

ISABEL CRISTINA DA CUNHA

**APRENDIZAGEM EMOCIONAL NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO NO PARADIGMA DA LATÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

**Florianópolis - SC
2003**

ISABEL CRISTINA DA CUNHA

**APRENDIZAGEM EMOCIONAL NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO NO PARADIGMA DA LATÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

*Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em
Neurociências, Universidade Federal de
Santa Catarina.*

Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

**Florianópolis - SC
2003**

**“APRENDIZAGEM EMOCIONAL NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO
ATRAVÉS DA LATÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO”.**

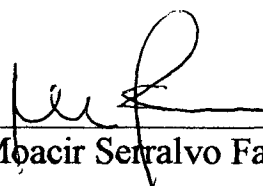
ISABEL CRISTINA DA CUNHA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de


MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

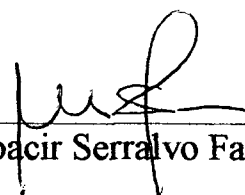
Orientador

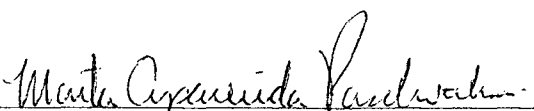

Moacir Serralvo Faria

Coordenadora do Curso


Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora


Moacir Serralvo Faria(Presidente)


Marta Aparecida Paschoalini


José Marino Neto

“Havia num bosque isolado uma bonita violeta que vivia satisfeita com suas companheiras. Certa manhã, ergueu a cabeça, e viu uma rosa que se balançava acima dela, adiante e orgulhosa”.

*Gemeu a violeta, dizendo: “Pouca sorte tenho eu entre as flores!
Humilde é meu destino!
Vivo colada a terra e não posso erguer a face para o sol
como fazem as rosas...”*

*A Natureza ouviu, e disse:
“Que te aconteceu, filhinha?
As vãs ambições apoderaram-se de ti?”*

*“Suplico-te, ó Mãe Poderosa, disse a violeta,
transforma-me numa rosa,
por um dia só que seja.”*

*“Não sabes o que estás pedindo, respondeu a Natureza.
Ignoras o que se esconde de infortúnios atrás das aparentes grandezas.”*

*“Transforma-me em rosa, insistiu a violeta,
e aceitarei todas as conseqüências de minhas aspirações e desejos.”*

*A Natureza estendeu sua mão mágica, e a violeta tornou-se uma rosa suntuosa.
Na tarde daquele mesmo dia, o céu escureceu, e o vento e chuva devastaram o bosque.
As árvores e as roseiras foram abatidas.
Só as humildes violetas escaparam ao massacre.
E uma delas olhando a sua volta gritou às companheiras:
“Olhem e vejam o que a tempestade fez das grandes plantas
que se elevam com orgulho e impertinência!”*

Disse uma outra: “Vivemos coladas à terra, mas escapamos à fúria dos furacões.”

*Uma terceira disse: “Somos pequenas e humildes;
mas as tempestades nada podem contra nós.”*

*A rainha das violetas viu também a rosa que tinha sido violeta,
estendida por terra como morta. E disse: "Vejam e meditem, minhas filhas,
sobre o destino da violeta que as ambições embriagaram.
Que sua infelicidade lhes sirva de exemplo."*

*Ouvindo essas palavras a rosa agonizante agitou-se,
e disse, com voz entrecortada:*

*"Escutai, antes, vós, ignorantes, medíocres, covardes.
Ontem, eu era como vós, humilde e satisfeita.
Mas a satisfação que me protegia, também me limitava.
Podia continuar a viver como vós, colada à terra,
até que o inverno me envolvesse na sua neve
e me levasse ao silêncio eterno, sem que conhecesse dos segredos e glórias desta vida
mais do que as inúmeras gerações de violetas, desde que existem violetas."*

*Mas escutei no silêncio da noite, e ouvi o mundo superior dizer a este mundo:
O alvo da vida é alcançar o que há além da vida.
Pedi, então, à Natureza – que nada é senão a materialização de nossos sonhos
invisíveis- que me transformasse em rosa. E a Natureza atendeu ao meu desejo.*

*Vivi uma hora como rosa. Vivi uma hora como rainha.
Vi o mundo com os olhos das rosas. Ouvi a melodia do éter com os ouvidos das rosas.
Acariciei a luz com as pétalas das rosas.
Pode alguma de vós gabar-se desta honra?*

*Morro agora,
"levando na alma o que nenhuma violeta jamais experimentará.
Morro, sabendo o que há por trás dos horizontes estreitos onde nasci.
É este o alvo da Vida."*

Khalil Gibran

A Deus, pelo Amor e pela Natureza.

Aos meus Pais por terem me dado a Vida.

À minha querida Família por ser
a fonte do meu equilíbrio
e da minha paz.
Por ter me ensinado
valores e amor, muito amor.

Ao meu Amor, pela paciência,
por todos os agrados diários e pelo
carinho que me fortalece.

A Clarice, Icléia, Luciano e Vera que acenderam a chama.
A Silvia, que transportou a chama e me apresentou ao Prof. Moacir.
Ao Moacir, meu orientador e amigo,
que mantém a chama acesa,
fortalece e amplia a fonte de luz,
que acredita na Iluminação. Você é Luz.

Agradecimentos:

Querido Orientador, quanto aprendizado obtive nessa etapa e quanto Você foi e é importante em todo o processo. Quero agradecer-lhe a paciência, a dedicação, as conversas, os conselhos, a força e o encorajamento intelectual. Seus ensinamentos não são em vão. Sua competência, profissionalismo e dedicação servem de exemplo para todos nós. Obrigada por acreditar em mim.

À Prof.^a Marta, agradeço em particular, por ter nos dado apoio e condições para vencer os obstáculos que nos foram impostos... Sobretudo pela ética e por nos mostrar que devemos lutar pelos nossos ideais.

Ao Prof. Marino, por ter transmitido conhecimento e amizade de uma forma toda especial.

A Prof.^a Cristina e Mariana pela participação em minha formação.

Ao Prof^o Mauro Vieira pela colaboração.

Ao Prof^o Washington pelo apoio incondicional ao laboratório.

A Prof.^a Vivian pelo acompanhamento desde a Graduação e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Departamento de Fisiologia por ter proporcionado a oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Prof. Heitor Moreno Jr. e sua equipe da UNICAMP, pela colaboração neste trabalho.

Fiz poucos amigos neste curso, mas, aos meus amigos, obrigada pela ajuda.

Marcelo, Você e eu, não podemos negar, temos histórias para contar. Que bom saber que ainda existem pessoas como Você.
Você é o amigo que guardo no peito.

Raquel, Você deu força nos experimentos, temperou as horas de estudo e participou dos momentos de ebulição. Não vou esquecer seus conselhos. Você é especial.

Amanda, desde o nosso primeiro contato, admiro muito Você e lhe quero muito bem.

Daniel e Lisiane, pelo apoio inicial, pela amizade e desprendimento.

Lenir, Você é determinada e dedicada. Obrigada pela ajuda.

A Renata e Silvana agradeço as boas conversas no corredor.

Simone e Luciane, com vocês aprendi que mesmo quando os valores são esquecidos ou deixados de lado em benefício próprio, há, ainda, pessoas com dignidade e integridade. E, isso não tem preço.

Ao Nivaldo, Dna Vilma, Sr Carlinhos e Sr Carlos pelos momentos de descontração, de amizade e de participação integral durante o mestrado. Obrigada pelas brincadeiras.

A Clarice, pelo apoio incondicional a todo o momento.

Aos meus sobrinhos por tudo o que têm me ensinado.

A Karla, César Augusto e Márcia, Mara e Gabriel pelo apoio incondicional mesmo durante meu afastamento para concluir o mestrado.

Ao Sr. César Cunha, meu pai, meu ídolo, meu guru, obrigada pelos ensinamentos, pelos CDs que me confortam a alma e pelo seu amor.

A Clara-linda, obrigada pelo exemplo de grandeza, de alegria, de profissional, de coragem de lutar pela vida, de lutar para que todos tenham direitos iguais. Você é parte integral da minha Vida. Amo Você, Mãe.

A Tânia, Teodoro e meus afilhados que moram no meu coração.

Aos profissionais da UDESC pelo apoio nesta etapa conclusiva e por permitirem que eu transmita meus conhecimentos.

A todos que de alguma forma participaram desta etapa.

A uma gatinha chamada Bichinha, que me deixou mais sensível e que tem me ensinado muito sobre comportamento.

Aos animais que foram usados nos experimentos e que foram a fonte mais natural possível de ensinamento.

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	viii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Aprendizagem e memória	01
1.2 Medo e comportamento defensivo	03
1.3 Plasticidade sináptica	05
1.4 Plasticidade sináptica e sistema emocional	10
1.5 Estudos de aprendizagem e memória em animais	14
1.6 Óxido nítrico	19
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Animais	25
3.2 Drogas	25
3.3 Labirinto em cruz elevado	25
3.4 Registro da latência de transferência	26

3.5 Experimentos	27
3.5.1 Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de L-NAME sobre a latência de transferência em ratos.	27
3.5.2 Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de L-arginina sobre a latência de transferência em ratos.	27
3.5.3 Experimento 3: Efeito da co-administração sistêmica de L-NAME e L-arginina sobre a latência de transferência em ratos.	27
3.5.4 Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de MK-801 sobre a latência de transferência em ratos.	28
3.5.5 Experimento 5: Efeito da co-administração sistêmica de doses sub-efetivas de L-NAME e MK-801 sobre a latência de transferência em ratos.	28
3.5.6 Experimento 6: Avaliação da pressão arterial em ratos tratados com diferentes doses de L-NAME.	29
3.6 Considerações éticas	30
3.7 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	31
4.1 Experimento 1	31
4.2 Experimento 2	32
4.3 Experimento 3	32
4.4 Experimento 4	32
4.5 Experimento 5	33
4.6 Experimento 6	33
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a participação do óxido nítrico (NO) na latência de transferência (LT) de ratos, no labirinto em cruz elevado, um parâmetro confiável de aprendizagem e de memória em roedores.

Ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos e receberam, por via *i.p.*, um dos seguintes tratamentos: N^o Nitro L-arginina-metil-éster (L-NAME; 5, 10, e 50mg.kg⁻¹; inibidor da síntese de NO), D-NAME (50mg.kg⁻¹; isômero inerte, usado como controle negativo), Escopolamina (SCO; 1mg.kg⁻¹, antagonista muscarínico) e MK-801 (0.075 e 0.15mg.kg⁻¹; antagonista NMDA; controles positivos) ou Salina 0,9% (grupo controle).

