportamentais e autonômicas frente ao estresse, medo e ansiedade (ALHEID 2003; DAVIS, 1998; HEIMER 2003; SAHUQUE et al., 2006; SCHULKIN et al., 2005). Neste sentido, foi demonstrado que a estimulação elétrica do BNST em ratos promoveu alterações comportamentais e endócrinas similares àsquelas evocadas pelo estresse (DUNN, 1987; CASADA; DAFNY, 1991), enquanto a inativação farmacológica deste núcleo diminui a expressão

de respostas condicionadas ou incondicionadas a estímulos aversivos, denotando a função desta área também nas respostas inatas (SAHUQUE et al., 2006).

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. Além disso, a demanda por novos modelos também tem sido motivada por diversos entraves éticos, metodológicos e econômicos decorrentes do estudo em humanos de determinados processos psicofisiológicos e psicopatológicos. Dessa forma, torna-se clara a contribuição dos testes em animais para a compreensão da neurobiologia de diversos distúrbios mentais/emocionais (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Várias investigações utilizam a exposição de animais a uma situação potencialmente ameaçadora para então observar as reações de defesa desencadeadas pelo estado emocional durante a exposição ao aparato. No presente estudo foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade originalmente descrito por PELLOW *et al.* (1985), usando ratos como sujeitos experimentais, sendo posteriormente validado para camundongos (STEPHENS et al., 1986; LISTER, 1987). Este modelo, frequentemente usado para avaliar a ansiedade bem como o potencial ansiolítico ou ansiogênico de fármacos, baseia-se na aversão natural de roedores a espaços abertos e abrange o estudo dos padrões exploratórios em um aparato simples, compreendendo quatro braços, dos quais dois têm paredes (braços fechados) e dois não (braços abertos). Os níveis de ansiedade

são avaliados pela esquivas aos braços abertos (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), ao passo que a atividade geral é avaliada pela frequência absoluta de entrada nos braços fechados (PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994). O LCE também tem sido amplamente utilizado na busca da compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à ansiedade e medo (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987; RODGERS; COLE, 1994).

Por avaliar a aversão de roedores diante de uma situação com características que lembram àquelas encontradas na natureza, o LCE tem sido considerado um modelo de ansiedade etologicamente fundamentado (CAROBEZ; BERTOGLIO, 2005). Este modelo elicia no animal reações de conflito, associadas, por um lado, aos instintos exploratórios (reconhecimento do ambiente) e, por outro, à aversão desencadeada pelos locais abertos. Nessa condição o animal tem seu sistema de defesa ativado.

Em animais tratados com fármacos ansiolíticos utilizados em seres humanos, observa-se um aumento significativo no número de entradas e na permanência nos braços abertos, sem, contudo ocorrerem alterações na frequência de entradas nos braços fechados, um importante parâmetro para indicar variação da atividade locomotora do animal. Assim, este resultado é interpretado como um efeito ansiolítico seletivo, ou seja, desacompanhado de efeito sedativo. Já em animais tratados com drogas ansiogênicas em seres humanos, observa-se uma diminuição na exploração relativa dos braços abertos, também sem alteração do número de entradas nos braços fechados, demonstrando intensificação da aversão aos braços abertos. Entretanto, em

alguns casos pode haver diminuição também na frequência de entradas nos braços fechados, possivelmente porque a ansiedade resulta em inibição comportamental generalizada (GUIMARÃES, 2005).



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

Existe uma variedade de neurotransmissores que estão envolvidos na mediação da ansiedade e seus transtornos, agindo em diferentes estruturas encefálicas como algumas apontadas anteriormente. Dentre eles podemos citar a serotonina, a noradrenalina, o ácido gama amino butírico (GABA) e o glutamato, bem como os chamados neurotransmissores atípicos, como os endocanabinóides e o óxido nítrico. 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 como o oxigênio e radicais livres liberados em diversas situações (GUIX et al., 2005).

Bastante presente no organismo, o NO é considerado um neurotransmissor atípico por suas características físico-químicas particulares (GALLY et al., 1990), como sua alta difusibilidade, o que permite que este gás atravesse membranas biológicas facilmente, e promova sua ação em sítios além de onde foi produzido/liberado. Além disso, ele não é armazenado em vesículas, sendo produzido quando necessário e rapidamente degradado, devido a sua meia-vida curta de poucos segundos (SCHEIGHOFER; FERRIOL, 2000).

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 nítróxido (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 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).

Além das evidências 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) o qual 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, 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.