Outros grupos receberam uma co-administração de L-NAME (50mg.kg⁻¹) e L-ARG (100 e 200mg.kg⁻¹) ou L-NAME (5mg.kg⁻¹) e MK-801 (0,075mg.kg⁻¹). Trinta minutos após a administração das drogas, cada animal foi colocado no final do braço aberto e o tempo de latência de transferência para um braço fechado foi registrado (LT₁); no dia seguinte o mesmo protocolo foi repetido (LT₂); em um experimento independente, grupos de animais receberam por via *i.p.* Salina 0,9% ou L-NAME (nas mesmas doses) e tiveram a pressão arterial avaliada, 30 minutos após a administração da droga.

A análise estatística indicou que a administração sistêmica de SCO e MK-801 (0,15mg.kg⁻¹) prolongou a LT₂, significando, isso, prejuízo na aprendizagem. A administração de L-NAME (50mg.kg⁻¹) também prejudicou a aprendizagem, enquanto que D-NAME, não alterou a capacidade cognitiva dos animais; a co-administração de L-ARG (200mg.kg⁻¹) reverteu o déficit de

aprendizagem induzido por L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). O tratamento com L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) não alterou a LT_1 , o que indica que a droga prejudicou seletivamente a aquisição da aprendizagem, sem alterar a atividade motora do animal.

Todos os tratamentos com L-NAME induziram hipertensão arterial, entretanto, ainda que hipertensos, ratos tratados com L-NAME (5 e $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) exibiram aprendizagem. Os resultados mostram que o prejuízo de aprendizagem induzido pelo L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) não é decorrente do quadro hipertensivo, mas provavelmente à inibição da síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central. A co-administração de doses de L-NAME e MK-801, que individualmente não acarreta déficit cognitivo, prejudicou a aprendizagem. Assim, é possível que exista uma interação no sistema nervoso central entre a síntese de NO e a ação do glutamato nos receptores do tipo NMDA na aprendizagem da LT em ratos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the role of the nitric oxide (NO) upon the transfer latency (TL) paradigm in the elevated plus-maze, a reliable index for learning and memory in rodents. Male Wistar rats were assigned to receive, by *i.p.* route, either N^ω Nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME; 5, 10, and 50mg.kg⁻¹; an inhibitor of the NO synthesis), D-NAME (50mg.kg⁻¹; inert isomer, used as negative control), Scopolamine (SCO; 1mg.kg⁻¹, antagonist of muscarinic receptors) and MK-801 (0.075 and 0.15mg.kg⁻¹; antagonist NMDA; both positive controls) or Saline 0,9% (control group). Other groups received a co-administration of either L-NAME (50mg.kg⁻¹) and L-ARG (100 or 200mg.kg⁻¹) or L-NAME (5mg.kg⁻¹) and MK-801 (0.075mg.kg⁻¹). Thirty minutes after the drug administration, each animal was placed at the end of an open arm, and the time required by the animal to transfer to a closed arm was recorded (TL₁). The next day, the same procedure was repeated (TL₂). In an independent experiment, groups of animals received either Saline 0,9% or L-NAME (on the same doses) and had its arterial pressure evaluated thirty minutes after the drug administration.

The statistical analysis showed that SCO and MK-801 (0.15mg.kg⁻¹) systemic administration prolonged the TL₂, which indicates impaired learning. The L-NAME (50mg.kg⁻¹) administration also impaired the TL learning, while D-NAME failed to change the animal's cognitive ability; the co-administration of L-ARG (200mg.kg⁻¹) prevented the L-NAME (50mg.kg⁻¹) to induce learning deficit. The L-NAME (50mg.kg⁻¹) treatment did not change the TL₁, which indicates that the drug selectively impaired the learning acquisition without changing the motor activity of the animals.

Even though all treatments with L-NAME induced hypertension, rats treated with L-NAME (5 e 10mg.kg⁻¹) were able to learn the TL task, in spite of the increased arterial pressure; the data indicate that the impaired TL learning induced by L-NAME (50mg.kg⁻¹) is not due to the hypertension *per se*, but to a NO synthesis inhibition in the central nervous system. The co-administration of doses of L-NAME and MK-801, which individually did not induce cognitive deficit, impaired the LT learning. Thus, it is possible to establish a relationship between NO synthesis and the actions of the glutamate at the NMDA receptors in the TL learning in rats.

1. INTRODUÇÃO

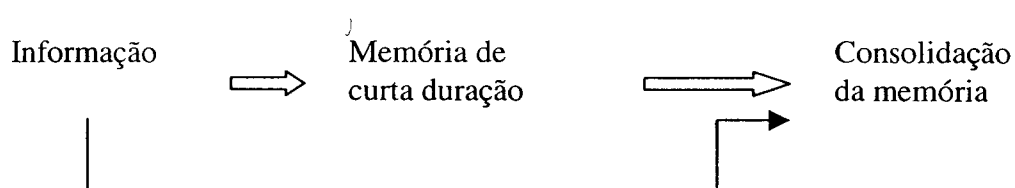
1.1 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Do ponto de vista filogenético, à medida que os mamíferos foram submetidos a constantes desafios de sobrevivência, seu sistema nervoso desenvolveu inúmeros circuitos cerebrais, responsáveis pelo controle de estratégias de adaptação às constantes alterações em seu habitat (Graeff, 1990).

Na natureza, a capacidade de um animal de processar estímulos e contextos, assim como de compará-los com as expectativas formadas a partir das informações arquivadas no banco de memória são fundamentais para a detecção e avaliação de uma situação nova para o animal. A escolha da estratégia comportamental a ser adotada e o controle da sua execução é fundamental para a sobrevivência do animal; a estratégia adotada depende dos tipos de informações ou conhecimentos adquiridos em experiências prévias (aprendizagem), bem como da retenção e evocação dessa informação aprendida durante uma nova exposição (memória).

A aprendizagem em sua primeira fase é denominada aquisição. O termo memória está relacionado a um processo amplo que inclui a consolidação das informações adquiridas e evocação dessas informações em um momento posterior (Izquierdo, 1990). O aprendizado e a memória são adaptações da circuitaria cerebral ao ambiente, acontecendo ao longo de toda a vida do animal (Bear et al., 2002). Essa habilidade cognitiva permite ao animal modificar seu comportamento através de diferentes estratégias de defesa, evitando, assim, situações perigosas (Graeff, 1990).

A memória é a comprovação de que algo foi aprendido e pode ser classificada em dois tipos: o primeiro é a memória de curto prazo (ou de curta duração) que dura de segundos a horas; o segundo, memória de longo prazo (ou de longa duração – esquema 1), é aquela que se pode recordar dias, meses ou anos após ter sido armazenada.



Esquema 1 - Consolidação da memória de longa duração.

O sistema de memória a longo prazo envolve diferentes sistemas neurotransmissores em diferentes regiões sub-corticais (tais como a amígdala, hipocampo e septo medial) e corticais como, por exemplo, o córtex entorrinal (Izquierdo et al., 1993). Essas regiões fazem parte do sistema emocional e, no caso da amígdala e hipocampo, estão respectivamente envolvidos com memória emocional e memória do tipo declarativa.

A memória pode, também, ser dividida em declarativa e não-declarativa. A memória é dita declarativa quando envolve fatos e eventos, necessitando da consciência do indivíduo; também pode ser chamada de memória explícita, pois resulta de um esforço consciente. Memórias declarativas requerem a integridade do córtex cerebral e do hipocampo. Na memória não-declarativa, ou implícita, não há reconhecimento consciente do indivíduo, sendo formadas ao longo de vias reflexas simples. A memória não-declarativa pode, ainda, ser dividida em memória de procedimento ou emocional. A memória de procedimento envolve a

memória para habilidades, hábitos e comportamentos; requer uma aprendizagem para uma resposta motora (procedimento) em reação a um estímulo sensorial.

1.2 MEDO E COMPORTAMENTO DEFENSIVO

A memória emocional é representada pelo medo aprendido e envolve a amígdala, uma das regiões do sistema emocional cerebral (Cahill e McGaugh, 1998).

A partir desta perspectiva biológica é possível enquadrar o medo dentro do paradigma evolucionário. Medo é um estado emocional importante para a sobrevivência do animal, protegendo-o de situações ameaçadoras através da indução de comportamentos defensivos, diminuindo a probabilidade de ocorrência de uma lesão ou ataque de um predador. Assim, quando um animal percebe que seu bem-estar pode ser ameaçado, ou seja, a sua integridade física e até sua chance de sobrevivência estejam a correr riscos, apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação ao medo (Fendt e Fanselow, 1999).

No tocante a roedores, a estratégia de defesa contra um predador depende de o estímulo ameaçador ser potencial ou real. A resposta de fuga é evocada quando o predador está a uma distância crítica. Entretanto, quando a fuga não é possível, o animal exhibe agressão afetiva, caracterizada por vocalizações, exibição dos dentes, além de ataques explosivos com mordidas na região entre olhos e focinho do predador. Em outras situações, quando o perigo é potencial (por exemplo, a presença de odores, ambiente excessivamente

iluminado ou desprotegido pela ausência de superfícies verticais), o animal exhibe um padrão comportamental caracterizado por exploração cautelosa com o corpo abaixado e estirado, acrescida de persistente exploração olfativa do ambiente; eventualmente, o animal pode retrair subitamente a cabeça, em resposta à mínima alteração no ambiente. Esse comportamento é denominado avaliação de risco. O comportamento de avaliação de risco sugere que o animal está “examinando” se existe perigo naquele ambiente e pode ser evocado quando o perigo é incerto, quando a situação é nova ou porque a fonte de perigo tenha estado ali no passado (Blanchard & Blanchard, 1988).

A interpretação de um estímulo ou situação como sendo perigosa, a escolha da estratégia de defesa a ser adotada, bem como o controle de sua execução, depende de operações de natureza cognitiva (Graeff, 1994). A experiência geradora de medo, então, é rapidamente aprendida e memorizada por longo período de tempo, a reação ao medo representa um excelente modelo para se decifrar os mecanismos fundamentais de aprendizagem e memória emocional (Fendt e Fanselow, 1999). De acordo com a tabela 1, alguns comportamentos de defesa e possíveis emoções associadas podem estar relacionados com diferentes estímulos ameaçadores (Graeff, 1999).

TABELA 1. Estruturas cerebrais que regulam o comportamento de defesa e de possíveis emoções associadas (proposta por Graeff, 1999).

<i>Tipo de ameaça</i>	<i>Potencial</i>	<i>Distante</i>	<i>Proximal</i>
Estratégia Comportamental	Avaliação de risco	Imobilidade tensa (Congelamento)	Ameaça/ luta/ fuga
Estruturas neurais críticas	AMG/SSH	AMG/MCP _V	AMG/ HIP _M /MCP _D
Emoção	Ansiedade	Medo	Raiva/Pânico

A amígdala (AMG), o sistema septo-hipocampal (SSH), a substância cinzenta periaquedutal (MCP_D e MCP_V) e o hipotálamo medial (HIP_M) integram diferentes estratégias de defesa, em função do grau de ameaça evocado pelo estímulo ameaçador (Potencial, Proximal ou Distal).