Estudos anteriores demonstraram que o BNST de ratos contém neurônios nitrérgicos, os quais são ativados após exposição ao gato, como estímulo aversivo (GUIMARÃES et al., 2005). Sendo o BNST uma região povoada com neurônios nitrérgicos, tornou-se relevante investigar a participação do NO nas reações de defesa, aqui em camundongos (via administração intra-BNST do composto doador de NO, NOC-9), através do estudo das respostas comportamentais induzidas pela facilitação nitrérgica nesta estrutura.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da facilitação nitrérgica (através de um doador de NO, o NOC-9), no núcleo intersticial da estria terminal (BNST) 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 BNST

Camundongos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para receber implante intracraniano bilateral 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 e as coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula guia objetivando atingir o BNST do animal foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). As coordenadas foram: 0,5 mm anterior e 3,0 mm lateral (bilateral) ao bregma (encontro das suturas) e 3,2 mm ventral à superfície do crânio, com a cânula inclinada em um ângulo de 32° . A ponta da cânula guia foi posicionada + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções no BNST foi feita de cinco a sete dias após a cirurgia e ocorreram através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia em cada hemisfério, 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 0,2 μ L em um período de 1 minuto. 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.

3.3 Fármaco

Foi utilizado NOC-9 (6-(Hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina), um doador de óxido nítrico (Sigma-Aldrich Co, EUA), nas doses de 37,5 e 75 nmol (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009), solubilizado no veículo TRIS.HCl em pH 10.

3.4 Avaliação dos comportamentos de defesa

Imediatamente após a injeção intra-BNST das diferentes doses do NOC-9 ou veículo (grupo controle), os camundongos foram colocados em uma arena de vidro onde foi monitorado o comportamento de congelamento durante cinco minutos. Em seguida, os animais foram expostos ao LCE durante cinco minutos para avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre os índices de ansiedade espaço-temporais e etológicos. O Tempo (em segundos) de congelamento consistiu no período no qual o animal permanecia imóvel na cuba, numa

postura tensa (com algumas características sinalizadoras como pêlos eriçados e dorso arqueado), com ausência total de movimentos, exceto o respiratório.

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 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: porcentagem de entradas nos braços abertos - número de vezes em que o animal cruzava com as quatro patas linha divisória de cada braço $[(\text{entrada nos braços abertos} / \text{total de entradas}) \times 100]$, 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 – medida de locomoção (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 no LCE:

- a. Mergulho com a cabeça (HD: do inglês “head dipping”, movimento de inclinar a cabeça além dos limites do aparato em direção para o solo da

- sala experimental) 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 (exploração dos 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 dos braços fechados ou no centro 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 análise de homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e a seguir, submetidos à ANOVA monofatorial, seguida pelo teste post-hoc de Duncan. Em todos os casos um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Nos casos em que a amostra não se mostrava homogênea (teste de Levene positivo, $p < 0,05$), os resultados foram transformados em raiz quadrada, cúbica ou LOG para obtenção da homogeneidade, e então submetidos a ANOVA monofatorial, seguida pelo teste post-hoc de Duncan. Em alguns casos onde mesmo após transformações o teste de Levene indicava heterogeneidade, os resultados foram submetidos a teste não paramétrico (Kruskal-Wallis).

4 RESULTADOS

4.1 Sítio de injeção

A Figura 2 exemplifica um corte histológico demonstrando o núcleo intersticial da estria terminal (BNST), alvo dos experimentos realizados neste trabalho. Abaixo a representação esquemática e uma fotomicrografia de um ponto de infusão para melhor visualização e localização da estrutura 2A. A

seção corresponde a +0.5 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, ressaltando que a figura mostra a estrutura em um hemisfério encefálico, por motivos esquemáticos, porém a injeção foi realizada em ambos (bilateralmente) como demonstrado na figura 2A. A injeção em todos os diferentes subnúcleos foram admitidas como positivo para BNST.

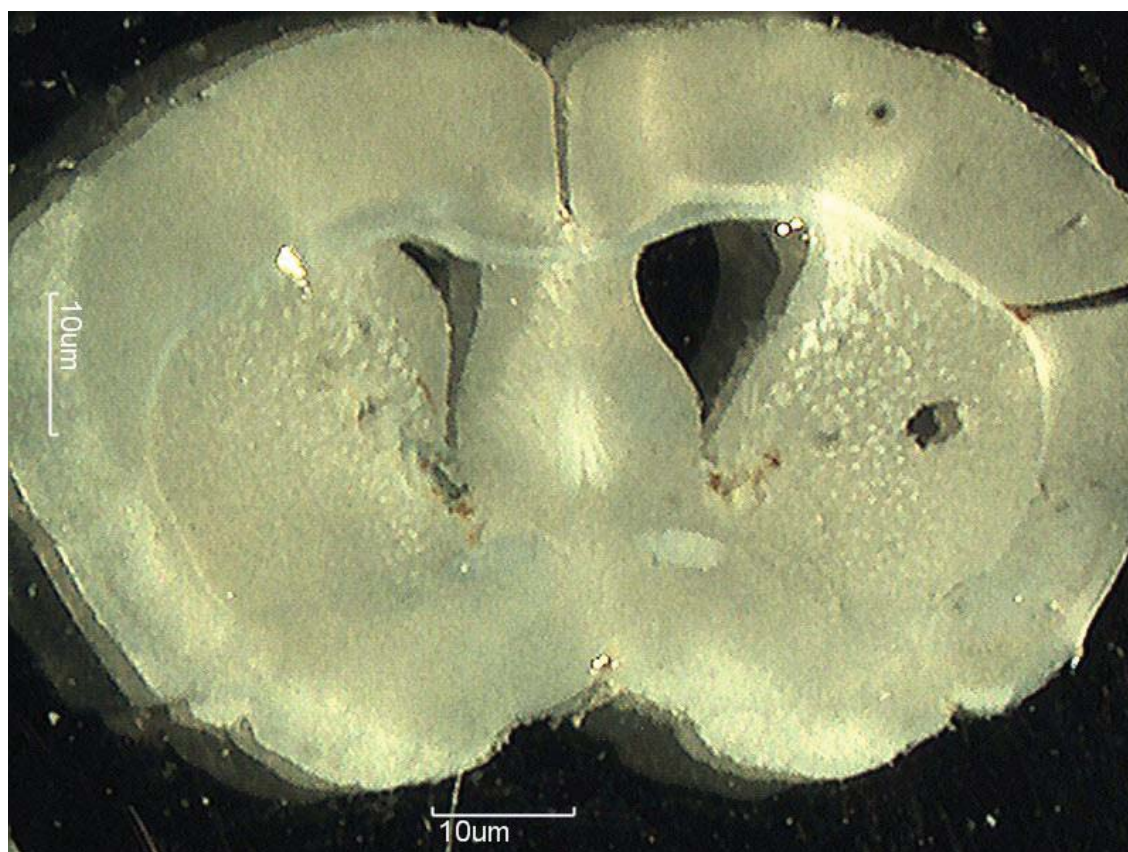


Figura 2(A) - Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de sujeito experimental representativo, demonstrando a localização dos pontos de injeções bilaterais no núcleo intersticial da estria terminal.