1.3 PLASTICIDADE SINÁPTICA

A reformulação da idéia inicial de Ramón y Cajal (1894) definiu, em termos funcionais, duas categorias de plasticidade: a plasticidade homossináptica ou dependente da atividade hebbiana e a plasticidade heterossináptica, ou dependente da entrada modulatória (Craig et al., 2000). Em 1949, Donald Hebb propôs um papel homossináptico para memória de longo prazo, baseado no fortalecimento das conexões sinápticas. A partir daí, nosso conhecimento a respeito dos mecanismos de plasticidade sináptica e sua relação com os processos de aprendizagem e memória têm avançado significativamente (para revisão ver Baudry, 1998).

A plasticidade homossináptica pode abranger tanto o fortalecimento da transmissão (facilitação homossináptica) quanto o enfraquecimento da transmissão (depressão homossináptica) entre dois neurônios. Os eventos responsáveis pelo fortalecimento ou enfraquecimento sináptico devem envolver, necessariamente, uma mesma sinapse (homossináptica) e a excitação do neurônio pré e pós-sináptico deve estar estritamente correlacionada ao tempo, havendo, nesse caso, o fortalecimento da sinapse por um longo período quando ambos os neurônios disparam coincidentemente; desse modo, uma próxima ativação pré-sináptica aumenta a geração de potenciais excitatórios pós-sinápticos. Por outro lado, quando não há coincidência entre o disparo dos neurônios pré e pós-sináptico, a sinapse entre ambos é enfraquecida. Assim, de acordo com o esquema 2, a plasticidade homossináptica é dependente da especificidade do sinal de entrada, ou seja, quando dois neurônios disparam coincidentemente, apenas a sinapse entre eles é fortalecida, permanecendo as outras sinapses inalteradas ou deprimidas (Craig et al., 2000). Conseqüentemente as sinapses que podem ser assim modificadas são chamadas de sinapses Hebbianas (Bear et al., 2002).

Kandel e Tauc (1965 a,b) propuseram um papel heterossináptico para o fortalecimento das conexões sinápticas. Ao contrário da plasticidade homossináptica ou hebbiana, uma sinapse pode ser fortalecida ou enfraquecida, dependendo do tipo de modulação exercida por um terceiro neurônio, regulador da eficácia sináptica. Esse terceiro neurônio pode ser excitatório ou inibitório, induzindo assim um fortalecimento (facilitação modulatória heterossináptica) ou diminuição da transmissão sináptica (inibição heterossináptica, Craig et al.,

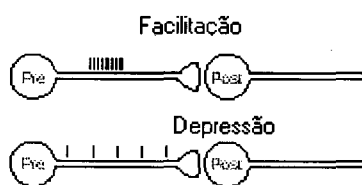
2000). Assim, conforme o esquema 3, a facilitação sináptica exercida pelo neurônio modulatório será maior se a sua estimulação modulatória estiver associada no tempo com a excitação do neurônio pré-sináptico, ou seja, se os neurônios pré-sináptico e modulatório dispararem juntos. A modulação heterossináptica pode, também, ser não-associativa (puramente heterossináptica) e associativa, em que a modulação heterossináptica combina características de mecanismos homossinápticos e heterossinápticos, havendo então uma associação entre os estímulos que ativam o neurônio pré-sináptico e o estímulo que ativa o neurônio modulatório (Craig et al., 2000).

Ainda se pode considerar uma outra forma de transmissão heterossináptica, dependente da concentração de neurotransmissores que seguem o fluxo de líquido extracelular (Vizi e Kiss, 1998) e se aproximam da fenda sináptica estabelecendo uma neurotransmissão parácrina (comunicação por neurotransmissores que se difundem no espaço extracelular cerebral e atuam sobre receptores distantes do sítio de liberação). Apesar dessa liberação somente ocorrer numa distância de poucos micrômetros, já é uma distância muito maior que a extensão da fenda sináptica (Bunin e Wightman, 1999).

Tem sido proposto que os mecanismos hebbianos são usados na memória de curto prazo enquanto que os mecanismos heterossinápticos estão envolvidos no processamento da memória de longo prazo que levam à transcrição e crescimento sináptico. Mecanismos homossinápticos asseguram a ocorrência da aprendizagem, e os mecanismos heterossinápticos garantem que a memória seja mantida (Craig et al., 2000). Trabalhos realizados com interneurônios inibitórios e sua transmissão modulatória mostraram que a

plasticidade heterossináptica é recrutada durante diferentes formas de aprendizado e, que, com a repetição, a modulação heterossináptica mostra-se necessária e suficiente para ativar a transcrição. Esse fato leva ao crescimento (ou retração) das conexões sinápticas, produzindo assim persistentes modificações no fortalecimento sináptico que podem contribuir para o armazenamento de memórias de longo prazo (Craig et al., 2000).

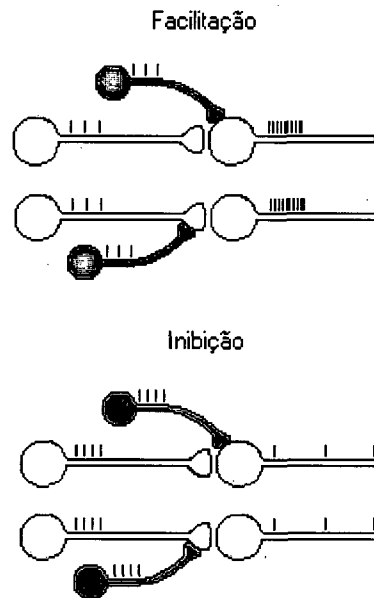
Mecanismo homossináptico de plasticidade



Esquema 2- Plasticidade homossináptica

O fortalecimento ou enfraquecimento sináptico é dependente da atividade entre os neurônios pré e pós-sináptico. Quando a frequência de disparo do neurônio pré-sináptico é alta, ocorre fortalecimento da sinapse em questão. Por outro lado, uma diminuição na frequência de disparo do neurônio pré-sináptico induz um decréscimo na força sináptica (Adaptado de Craig et al., 2000).

Mecanismo heterossináptico de plasticidade



Esquema 3 - Plasticidade heterossináptica

O fortalecimento ou enfraquecimento sináptico é dependente de um terceiro neurônio (excitatório ou inibitório) que pode atuar pré ou pós-sinápticamente (neurônio modulatório). Quando agindo no terminal pré-sináptico, o neurônio modulatório pode aumentar (neurônios coloridos de azul) ou diminuir (neurônios coloridos de vermelho) a liberação de neurotransmissor, promovendo assim um fortalecimento ou enfraquecimento da sinapse, respectivamente. Quando atuando no neurônio pós-sináptico, o neurônio modulatório pode fortalecer ou enfraquecer a transmissão sináptica, dependendo da somação de potenciais excitatórios ou inibitórios sobre o neurônio pós-sináptico (Adaptado de Craig et al., 2000).

1.4 PLASTICIDADE SINÁPTICA E SISTEMA EMOCIONAL

Potenciação de Longo Prazo (*Long-term potentiation - LTP*) tem sido discutida desde 1982 como mecanismo celular de aprendizagem e de memória. Ainda que múltiplos mecanismos sinápticos tenham sido implicados no estabelecimento da LTP (Baudry, 1998), maior ênfase tem sido dada à neurotransmissão glutamatérgica.

O glutamato pode exercer seus efeitos pós-sinápticos mediante a interação com diferentes tipos de receptores, tais como os receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato), NMDA (N-metil D-aspartato) e do tipo metabotrópico (Craig et al., 2000). Os receptores do tipo NMDA apresentam duas características que os distinguem dos receptores do tipo AMPA. Em primeiro lugar, a condutância do receptor NMDA é dependente de despolarização da membrana, devido à ação inibitória do íon Mg^{2+} no canal; quando a membrana é despolarizada, o bloqueio pelo Mg^{2+} é removido, e a corrente iônica está livre para entrar na célula. Assim uma corrente iônica, através do canal do receptor NMDA, requer a liberação concomitante de glutamato pelo terminal pré-sináptico e a despolarização da membrana pós-sináptica. Em segundo lugar, seu canal permite um influxo de íons cálcio no neurônio pós-sináptico. Assim, uma vez que o influxo de cálcio só é observado quando a membrana pós-sináptica é fortemente despolarizada, a magnitude do influxo de cálcio através do canal do receptor NMDA sinaliza especificamente o nível de co-ativação pré e pós-sináptica (Craig et al., 2000).

Quando uma sinapse glutamatérgica é formada, somente receptores do tipo NMDA aparecem na membrana pós-sináptica. Como consequência, a liberação de glutamato em uma única sinapse evoca pouca resposta quando a membrana pós-sináptica está em seu potencial de repouso. Essa sinapse até então silenciosa anuncia sua presença somente quando um número suficientemente grande de sinapses é ativado ao mesmo tempo, de forma a promover despolarização suficiente para liberar o Mg^{2+} que bloqueia o canal. Essa atividade correlacionada é condição necessária para o reforço sináptico.

A modificação hebbiana pode ser explicada se o Ca^{2+} , admitido pelo receptor NMDA, aumenta a efetividade sináptica. Essa entrada de Ca^{2+} desencadeia mecanismos bioquímicos que modificam a eficiência da sinapse e os receptores NMDA atuam como detectores hebbianos de atividade simultânea pré e pós-sináptica. Desse modo, um aumento no influxo de cálcio pode induzir à inserção de novos receptores AMPA na árvore dendrítica pós-sináptica. Quanto maior o número de receptores AMPA pós-sinápticos, maior o fortalecimento da transmissão. Considerando que LTP seja um mecanismo de maturação sináptica, sinapses eletricamente ativas ganham receptores AMPA (Malenka e Nicoll, 1999).

A capacidade de aprender, que alguns eventos têm consequências adversas, é extremamente adaptativo, uma vez que indivíduos que não aprendem a reconhecer estímulos ameaçadores em seu meio ambiente têm chances de sobrevivência reduzidas.

A Aprendizagem emocional tem sido estudada na amígdala, estrutura cerebral essencial para formas simples de aprendizagem, e memória emocional, tal como a aprendizagem associativa, em que um estímulo até então inócuo é pareado (associado) a um estímulo aversivo (Maren, 1999; LeDoux, 1998). A identificação da amígdala como uma base para o medo condicionado favorece o estudo dos processos moleculares e das sinapses que fundamentam essa forma de aprendizagem. Um provável mecanismo celular envolvido na aprendizagem do medo condicionado na amígdala, é a LTP. Em ratos, respostas condicionadas pelo medo podem ser verificadas após poucas sessões de treino e podem incluir sobressalto acústico potencializado pelo medo, analgesia e hipertensão, além de supressão comportamental, tal como o congelamento (*freezing*), caracterizado por imobilidade (exceto para respirar) e hiperatividade autonômica, tais como micção e defecação (Maren, 1999).