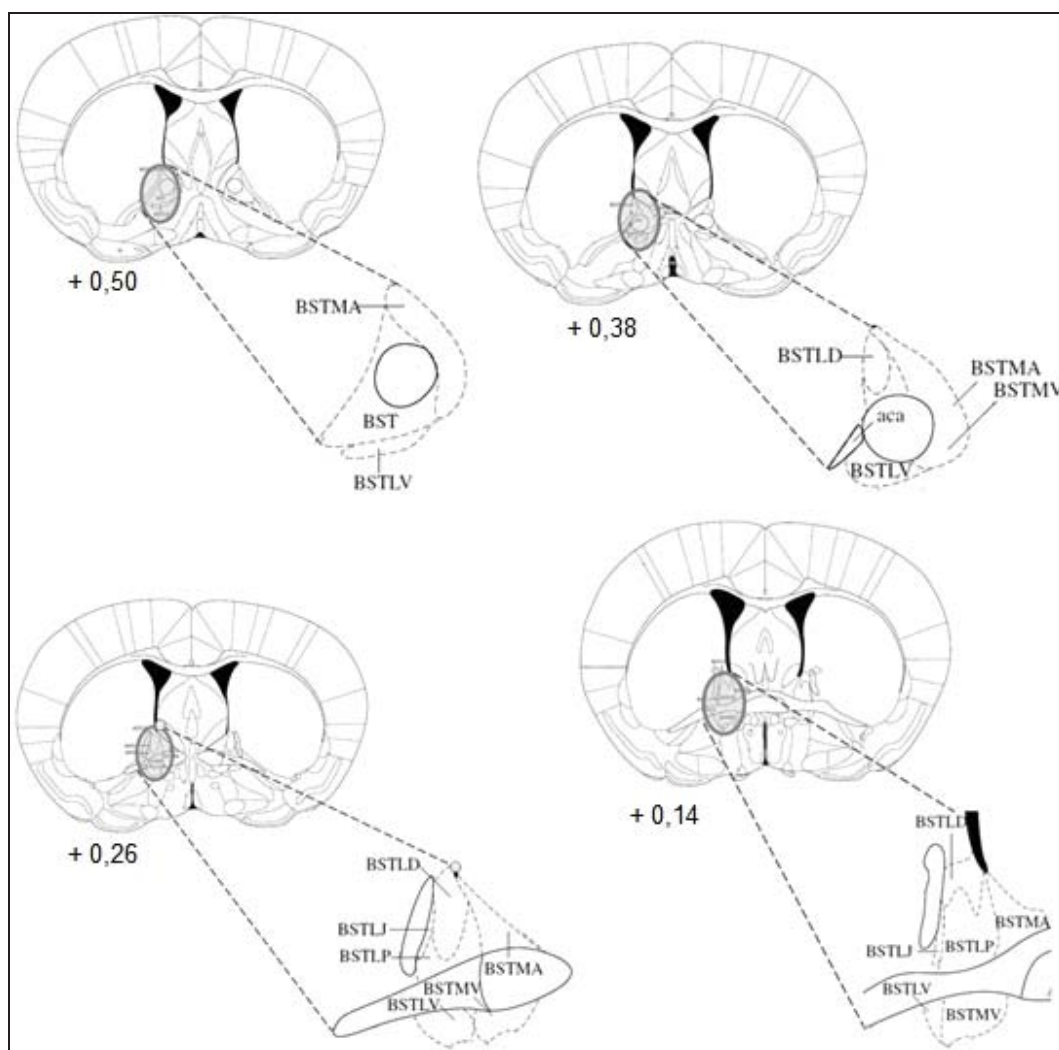


Figura 2(B) - Representação dos sítios de microinjeção considerados positivos (Legenda – BST: BNST; LV: lateral-ventral; MA: medial-anterior; MV: medial-ventral; LD: lateral-dorsal; LJ: lateral-justacapsular; LP: lateral-posterior).

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

4.2.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de congelamento

A Figura 3 mostra que a injeção de NOC-9 no BNST foi eficaz em induzir o comportamento de congelamento expresso em segundos, conforme revelado no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis [$H(2,37) = 13,8$; $p = 0,01$]. Comparações posteriores pontuaram que ambas as doses foram significativamente diferentes do controle (veículo).

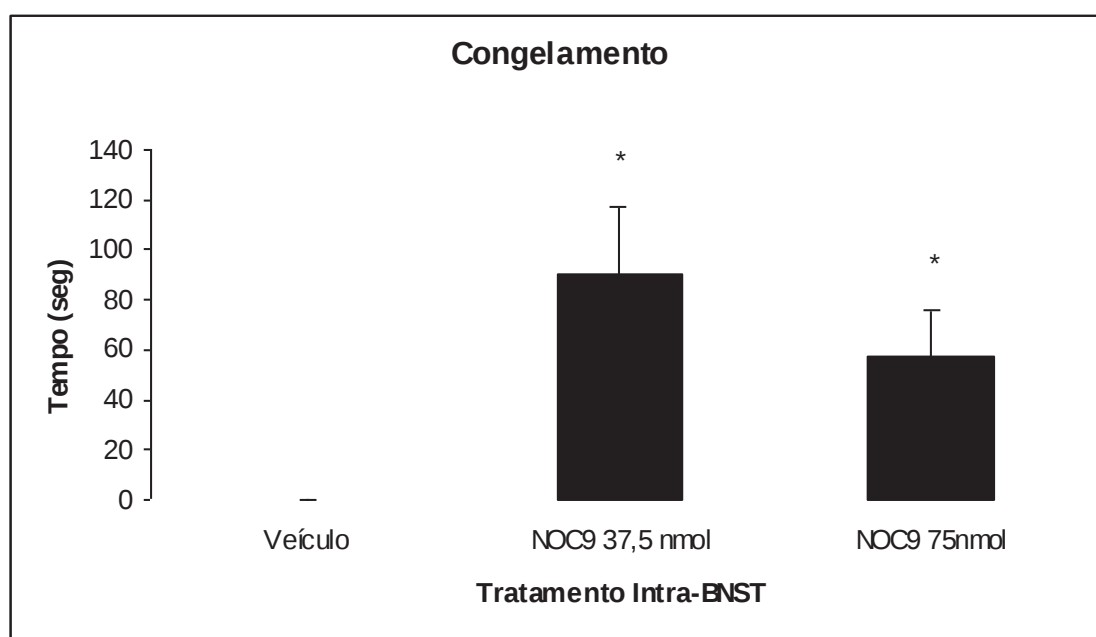


Figura 3 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0,2 μ L) no BNST de camundongos sobre tempo em segundos de exibição do comportamento de congelamento. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 11-13 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.2.2 Avaliação do efeito da microinjeção de diferentes doses de NOC-9 no BNST sobre os índices de ansiedade no LCE

4.2.2.1 Avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre os índices de ansiedade

A Figura 4 mostra os índices de ansiedade (porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem injeção intra-BNST de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0.2 μ L). A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que a injeção de NOC-9, em ambas as doses, não alterou a porcentagem de entradas ($F_{2,29} = 2,0$; $p = 0,15$). Contudo, as duas doses foram eficazes em diminuir a porcentagem de tempo gasto ($F_{2,29} = 4,3$; $p < 0,05$) nos braços abertos do LCE. ANOVA também não revelou diferenças significativas para a frequência de entradas nos braços fechados do aparato ($F_{2,29} = 0,6$; $p = 0,56$).