A literatura tem implicado os receptores glutamatérgicos na LTP na amígdala, sugerindo assim um papel para esses receptores na aquisição e expressão do medo condicionado. De forma similar à estimulação elétrica de alta frequência, a aprendizagem durante o condicionamento pelo medo também aumenta a amplitude do estímulo auditivo na amígdala, indicando que a ocorrência de LTP na via auditiva para a amígdala deve, de fato, mediar o medo de um estímulo auditivo condicionado (Rogan et al., 1997; McKernan e Shinnick-Gallagher, 1997).

O trabalho de Mayford e seus colaboradores (1996) com camundongos transgênicos que expressavam uma forma mutante do gene para a proteína cinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMK II) na amígdala e hipocampo

permite evidenciar indiretamente o papel da LTP na amígdala (Maren, 1999). No hipocampo e na amígdala, a CaMK II é ativada pelo influxo de Ca^{2+} através do receptor NMDA. Essa cinase interage com fatores de transcrição nuclear, envolvidos com a aprendizagem e com a memória (Maren, 1999) e pode estar implicada na indução da LTP, visto que camundongos transgênicos exibiram prejuízo no medo condicionado (Mayford et al., 1996).

Entretanto, tem sido proposto que a amígdala não é o sítio de memória declarativa de longo prazo, mas pode influenciar o processamento de memória em outras regiões cerebrais tal como o hipocampo e neocórtex; geralmente inativo em situações de aprendizagem sem conotação emocional, o sistema hormonal relacionado ao estresse é ativado durante eventos emocionais e parece igualmente regular os processos de memória em outras regiões do encéfalo (Figura 4-Cahill e McGaugh, 1998).

Modulação da memória para eventos emocionais

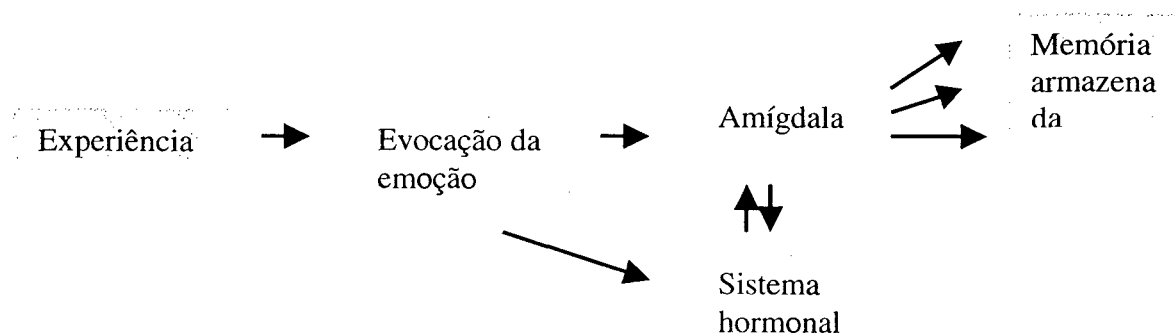


Figura 4- Modulação da Memória (Adaptado de Cahil e McGaugh, 1998).

1.5 ESTUDOS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM ANIMAIS

Vários laboratórios têm publicado dados que se referem aos mecanismos dos neurotransmissores envolvidos no processamento da memória na amígdala, hipocampo e septo medial, além da interação dessas estruturas com o córtex entorrinal na formação da memória de longo-prazo (Izquierdo et al., 1993). Esses estudos de aprendizagem e de memória em animais têm utilizado diferentes testes comportamentais. Alguns desses testes permitem o estudo de memória emocional porque o comportamento animal é motivado por um estímulo aversivo, como por exemplo, o teste de esquiva inibitória do tipo *step-down* (Izquierdo et al., 1992a,b). Nesse teste, o comportamento animal de descer de uma plataforma, existente em uma caixa, é punido com um choque elétrico nas patas do animal. O teste assume que a memória aversiva, e, portanto emocional, do choque elétrico motivará o animal a permanecer na plataforma, evitando assim o choque elétrico (resposta de esquiva inibitória ou passiva). Desse modo, a latência para descer da plataforma na segunda exposição é maior que aquela exibida na primeira exposição.

O glutamato parece exercer um papel chave na aprendizagem desse tipo de comportamento motivado por aversão; a infusão pós-treino de AP5 (antagonista dos receptores NMDA) na amígdala, septo medial ou hipocampo bloqueia a consolidação de uma tarefa de esquiva inibitória do tipo *step-down*; a administração de glutamato nas mesmas regiões tem efeito exatamente oposto ao AP5, causando facilitação retrógrada da tarefa (Izquierdo et al., 1992a,b). Alguns grupos de pesquisa demonstraram, ademais, que a administração sistêmica de bloqueadores indiretos de receptores NMDA (ou seja, bloqueadores

de canais de Ca^{2+}) induzem amnésia em ratos (Robinson et al., 1989; Walker e Gold, 1991). Além disso, a infusão intracerebroventricular de antagonistas NMDA (MK-801 e AP5) dificulta retenção da aprendizagem espacial (Morris, 1990).

A acetilcolina, além do glutamato, também participa da modulação de memória de esquila através dos receptores muscarínicos. A administração sistêmica de escopolamina (antagonista muscarínico) causa amnésia em humanos e animais (Izquierdo, 1989; Hlinák e Krejčí, 1998). Na tarefa de esquila inibitória, a infusão pós-treino de escopolamina na amígdala, hipocampo ou na área septal causa amnésia retrógrada, ao passo que o agonista muscarínico oxotremorine causa facilitação retrógrada.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) também divide com o glutamato e a acetilcolina a modulação da memória emocional, através dos receptores do tipo GABA_A localizados no septo-medial, amígdala e hipocampo. Esses receptores são, ademais, modulados por benzodiazepínicos ou por moléculas do tipo benzodiazepínicas liberadas de acordo com o grau de ansiedade e ou estresse associado com cada tarefa (Izquierdo e Medina, 1991). A participação do GABA na modulação da memória parece envolver um efeito inibitório sobre os neurônios que são ativados pelos receptores NMDA e pelos muscarínicos na amígdala, no septo-medial e no hipocampo (Izquierdo et al., 1992b). As sinapses GABA-érgicas são potencializadas por benzodiazepínicos, possivelmente de origem endógena, liberados depois das experiências de treino (Izquierdo, 1992).

Memória emocional também pode ser avaliada em modelos animais de ansiedade tais como o labirinto em cruz (LCE; Handley e Mithani, 1984). Esse modelo não utiliza choques elétricos como fonte aversiva para a indução da aprendizagem, e, sim, estímulos naturais, tais como espaços abertos. O modelo é baseado no medo inato de roedores por espaços abertos e elevados (Montgomery, 1955).

O LCE tem forma de uma cruz simétrica, contendo dois braços abertos perpendiculares a dois braços que são fechados por paredes laterais. O campo exploratório dos animais é assim constituído de áreas com diferentes graus de aversão, ou seja, espaços abertos ou desprotegidos (representados pelos braços abertos do labirinto) e espaços protegidos (representados por braços que são fechados por paredes laterais; Bertoglio e Carobrez, 2000). Ainda que tenha sido demonstrado que a exposição forçada de ratos aos braços abertos ou fechados promove ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a elevação no nível sérico de corticosterona é maior quando os animais são confinados aos braços abertos, demonstrando que tais braços são mais estressantes para o animal, em relação aos braços fechados (Pellow et al., 1985). Além disso, a liberação de corticosterona induzida pela exposição aos braços abertos não se habitua numa segunda exposição, 24 horas após a primeira (File et al., 1994). Alia-se a isso observar que o confinamento de ratos aos braços abertos induz maior ocorrência de comportamentos relacionados com medo/ansiedade, tais como congelamento e defecação, em relação aos braços fechados (Pellow et al., 1985).

Também tem sido demonstrado que durante a exploração livre do LCE, os animais exibem preferência pelos braços fechados, permanecendo menos tempo e entrando menos freqüentemente nos braços abertos (Pellow et al., 1985). Observa-se, ainda, que drogas ansiolíticas utilizadas na clínica, tais como os benzodiazepínicos, aumentam a porcentagem de entradas e/ou tempo de permanência nos braços abertos, enquanto drogas com atividade ansiogênicas reduzem ambas as variáveis (Pellow et al., 1985), o que valida o modelo do ponto de vista farmacológico, à medida em que é capaz de reconhecer drogas ansiolíticas clássicas. O efeito ansiolítico induzido pelos benzodiazepínicos no LCE parece envolver a facilitação das ações inibitórias do GABA, na amígdala central e basolateral (Pesold e Treit, 1995).

Parece haver, consenso, portanto, de que os braços abertos do labirinto possuem propriedades aversivas em roedores. Tem sido proposto, assim, que roedores evitam a exploração dos braços abertos devido ao medo gerado pela ausência de superfícies verticais, que impedem o comportamento tigmotáxico dos animais e, conseqüentemente, reduz a exploração nesse tipo de braço (Treit et al., 1993).

No LCE, a aprendizagem emocional pode ser estudada através do paradigma da Latência de Transferência (LT; Itoh et al., 1990). Esse teste prediz que a latência de ratos (Frussa-Filho et al., 1991; Sharma e Kulkarni, 1992) ou camundongos (Itoh et al., 1990) para se deslocar da extremidade de um dos braços abertos até um braço fechado do labirinto (LT) é menor durante uma re-exposição ao labirinto. Tem sido proposto que durante a primeira LT o animal adquire o conhecimento das áreas protegidas e desprotegidas do labirinto. Essa

aprendizagem motivaria o animal a emitir a segunda LT em um tempo menor, em busca da segurança do braço fechado (Itoh et al., 1990). Desse modo, o tempo de LT sofre significativa redução durante uma re-exposição ao braço aberto, suportando, assim, a hipótese de que a LT pode ser um parâmetro confiável de aprendizagem e memória emocional em roedores expostos ao LCE (Itoh et al., 1991; Sharma e Kulkarni, 1992).

A literatura tem demonstrado que a LT é uma tarefa comportamental modulada pelos receptores do tipo NMDA e muscarínico; a administração sistêmica de um antagonista muscarínico (escopolamina) produz um prolongamento da LT durante a repetição do teste (Itoh et al., 1990; Itoh et al., 1991; Sharma e Kulkarni, 1992; Miyazaki et al., 1995; Kumar e Kulkarni, 1996; Hlinák e Krejčí, 1998; Hlinák e Krejčí, 2002b). Da mesma forma, a administração sistêmica de MK-801 (antagonista NMDA) prejudica a aprendizagem da LT no labirinto (Itoh et al., 1991; Sharma e Kulkarni, 1992; Hlinák e Krejčí, 1998; Hlinák e Krejčí, 2000; Hlinák e Krejčí, 2002a); além disso, a co-administração sistêmica de doses sub-efetivas de MK-801 e escopolamina prejudicam a retenção de memória da LT (Hlinák e Krejčí, 1998).