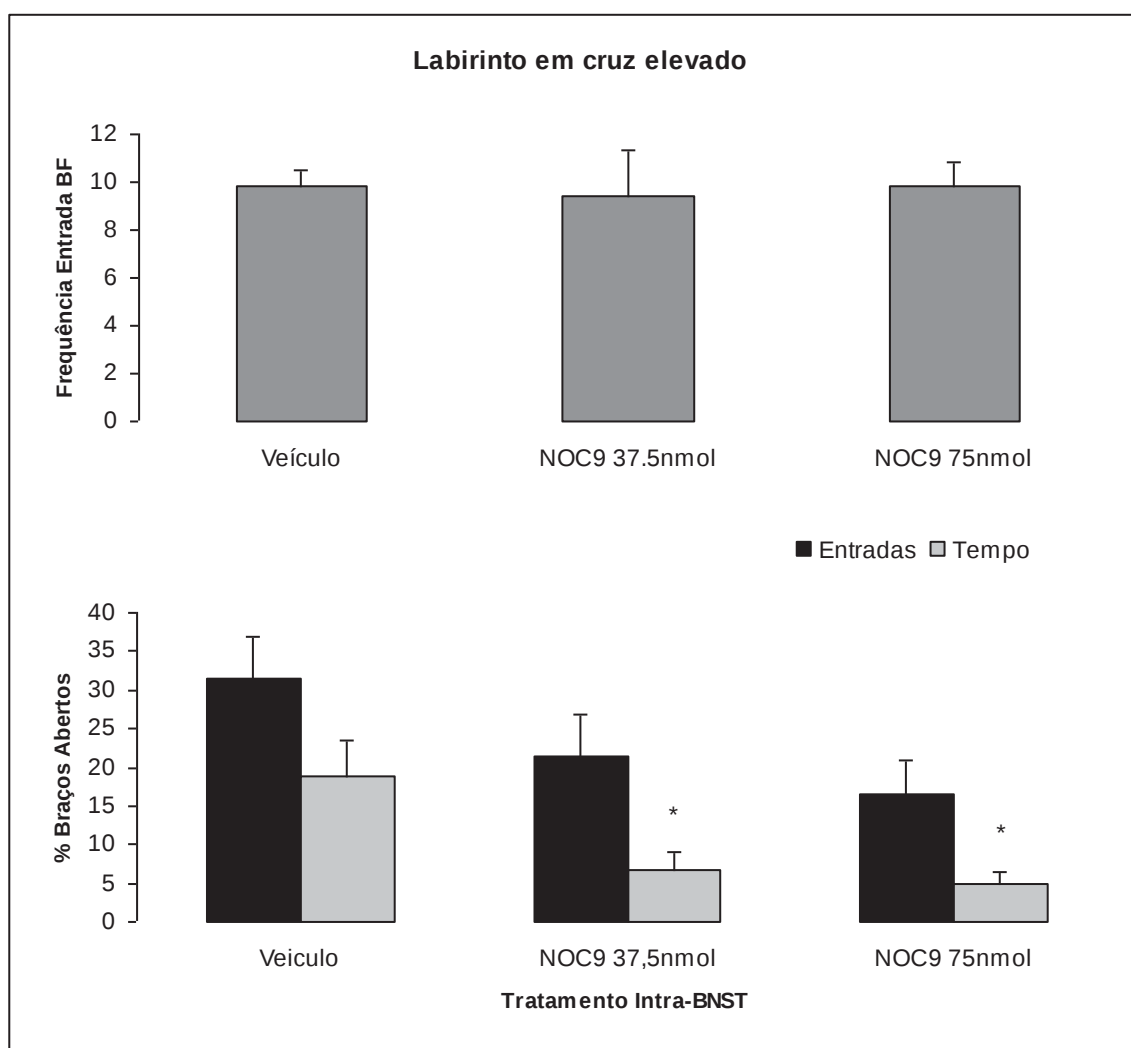


Figura 4 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0,2 µL) no BNST de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCE (superior). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-13 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

As Figuras 5, 6 e 7 mostram os efeitos da injeção de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0.2µL) sobre as medidas etológicas analisadas: HD desprotegido, HD protegido, SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e frequência de levantamentos.

ANOVA monofatorial indicou tendência a efeito da injeção de NOC-9 no BNST para o comportamento de mergulhar com a cabeça nos braços abertos do LCE (área desprotegida, HD desprotegido; $F_{2,29} = 2,7$; $p = 0,07$; Figura 5). Análises post hoc (teste de Duncan) indicaram que a dose de 75 nmol diminuiu a exibição deste comportamento. Com relação ao HD nas áreas protegidas (HD protegido), não houve diferenças significativas entre os grupos e o controle ($F_{2,29} = 2,9$; $p = 0,08$; Figura 5).

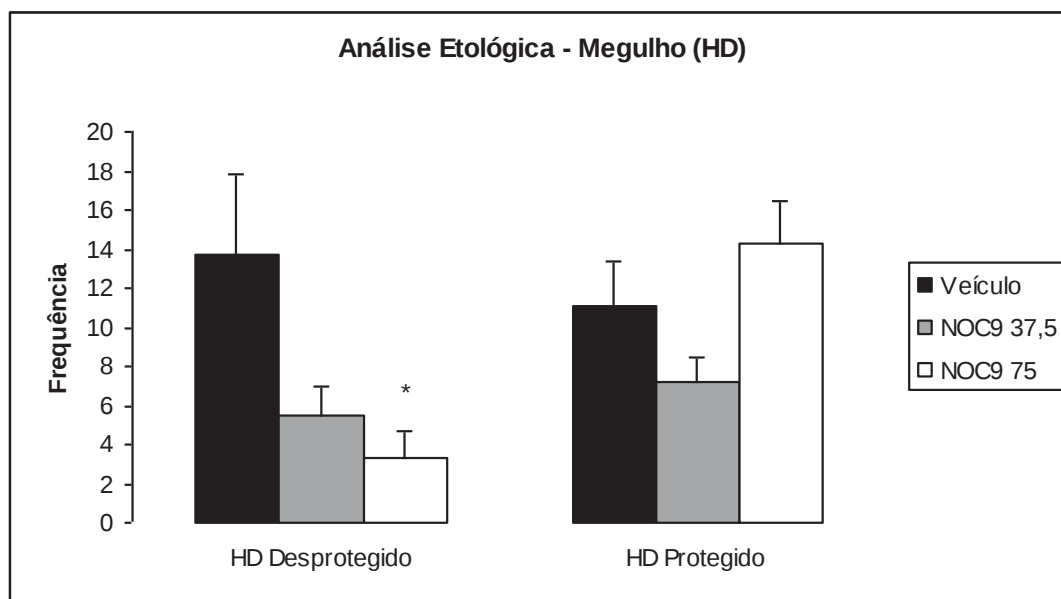


Figura 5 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0,2 μ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-13 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

ANOVA monofatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de NOC-9, somente na dose de 75 nmol, reduziu o comportamento de esticar-se (SAP) nos braços abertos do LCE (área desprotegida, SAP desprotegido; $p < 0,05$; figura 6) e não alterou o mesmo comportamento nas áreas protegidas (SAP protegido; $F_{2,29} = 0.4$; $p = 0,65$; figura 6).

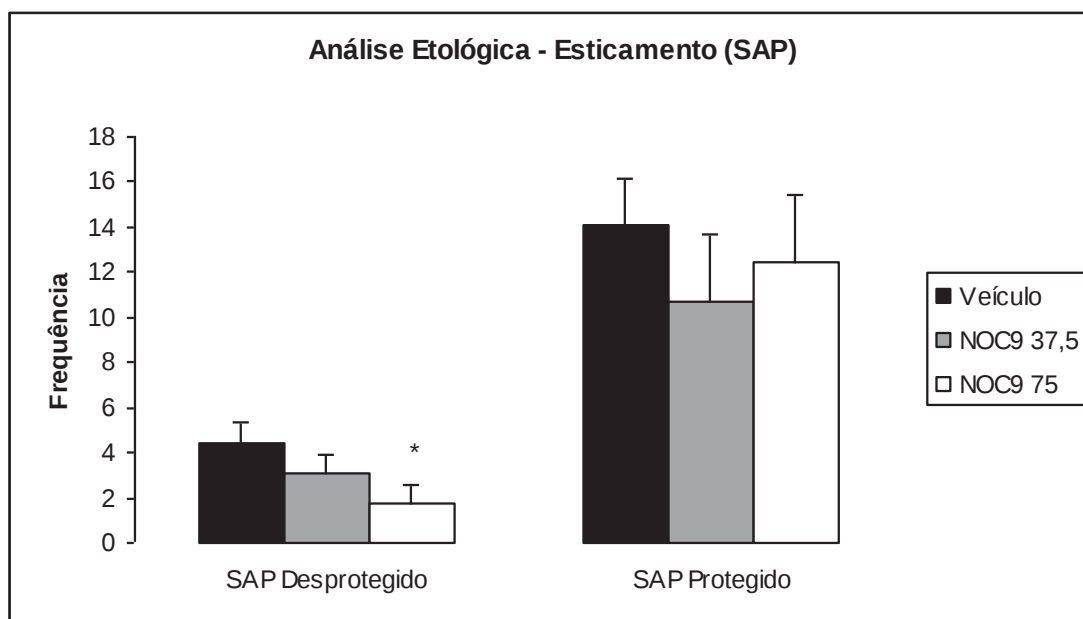


Figura 6 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0,2 μ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de esticar-se (SAP). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-13 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

A Figura 7 mostra os comportamentos de frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e de levantamentos. ANOVA monofatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de NOC-9, na dose de 37,5 nmol, reduziu, e a dose de 75 nmol demonstrou tendência ($p = 0,07$) a reduzir a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do aparato ($F_{2,29} = 3,1$; $p = 0,066$ – por estar bastante próximo da significância procedeu-se a análise post hoc). Com relação aos levantamentos ANOVA demonstrou diferenças significativas ($F_{2,29} = 3,8$; $p < 0,05$), e análises post hoc (teste de Duncan) revelaram que a dose de 37,5 nmol provocou redução deste comportamento exploratório.