1.6 ÓXIDO NÍTRICO

Óxido Nítrico (NO) é um radical livre, reconhecido como o primeiro neurotransmissor gasoso (para revisão ver Bara et al., 2001), produzido por enzimas denominadas NO-sintase (NOS), que catalisam a conversão de L-arginina (L-arg) em L-citrulina, produzindo NO como co-produto (Garthwaite, 1991). As enzimas NOS podem ser classificadas de acordo com o local onde são encontradas, sendo divididas em NOS do tipo I ou nNOS (neurônios), tipo III ou eNOS (endotélio) e tipo II ou macNOS (macrófagos; Moore e Handy, 1997).

No sistema vascular, o NO foi inicialmente implicado na vasodilatação (Ignarro et al., 1987) dependente do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980). Em condições de repouso a ação das enzimas do tipo eNOS permite às células endoteliais promover uma liberação basal de NO, que é importante no controle do tônus vascular e, conseqüentemente, na pressão arterial (Schini-Kerth e Vanhoute, 1995). Por exemplo, a inibição crônica da síntese de eNOS produz déficit na síntese de NO por parte do endotélio e, por isso, no tônus vasodilatador, o que produz elevação da pressão arterial (Ribeiro et al., 1992). Assim, o efeito vasodilatador se inicia com a síntese de NO pelo endotélio e sua difusão até o músculo liso vascular, onde estimula a produção de GMP_C que inibe o tônus muscular (Joly et al., 1992).

A primeira evidência para uma ação do óxido nítrico no sistema nervoso central derivou de estudos com cerebelo de ratos, onde o glutamato, agindo através dos receptores NMDA, aumentava rapidamente o nível de cálcio intracelular e, conseqüentemente, a conversão de L-arginina em L-citrulina, com

a formação de NO (Garthwaite, 1988). No sistema nervoso central o NO pode funcionar como um mensageiro intercelular, difundindo-se rapidamente de seu local de síntese para outros neurônios alvos NO-responsivos, dentro de um limite de extensão espacial de aproximadamente 0,3-0,4 mm (Lancaster, 1997). Esse tipo de comunicação química não-sináptica (Kiss e Vizi, 2001), também chamada de transmissão por “volume” (Agnati et al., 1995) pode permitir à síntese de NO modular a neurotransmissão de outros sistemas neurotransmissores (Vizi e Kiss, 1998). O NO pode igualmente modular a excitabilidade neuronal através de um mecanismo GMP_c -dependente (Prast e Philippu, 2001).

A síntese de NO pode ser importante em processos de plasticidade sináptica, tais como aprendizagem e como memória (Hölscher, 1997; Medina e Izquierdo, 1995). Tem sido demonstrado que a LTP no hipocampo pode ser bloqueada (Doyle et al., 1996) ou prejudicada (Haley et al., 1993) por inibidores da NOS. A inibição da LTP pode, também, ser obtida através da administração de inibidores da NOS no interior do neurônio pós-sináptico, mas não no neurônio pré-sináptico (Schuman e Madison, 1991). Assim, o NO parece ser liberado de neurônios pós-sinápticos por meios não vesiculares, atuando sobre os terminais pré-sinápticos, sendo, portanto, considerado um mensageiro retrógrado (Bear et al., 2002). Ao contrário, doadores de NO potencializam a geração de potencial excitatório pós sináptico (PEPS- Bon et al., 1992), aumentam síntese de GMP_c na célula pré-sináptica (Southam e Garthwaite, 1993) e facilitam LTP quando injetado na célula pré-sináptica (Arancio et al., 1996). Esses fatos indicam que uma elevada despolarização pós-sináptica induz a síntese de NO na célula pós-sináptica, que se difunde pelo espaço extracelular e induz a formação de GMP_c no terminal

pré-sináptico, modulando assim a função celular que leva à LTP (Prast e Philippu, 2001).

Além do hipocampo, em que a indução da LTP é NO-independente em neurônios CA1, mas é amplamente NO-dependente no “stratum oriens” (Son et al., 1996), outras regiões importantes na função cognitiva, emocional e/ou comportamental também exibem LTP dependentes da síntese de NO (Prast e Philippu, 2001). Bloqueio e facilitação da LTP têm sido observadas no neocórtex auditivo (Wakatsuki et al., 1998) e no núcleo medial da amígdala (Abe et al., 1996). Estudos recentes demonstram um papel importante da via NO/ GMP_C na LTD de neurônios estriatais (Calabresi e col., 1999) e cerebelares (Boxall e Garthwaite, 1996).

Em algumas tarefas experimentais, como esquiva inibitória, ou mesmo na exploração de um ambiente novo, o NO parece afetar preferencialmente a fase de aquisição da aprendizagem. Assim, durante a aprendizagem de esquiva ou exposição a um novo ambiente, a atividade da NOS aumenta consideravelmente no hipocampo, caudado, putamen e córtex somato-sensorial (Papa et al., 1994).

Em uma tarefa de alternância espacial reforçada por água, a expressão da NOS aumenta no giro dentado e no córtex frontal (Zhang et al., 1998). A atividade da NOS também fica elevada após a aquisição de uma tarefa de esquiva inibitória (Bernabeu et al., 1995); esses resultados indicam que aquisição da memória pode necessitar de uma regulação acima do nível da atividade basal da NOS.

Por outro lado, a administração sistêmica de inibidores da NOS induzem déficit de aprendizagem de esQUIVA inibitória no labirinto em T elevado (Calixto et al., 2001); nesse estudo, também foi demonstrado que a administração sistêmica de doses sub-efetivas de L-NAME para induzir amnésia elevou de forma significativa a pressão arterial dos animais, sugerindo o déficit de aquisição de esQUIVA induzido por L-NAME (inibidor da NOS) é decorrente da inibição da NOS no sistema nervoso central e não de efeitos periféricos da droga.

A administração de inibidores da NOS no hipocampo dorsal também prejudica a esQUIVA inibitória no teste de *step-down* (Bernabeu et al., 1995), enquanto que drogas doadoras de NO facilitam a aquisição de esQUIVA inibitória no mesmo teste (Fin et al., 1995). Desse modo, a síntese de NO no hipocampo dorsal parece ser importante na aquisição desse tipo de comportamento defensivo que é motivado pelo medo e baseado em supressão comportamental.

Por outro lado, tem sido demonstrado que o efeito nootrópico (facilitador de memória) de neuroesteróides pode envolver a síntese de NO como sistema de amplificação de sinal dos receptores NMDA (Reddy e Kulkarni, 1998). Nesse estudo, os autores verificaram que a administração sistêmica de neuroesteróides em camundongos era capaz de reverter o efeito amnésico de MK-801, mas podia ser bloqueado pela administração sistêmica de L-NAME. Reddy e Kulkarni (1998) utilizaram a LT como metodologia de estudo da aprendizagem, ou seja, uma tarefa baseada na emissão de uma resposta que é motivada pela aversão dos braços abertos do labirinto. O estudo demonstrou que a síntese de NO pode modular também, em camundongos, a aprendizagem emocional baseada em

emissão de resposta. Entretanto, a literatura não dispõe de estudos semelhantes em ratos.

Outro aspecto a ser considerado em relação aos estudos de Reddy e Kulkarni (1998) diz respeito aos efeitos periféricos da administração de L-NAME; a síntese de NO é importante para a manutenção de um tônus vasodilatador no sistema circulatório e sua inibição por L-NAME induz hipertensão arterial. Visto que o efeito da hipertensão sobre a capacidade cognitiva dos animais não foi avaliado, o efeito pró-amnésico do L-NAME observado por Reddy e Kulkarni pode ser decorrente do estado hipertensivo, "per se", e não da inibição da NOS no sistema nervoso central.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o envolvimento do óxido nítrico na aprendizagem emocional de ratos no labirinto em cruz elevado no paradigma da latência de transferência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o efeito da administração sistêmica de diferentes doses do inibidor da síntese de NO, N^ω nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) sobre a aprendizagem emocional avaliada através da tarefa de latência de transferência. N^ω nitro-D-arginina-metil-ester (D-NAME, isômero inerte) e escopolamina (droga amnésica) serão utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

2.2.2 Avaliar o efeito da administração sistêmica de L-arginina (molécula precursora da síntese de NO) sobre a aquisição da latência de transferência.

2.2.3 Verificar se algum efeito do L-NAME na latência de transferência pode ser revertido pela co-administração de L-arginina.

2.2.4 Estabelecer uma curva dose/resposta de MK 801 para determinação da dose amnésica.

2.2.5 Verificar o efeito da co-administração de doses sub-efetivas de L-NAME e MK 801 sobre a latência de transferência.

2.2.6 Avaliar a eficácia dos tratamentos com L-NAME em alterar a pressão arterial dos animais na primeira e segunda exposição ao LCE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos, com idade de aproximadamente 2,5 meses, pesando entre 200 e 300 g foram utilizados como sujeitos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Previamente aos experimentos os animais foram distribuídos em grupos de cinco por caixa de polipropileno (45 x 30 x 15cm) e submetidos a um período de adaptação de sete dias ao biotério do Laboratório, com livre acesso a água e ração padrão, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendendo às seis horas) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ$ C). Os animais foram manipulados apenas durante a limpeza das caixas (a cada 48 h), a pesagem, a administração de drogas e os testes comportamentais.

3.2 DROGAS

L-NAME, D-NAME, L- Arginina (L-ARG) e Escopolamina (SCO) foram obtidos da Sigma Co, USA. MK-801 (Dizolcipine) foi obtido da Tocris. As drogas foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) e administradas por via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1 ml para cada 100g de peso corporal (dos animais).

3.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) consiste de quatro braços construídos de madeira, em forma de cruz, com dimensões iguais (de 50 X 10 cm), elevados 50 cm do solo. Os dois braços fechados possuem paredes laterais de vidro fumê

de 40 cm de altura e estão dispostos perpendicularmente aos braços abertos, que são circundados por uma pequena borda de acrílico (1cm) para diminuir a incidência de queda do animal durante o experimento. Cada braço apresenta ainda uma marcação central que os divide em dois quadrantes iguais, um proximal e um distal em relação ao quadrante central. Como única fonte de iluminação foram utilizadas 4 lâmpadas fluorescentes (15W), dispostas em forma de cruz a uma altura de 100 cm acima do LCE.

3.4 REGISTRO DA LATÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA

Cada animal foi cuidadosamente colocado na extremidade de um braço aberto do LCE (quadrante distal) com a cabeça voltada para a área central. O tempo requerido pelo animal para se deslocar dali, até atingir espontaneamente, com as quatro patas, o quadrante distal de um dos braços fechado foi registrado e definido latência de transferência (LT_1). No dia seguinte o animal foi submetido a uma segunda exposição ao LCE para um novo registro (LT_2 ; durante o presente estudo todos os registros de LT_2 foram realizados sem administração prévia de drogas). Os animais que não emitiram a LT em um tempo de até 300 segundos foram desconsiderados da amostra. A eventual queda de um animal do labirinto implicou, necessariamente, na sua exclusão. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste, todos os braços do labirinto foram limpos com tecido umedecido em álcool 20% e devidamente secos. Todos os experimentos foram realizados entre 12 e 14 horas.