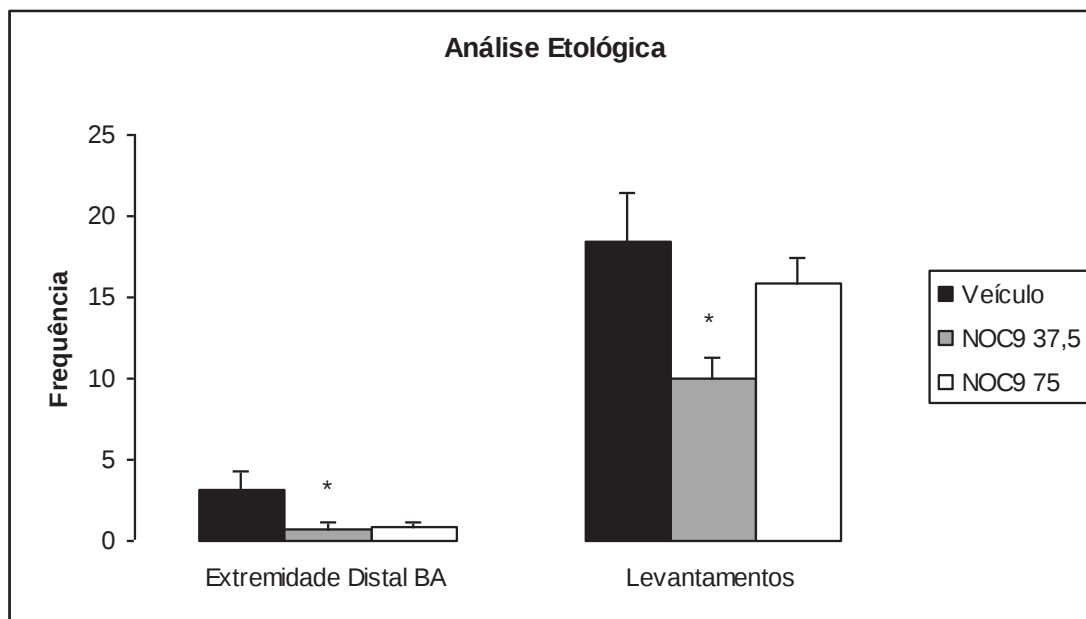


Figura 7 - Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 37,5 ou 75 nmol/0,2 μ L) no BNST de camundongos sobre a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do LCE e de levantamentos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9-13 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, a microinjeção intra-BNST de NOC-9, nas doses 37,5 e 75 nmol, foi eficaz em produzir efeitos ansiogênicos evidenciados pela exibição do comportamento de congelamento, diminuição do tempo de exploração dos braços abertos do LCE e pela alteração nos comportamentos de avaliação de risco, tais como o comportamento de esticar-se, mergulho com a cabeça e exploração da extremidade 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, em preparação). Além disso, resultados recentes de nosso laboratório demonstraram que a microinjeção de NOC-9 no córtex pré-frontal medial (CPFm), uma estrutura prosencefálica também envolvida na mediação da ansiedade, não provocou respostas motoras explosivas ou congelamento, no entanto, aumentou a esquiva dos braços abertos no LCE, sugerindo um efeito ansiogênico (VILAR, L.S. In: XXVI REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2011). Tomados em conjunto, estes resultados demonstram que a excitação provocada pela liberação de NO no BNST, através da injeção local de seu doador, produz aumento das reações comportamentais defensivas, cuja magnitude parece depender do sítio encefálico ativado.

De acordo com os estudos de McNaughton e Corr (2004), os quais propõem uma hierarquia encefálica no controle dos comportamentos defensivos, tem-se que 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 comportamentais mais explosivas como reações de fuga e luta, tal como recentemente observado por Miguel, Gomes e Nunes-de-Souza (em preparação) com a injeção do mesmo composto aqui estudado, o NOC-9. Por outro lado, estruturas prosencefálicas mais rostrais, como o córtex pré-frontal medial e o BNST, 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 mesmo aqueles associados aos índices de ansiedade eliciados durante a exposição ao LCE. A ativação dessas estruturas, sobretudo o CPFm, parece não levar a expressão de reações explosivas e congelamento, sugerindo um papel hierarquicamente superior do CPFm e do BNST na modulação da expressão de comportamentos defensivos. Com base na categorização hierárquica das estruturas encefálicas envolvidas no sistema de defesa, proposto por McNaughton e Corr (2004), sugere-se que o BNST figuraria com um papel hierárquico intermediário, uma vez que não foram observadas respostas explosivas como na MCP. Por outro lado, conforme apresentado no presente estudo, a injeção intra-BNST de NOC-9 provocou a exibição do comportamento de congelamento, além dos efeitos sobre as medidas espaço-temporais e etológicas, ou de avaliação de risco no LCE.

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). Embora em outra estrutura, estes dados fortalecem a hipótese da participação do NO nas respostas de defesa.

Com relação ao BNST, Sahuque et al. (2006) demonstraram que a inativação farmacológica deste núcleo diminui a expressão de respostas condicionadas ou incondicionadas a estímulos aversivos, denotando a função

desta área também nas respostas inatas, fato corroborado nos resultados do presente estudo, uma vez que o LCE traduz uma situação mista, em que estímulos aversivos inatos e condicionados se mostram presentes. Além disso, Dunn (1987) e Casada e Dafny (1991) demonstraram que a estimulação elétrica do BNST em ratos promoveu alterações comportamentais e endócrinas similares às aquelas evocadas pelo estresse. Os resultados do presente estudo também parecem corroborar essa evidência, já que o NO, por possuir propriedades excitatórias (PRAST; PHILIPPU, 2001), provocaria também a estimulação dos neurônios no BNST. Entretanto, estudos envolvendo a transmissão nitrérgica e o BNST ainda são escassos. Neste sentido, Guimarães e colaboradores (2005) demonstraram ativação de neurônios nitrérgicos no BNST de ratos após exposição ao gato (estímulo aversivo). Por outro lado, Calixto e colaboradores (2008) demonstraram que a esquia no labirinto em T elevado era prevenida pela injeção de L-NAME em diferentes núcleos relacionados à ansiedade, como MCP e amígdala, porém não no BNST, denotando que embora poucos, os trabalhos envolvendo o BNST e o NO nem sempre são consistentes e carecem de novos estudos.

Em linhas gerais, as medidas complementares ou etológicas avaliadas no presente estudo corroboram as análises espaço-temporais no LCE, indicando efeito ansiogênico do NOC-9. A diminuição da frequência de HD e SAP desprotegidos bem como da frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do LCE confirmam o efeito ansiogênico do doador de NO, denotando um aumento da aversão gerada pelas áreas desprotegidas, os

braços abertos do LCE, uma vez que os animais tratados com NOC-9 visitaram menos as extremidades e exibiram menos avaliação de risco nestas áreas.

Cabe ressaltar que estes efeitos também são reforçados pela observação do comportamento de congelamento durante os cinco minutos após a injeção do NOC-9, isto é, antes da exposição dos animais no LCE. Um aspecto importante do perfil da resposta de congelamento provocado pelo NOC-9 é a sua elevada intensidade observada logo após a injeção do doador de NO, seguida pelo progressivo decréscimo nos primeiros minutos, sendo que ao momento da exposição ao LCE mostrou-se ausente. A evidência sugestiva de que a injeção intra-BNST de NOC-9 não afetou a locomoção durante a exposição ao LCE pode ser observada pela ausência de efeitos do doador de NO na frequência de entradas nos braços fechados do aparelho (Figura 4).

Os resultados obtidos com o NOC-9 neste estudo são importantes na tentativa de melhor entender os mecanismos que medeiam a neurobiologia dos transtornos de ansiedade. A injeção de doadores de NO em sítios encefálicos específicos consiste numa ferramenta útil para pesquisar outros mensageiros nas cascatas intracelulares ativadas em situações aversivas. Alguns exemplos são o envolvimento do GMP cíclico e da interação do NO com neurotransmissores excitatórios como glutamato e CRF, ou mesmo inibidores, como o GABA, uma vez que o NO, em determinadas situações, produz efeitos excitatórios inespecíficos, fato que confere seu papel dual na neurobiologia de estados emocionais (GUIMARÃES et al., 2005; PRAST; PHILIPPU, 2001).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. **Behav. Brain Sci.**, v.2, p. 201-241, 1979.

ALHEID G.F. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 985:185–205, 2003.

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.

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. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.**, v.39, p.43-68, 1988.

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.

CALIXTO, A.V., et al. Nitric oxide involvement and neural substrates of conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. **Behav. Brain Res.**, v.189, p.341-349, 2008.

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.

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.

CASADA J.H.; DAFNY N. Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. *Brain Res Bull* 27:207–212, 1991.

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.

DAVIS M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry* 44:1239–1247, 1998.

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 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.

DUNN J.D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res** 407:321–327, 1987.

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.

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.

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.

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, F.S., 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.

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.

HEIMER L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. *Am J Psychiatry* 160:1726–1739, 2003.

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.

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.

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.

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.

MARKS, I. M. **Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders**. New York: Oxford University Press, 1987.

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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

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.

SCHEIGHOFER, N., FERRIOL, G., Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: a simulation study. **P.N.A.S.**, v.97, p.10661–10665, 2000.

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.

SCHULKIN J; MORGAN M.A.; ROSEN J.B. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends Neurosci* 28:629–635, 2005.

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

VILAR, L.S. Facilitation of nitroergic neurotransmission within the medial prefrontal cortex produces anxiogenic-like effects in mice exposed to the elevated plus maze. In: XXVI REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2011, Rio de Janeiro. **Anais da FeSBE**. Rio de Janeiro: agosto, 2011.

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

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.