3.5 EXPERIMENTOS

3.5.1 EXPERIMENTO 1

O objetivo do experimento 1 foi avaliar o efeito da administração sistêmica de diferentes doses de L-NAME sobre a aquisição da latência de transferência no LCE. Seis grupos de ratos foram aleatoriamente distribuídos para receber, 30 minutos antes do registro da LT1, um dos seguintes tratamentos: Salina 0,9% (grupo controle -SAL), L-NAME (5,10 ou 50mg.kg⁻¹), D-NAME (50mg.kg⁻¹) ou SCO (1mg.kg⁻¹). No dia seguinte a LT2 foi avaliada.

3.5.2 EXPERIMENTO 2

O objetivo do experimento 2 foi avaliar o efeito da administração sistêmica de diferentes doses de L-arginina sobre a aquisição da latência de transferência no LCE. Nessa etapa, quatro grupos de animais foram aleatoriamente distribuídos para receber, 30 minutos antes do registro da LT1, um dos seguintes tratamentos: Salina 0,9% ou L-Arginina (50, 100 ou 200 mg. kg⁻¹). Vinte e quatro horas depois os mesmos animais foram submetidos a segunda exposição ao LCE para o registro da LT₂.

3.5.3 EXPERIMENTO 3

O experimento 3 teve como objetivo verificar a possível reversão, pela L-arginina, de algum efeito do L-NAME sobre a latência de transferência. Nessa etapa, quatro grupos de animais receberam uma co-administração de drogas (duas injeções i.p. consecutivas) como se segue: Salina (0,9%)+Salina

(SAL/SAL), Salina+L-NAME na dose de $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (SAL/L-NAME₅₀), L-ARG $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +L-NAME $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (L-ARG₁₀₀/L-NAME₅₀), L-ARG $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +L-NAME $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (L-ARG₂₀₀/L-NAME₅₀); trinta minutos após a administração de drogas, LT₁ foi registrada conforme descrito no item 3.5. Vinte e quatro horas depois, os animais foram re-expostos ao LCE para o registro da LT₂.

3.5.4 EXPERIMENTO 4

O objetivo do experimento 4 foi de estabelecer uma curva dose/resposta de MK-801 para determinação da dose amnésica sobre a aquisição da LT no LCE. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos para receber, 30 minutos antes do registro da LT₁, um dos seguintes tratamentos: SAL, MK-801 ($0,075$ e $0,15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). No dia seguinte os animais foram re-expostos ao LCE para o registro da LT₂.

3.5.5 EXPERIMENTO 5

O experimento 5 teve como objetivo verificar uma possível interação entre os receptores NMDA e NO na aprendizagem da LT no LCE. Nesta etapa os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e receberam uma co-administração de drogas (duas injeções i.p. consecutivas), 30 minutos antes do registro da LT₁ como se segue: Salina (0,9%)+Salina (SAL/SAL); Salina+L-NAME $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (SAL/L-NAME₅), Salina+MK-801 $0,075\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (SAL/MK-801_{0,075}) e L-NAME $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +MK-801 $0,075\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (L-NAME 5/MK-801_{0,075}). No dia seguinte a LT₂ foi avaliada conforme descrito no item 3.5.

3.5.6 EXPERIMENTO 6

Sabendo-se que a inibição da síntese de óxido nítrico no endotélio vascular induz elevação da pressão arterial, a eficácia dos tratamentos com L-NAME em induzir hipertensão foi igualmente avaliada, na primeira (momento de aquisição da LT) e segunda exposição ao LCE (momento de evocação da memória), de forma indireta pela cauda do animal (Zatz, 1990). Os protocolos experimentais foram realizados no Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP) sob orientação do Professor Dr. Heitor Moreno Júnior. Quatro grupos de animais receberam, por via i.p., salina 0,9% ou L-NAME(5, 10 e 50mg.kg⁻¹); trinta minutos e vinte e quatro horas após a administração da droga a pressão arterial foi avaliada. Previamente à mensuração da pressão arterial, os animais foram aquecidos por 20 minutos em uma caixa de polipropileno (49 x 30 x 20 cm; anteriormente aquecida externamente pela base, por uma lâmpada de 100W controlada por um termostato e mantida a 37-39° C). O pré-aquecimento teve como objetivo promover a dilatação dos vasos sanguíneos da cauda do animal. Após o pré-aquecimento, os animais foram colocados em uma caixa de imobilização translúcida, sendo que um anel de pressão, conectado a um manômetro externo, foi acoplado à base da cauda. Um microfone elétrico (utilizado como detector) foi conectado a uma extremidade de um tubo de látex (30 cm de comprimento e diâmetro externo e interno de 12 e 10 mm, respectivamente) e a cauda do animal acoplada à outra extremidade, de maneira que, como um estetoscópio, as pulsações da cauda poderiam ser transmitidas para o microfone (através do ar contido no tubo de látex) e deste para um osciloscópio.

Para evitar perda de ar da parte interna do tubo (e, portanto, atenuação do sinal), a cauda do animal foi untada com graxa antes de ser acoplada ao tubo de látex. Através do manômetro foi possível impor pressões crescentes ao anel na base da cauda a ponto de interromper a passagem de sangue para a cauda e, conseqüentemente, interromper os sinais de pulsação (TCP; *Tail Cuff Pressure*).

Na avaliação da pressão arterial, a TCP foi elevada 30 mmHg acima da pressão na qual as pulsações da cauda cessaram, quando então, foi lentamente reduzida. No momento em que as pulsações recomeçaram, a pressão arterial foi determinada por visualização direta do sinal da cauda no osciloscópio e leitura da TCP para a primeira pulsação no manômetro externo. Visto que os animais não foram previamente adaptados ao protocolo experimental e com o objetivo de minimizar os efeitos do estresse inicial sobre a pressão arterial, as leituras foram consideradas válidas somente quando três determinações consecutivas foram obtidas com variação não superior a 2 mmHg (tipicamente 3 a 4 determinações).

3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais que estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências. O modelo empregado no presente estudo é baseado no comportamento exploratório espontâneo do animal. A fonte de motivação aversiva foi a mais próxima possível daquela encontrada pelo animal em seu ambiente natural, não necessitando da utilização de choques elétricos.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) utilizando-se “Droga” como fator 1 e “Exposição” como fator 2 (para a análise de pressão arterial utilizou-se “Droga” como fator 1 e “Tempo” como fator 2), seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações. Apenas valores de probabilidade menores que 5% ($p < 0,05$) foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

A figura 1 mostra o efeito amnésico induzido pela administração sistêmica de L-NAME em ratos submetidos ao paradigma da LT. A ANOVA não revelou diferença entre os grupos em relação ao fator Droga [$F(5,172)=1.75$, $p=0.1251$]. Também não houve interação entre os fatores “Droga” e “Exposição” [$F(5,172)=0.63$, $p=0.6708$]. ANOVA revelou uma diferença em relação ao fator “Exposição” [$F(1,172)=39.16$, $p < 0.0001$]. O teste de Duncan indicou que os grupos tratados com salina ($p < 0,01$), L-NAME 5 ($p < 0,001$), L-NAME 10 ($p < 0,05$) e D-NAME 50 ($p < 0,05$) apresentaram LT_2 inferior à LT_1 , indicando assim a ocorrência de aprendizagem emocional. O grupo tratado com L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $p = 0.0554$) e o grupo tratado com escopolamina ($p = 0.3126$) apresentaram a mesma LT em ambas as exposições (LT_1 e a LT_2).

4.2 EXPERIMENTO 2

A figura 2 demonstra a curva dose/resposta de L-arginina em função da latência de transferência de ratos no labirinto em cruz elevado. ANOVA não revelou diferença em relação ao fator “Droga” [$F(3,140)=1.31, p=0.2725$], nem tampouco na interação “Droga” x “Exposição” [$F(3,140)=0.51, p=0.6726$]. ANOVA mostrou uma diferença em relação ao fator “Exposição” [$F(1,140)=44.95, p<0.0001$]. O teste de Duncan indicou que os grupos tratados com salina ($p<0.001$) e diferentes doses de L-ARG ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}, p<0.01$; $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}, p<0.05$; $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}, p<0.0001$) apresentaram a LT_2 menor do que a LT_1 .

4.3 EXPERIMENTO 3

A figura 3 mostra a reversão do efeito amnésico do L-NAME pela L-arginina. ANOVA não revelou diferença em relação ao fator “Droga” [$F(3,144)=0.78, p=0.5026$]. Também não houve interação entre o fator “Droga” e “Exposição” [$F(3,144)=0.34, p=0.7914$]. ANOVA mostrou uma diferença em relação ao fator “Exposição” [$F(1,144)=21.58, p<0.0001$]. O teste de Duncan permitiu evidenciar que a co-administração de drogas influenciou o grupo controle (SAL+SAL; $p<0.05$). O grupo L-ARG200+L-NAME50 apresentou menor LT_2 em relação a LT_1 ($p<0.05$). Os grupos L-NAME50+salina ($p=0.0919$) e L-NAME50+L-ARG100 ($p=0.0735$) exibiram a mesma LT em ambas as exposições.

4.4 EXPERIMENTO 4

A figura 4 mostra o efeito amnésico induzido pela administração sistêmica de MK-801. ANOVA não revelou diferença em relação ao fator “Droga” [$F(2,114)=0.36$, $p=0.6916$] nem interação “Droga” x “Exposição” [$F(2,114)=0.48$, $p=0.6172$]. ANOVA mostrou diferença no fator “Exposição” [$F(1,114)=15.20$, $p<0.001$]. O teste de Duncan revelou que os grupos tratados com salina e MK-801 ($0,075 \text{ mg.kg}^{-1}$) apresentaram valores de LT_2 menores que aqueles exibidos durante a LT_1 ($p<0.05$); já o grupo tratado com MK-801($0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$) apresentou LT_2 igual a LT_1 ($p=0.1356$).

4.5 EXPERIMENTO 5

A figura 5 representa o efeito amnésico induzido pela co-administração de doses sub-efetivas de L-NAME e MK-801. ANOVA revelou diferença em relação ao fator “Exposição” [$F(1,112)=20.10$, $p<0.0001$]), porém não revelou diferença em relação ao fator “Droga” [$F(3,112)=0.88$, $p=0.4520$] nem interação entre “Droga” e “Exposição” [$F(3,112)=0.36$, $p=0.7762$]. O teste de Duncan indicou que os grupos recebendo co-administração de solução SAL+SAL ($p<0.05$), LNAME5+SAL ($p<0.05$) e MK-801 (0.075 mg.kg^{-1})+SAL ($p<0.05$) apresentaram redução da LT_2 em relação à LT_1 . O grupo MK-801 ($0,075 \text{ mg.kg}^{-1}$)+L-NAME(5mg.kg^{-1}) não apresentou diferença entre a LT_1 e a LT_2 ($p=0.2173$).

4.6 EXPERIMENTO 6

A figura 6 mostra a Pressão arterial de ratos tratados com diferentes doses de L-NAME. ANOVA não revelou diferença em relação ao fator “Droga” [$F(3,98)=2.23$, $p=0.0889$] nem interação “Droga” x “Tempo” [$F(3,98)=2.21$,

$p=0.0907$], mas indicou diferença em relação ao fator “Tempo” [$F(1,98)=22.02$, $p<0.0001$]; O teste de Duncan revelou que todos os tratamentos com L-NAME induziram hipertensão trinta minutos após a administração da droga ($p<0.05$), porém, no dia seguinte, os grupos tratados com L-NAME (5, 10 e 50 mg.kg⁻¹) apresentaram a mesma pressão arterial em relação ao grupo tratado com salina.

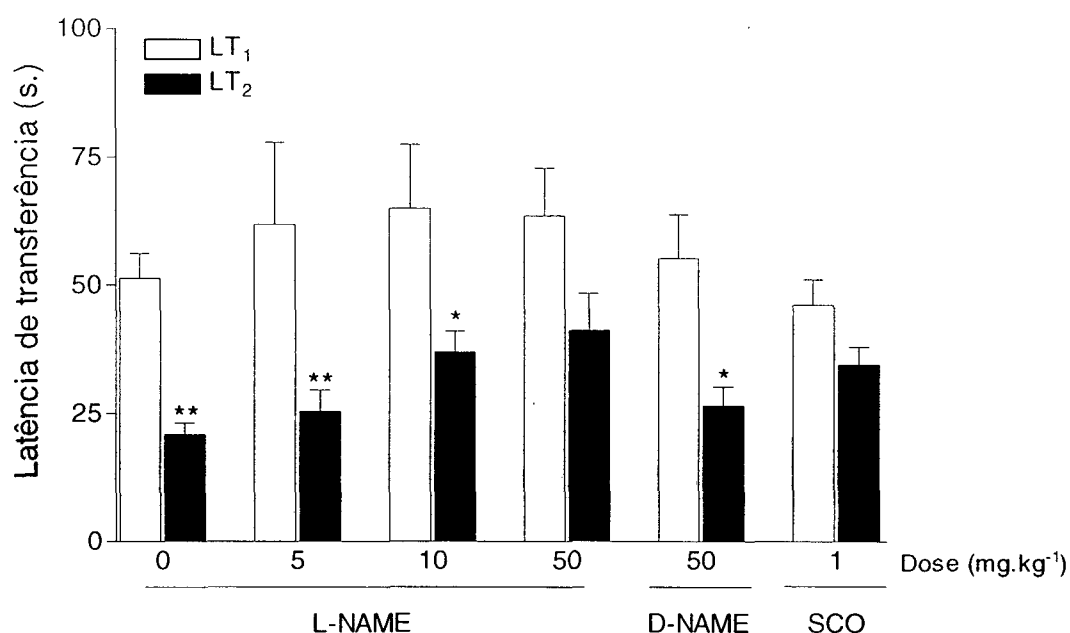


Figura 1. Efeito amnésico induzido pela administração sistêmica de L-NAME: no primeiro dia os animais receberam salina (0.9%) ou L-NAME (5, 10 e 50 mg.kg⁻¹), D-NAME (50mg.kg⁻¹) ou escopolamina (SCO, 1.0mg.kg⁻¹) por via *i.p.*, 30 minutos antes do registro da Latência de Transferência (LT₁); no dia seguinte cada grupo foi re-exposto ao labirinto para novo registro (LT₂). Cada coluna representa a latência de transferência média ± E.P.M. **p*<0.05 e ***p*<0.01 em relação à respectiva LT₁ (ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

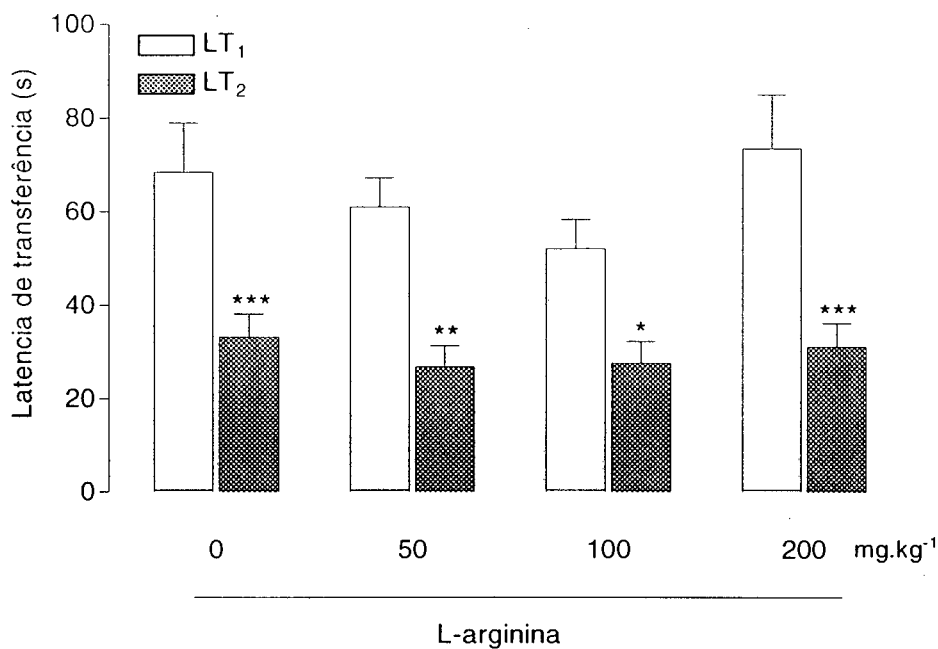


Figura 2. Curva dose/resposta de L-arginina em função da latência de transferência de ratos no labirinto em cruz elevado: no primeiro dia os animais receberam salina (0.9%) ou L-arginina (50, 100 e 200 mg.kg⁻¹) por via *i.p.*, 30 minutos antes do registro da Latência de Transferência (LT₁); no dia seguinte cada grupo foi re-exposto ao labirinto para novo registro (LT₂). Cada coluna representa a latência de transferência média \pm E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$ em relação à respectiva LT₁ (ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

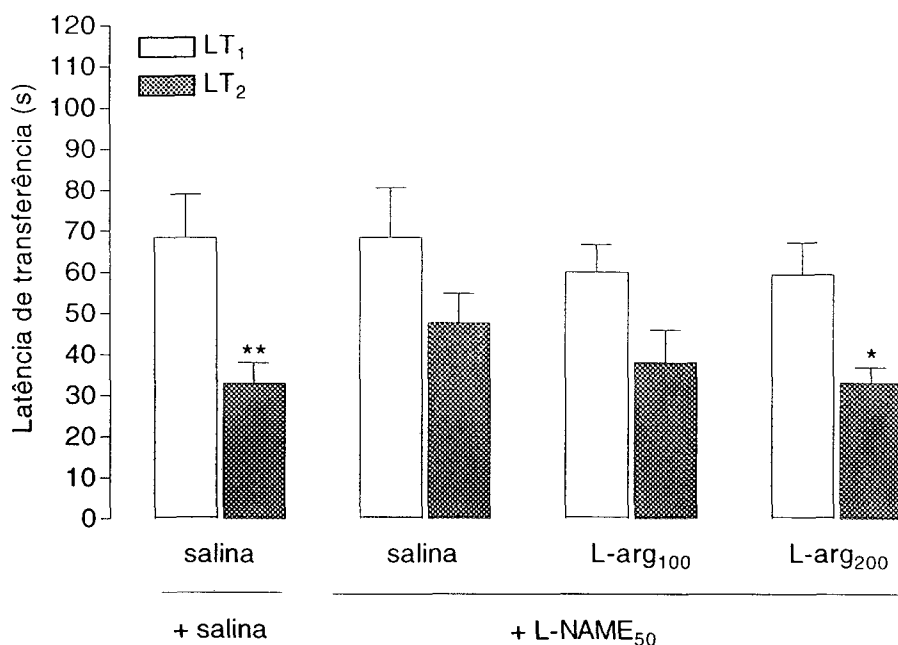


Figura 3. Reversão do efeito amnésico do L-NAME pela L-arginina: no primeiro dia os animais receberam uma co-administração sistêmica de L-NAME₅₀+salina, L-NAME₅₀+L-arginina (L-arg; 100 ou 200mg.kg⁻¹) ou salina+salina (grupo controle) e, após trinta minutos, tiveram a latência de transferência registrada (LT₁) no labirinto em cruz elevado. No dia seguinte os animais foram colocados no labirinto para o registro da LT₂. Cada coluna representa a latência de transferência média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ em relação à respectiva LT₁ (ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

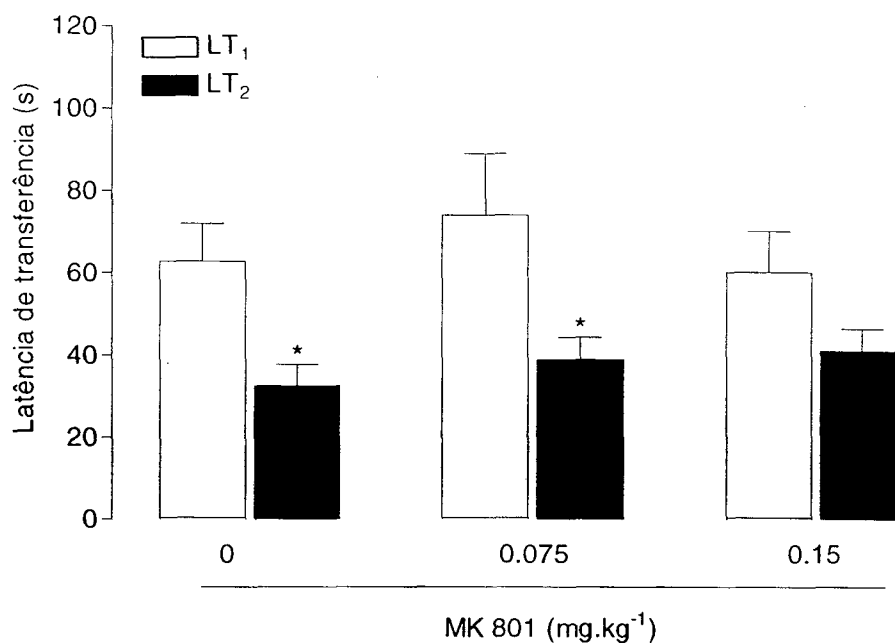


Figura 4. Efeito amnésico induzido pela administração sistêmica de MK-801: no primeiro dia os animais receberam salina (0.9%) ou MK-801 (0.075 e 0.15 mg.kg⁻¹) por via *i.p.*, 30 minutos antes do registro da Latência de Transferência (LT₁); no dia seguinte cada grupo foi re-exposto ao labirinto para novo registro (LT₂). Cada coluna representa a latência de transferência média ± E.P.M. **p*<0.05 em relação à respectiva LT₁ (ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

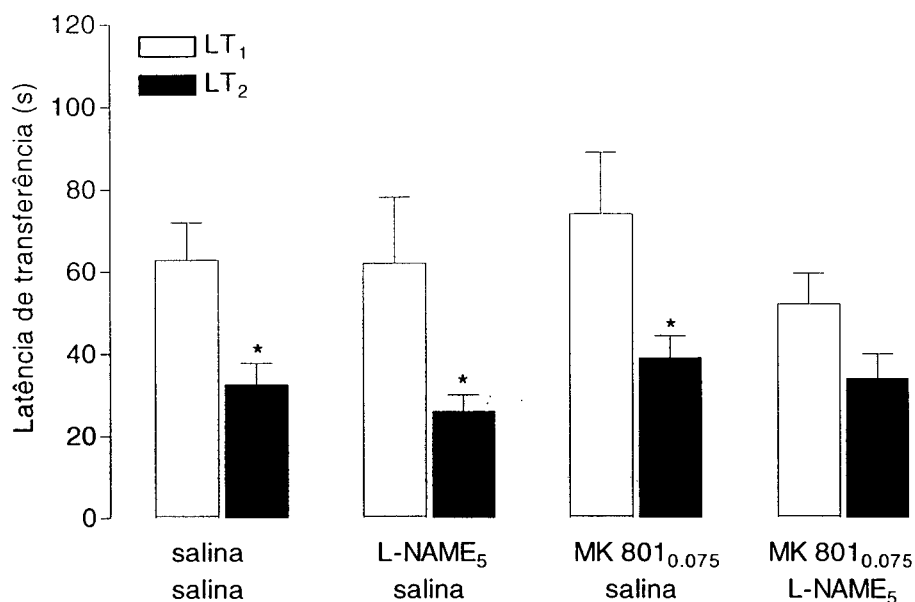


Figura 5. Efeito amnésico induzido pela co-administração de doses sub-efetivas de L-NAME e MK-801: no primeiro dia os animais receberam uma co-administração sistêmica de L-NAME₅+salina, MK-801_{0.075}+salina, L-NAME₅+MK-801_{0.075} ou salina+salina (grupo controle) e, após trinta minutos, tiveram a latência de transferência registrada (LT₁) no labirinto em cruz elevado. No dia seguinte os animais foram recolocados no labirinto para o registro da LT₂. Cada coluna representa a latência de transferência média ± E.P.M. * $p < 0.05$ em relação à respectiva LT₁ (ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

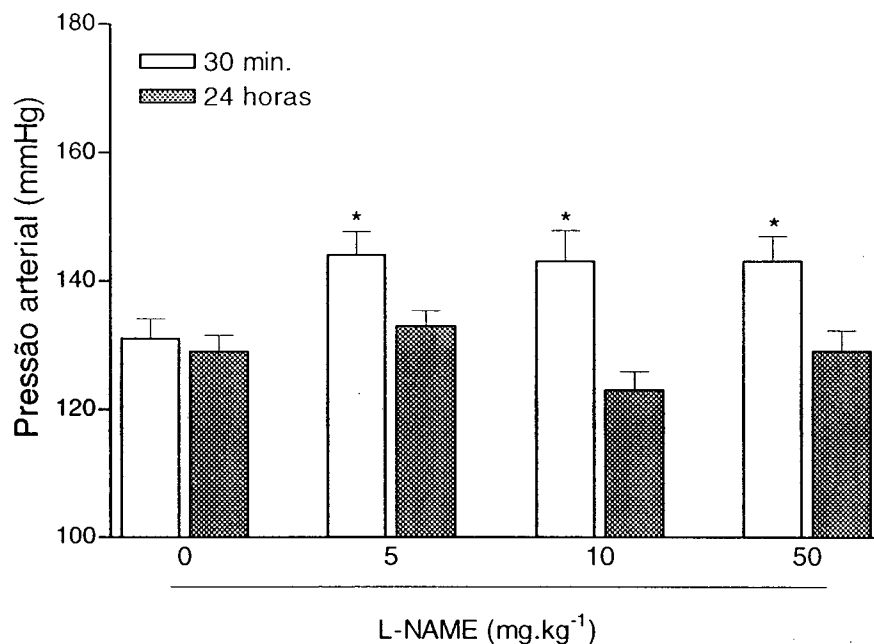


Figura 6. Pressão arterial em animais tratados com diferentes doses de L-NAME: os animais receberam salina (0.9%) ou L-NAME (5, 10, 50 mg.kg⁻¹) por via *i.p.* e tiveram a pressão arterial avaliada de forma indireta através da cauda, 30 minutos e 24 horas após a administração da droga. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado com salina (Two-Way ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

5. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos o labirinto em cruz elevado (LCE) tornou-se uma ferramenta muito utilizada no estudo da ansiedade em roedores, através da avaliação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas sobre o comportamento exploratório desses animais (Handiey e Mithani, 1984). O modelo foi reestruturado para permitir uma avaliação de aprendizagem espacial e memória em camundongos (Itoh et al., 1991).

O campo exploratório do animal no LCE é composto de áreas com diferentes graus de aversão e propriedades indutoras de medo (Bertoglio e Carobrez, 2000), especialmente os braços abertos (Pellow et al., 1985). Quando colocado no labirinto pela primeira vez na extremidade de um dos braços abertos, o animal inicia o reconhecimento do novo ambiente, o que culmina com seu primeiro contato com as áreas protegidas do labirinto, ou seja, os braços fechados. Sabendo-se que o animal discrimina e localiza as áreas protegidas e desprotegidas do labirinto, a memória emocional pode ser avaliada quando o animal é re-exposto ao braço aberto e exibe menor LT (Zangrossi e Graeff, 1997).

A capacidade de memorizar a configuração espacial do labirinto tem sido reconhecida e o encurtamento da LT na segunda exposição é usado como um indicador de aprendizagem e memória, enquanto que o prolongamento do tempo de LT indica prejuízo de aprendizagem ou amnésia (Itoh et al., 1990). Conhecendo-se que a resposta exigida do animal é motivada pelo medo, a LT representa um índice confiável de aprendizagem emocional no LCE (Itoh et al., 1991).

A escopolamina, usada no presente estudo como controle positivo, é um antagonista muscarínico que sabidamente prejudica processos de aprendizagem e de memória (McGaugh, 1973). Os resultados demonstraram que ratos tratados previamente com SCO, tal como camundongos (Itoh et al., 1990; Sharma e Kulkarni, 1992; Miyazaki et al., 1995; Hlinák e Krejčí, 2002b), exibiram déficit de aprendizagem da LT; desse modo, nosso resultado corrobora a literatura, mostrando que a ativação de receptores muscarínicos é importante para a aquisição da aprendizagem da LT em roedores.

A importância da síntese de NO na aprendizagem e na memória é amplamente suportada por diferentes grupos de pesquisa. A inibição da NOS por análogos da L-arginina é considerada um fator prejudicial à aprendizagem e memória em roedores (Huang, 1995), enquanto que a atividade da NOS está elevada imediatamente após a aprendizagem de esquiva inibitória (Bernabeu et al., 1995). Efeitos amnésicos ou prejudiciais à aprendizagem de esquiva inibitória têm sido demonstrados após a administração sistêmica de inibidores da NOS, seja no teste de *step-through* (Baratti e Kopf, 1996; Kopf e Baratti, 1996), seja no labirinto em T elevado (Calixto et al., 2001), um modelo animal de ansiedade (Graeff et al., 1998).

A administração de inibidores da NOS no hipocampo prejudica a esquiva inibitória no teste de *step-down* em roedores (Bernabeu et al., 1995; Fin et al., 1995; Huang e Lee, 1995; Quevedo et al., 1997), enquanto que a administração de drogas doadoras de NO facilitam a aquisição da esquiva no mesmo teste (Fin et al., 1995; Huang e Lee, 1995). Assim, o hipocampo parece ser uma região

importante, onde a síntese de NO é crítica para a aprendizagem de esQUIVA inibitória no teste de *step-down*.

Corroborando as evidências de que a síntese de NO é importante na aprendizagem, o presente estudo demonstrou que a administração pré-treino de L-NAME (50mg.kg^{-1}) prejudicou a aquisição da LT em ratos. Esse efeito foi observado somente em doses altas (50mg.kg^{-1}), sendo as doses inferiores inefetivas em induzir amnésia (5 e 10mg.kg^{-1}); o tratamento prévio com D-NAME (50mg.kg^{-1}) também não alterou a capacidade cognitiva dos animais; considerando que o L-NAME é um inibidor da enzima NOS, e seu isômero D-NAME é inerte, podemos supor que a síntese de NO é importante no estabelecimento de tal aprendizagem em ratos.

Maior evidência do possível papel mnemônico do NO na aprendizagem da LT deriva da reversão do efeito amnésico do L-NAME (50mg.kg^{-1}) pela co-administração de L-arginina (200mg.kg^{-1}), a molécula precursora da síntese de NO e que compete com L-NAME pela enzima NOS. Além do mais, o fato do tratamento com L-NAME (50mg.kg^{-1}) não alterar a LT_1 indica que a droga foi capaz de prejudicar seletivamente a aquisição da aprendizagem, sem alterar a atividade motora do animal. Reddy e Kulkarni (1998) obtiveram efeito amnésico semelhante em camundongos, ainda que com doses mais elevadas de L-NAME. Portanto, a síntese de NO parece ser importante na aquisição da LT em roedores.

No presente estudo a administração de diferentes doses de L-arginina (50, 100 e 200mg.kg⁻¹) não alterou a aprendizagem da LT. De forma similar, a administração de L-arginina (300 mg.kg⁻¹) não modificou a ambulação, a coordenação motora e a sensibilidade à dor de camundongos, ou seja, processos sensório-motores que poderiam interferir no processo de aprendizagem (Reddy e Kulkarni, 1998).

É preciso, entretanto, levar em consideração que um complexo tráfego de arginina e citrulina interórgãos garante o fornecimento constante de arginina ao cérebro (Wiesinger, 2001). A síntese de arginina a partir da ornitina é restrita ao fígado, intestino delgado e grosso, sendo notavelmente ausente em células do sistema nervoso. O fígado e os intestinos são tecidos capazes de utilizar ornitina para produção de citrulina, funcionando como fornecedores dela a circulação; a citrulina é, então, convertida em arginina, especialmente nos rins, retornando então à circulação para suprir outros órgãos (Wiesinger, 2001).

No sistema nervoso central, a arginina pode ser sintetizada e estocada em astrócitos, os quais poderiam funcionar como local de armazenamento de arginina para posterior fornecimento às outras células neurais. Desse modo, os astrócitos podem ajudar na manutenção da disponibilidade de arginina para a síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central (Wiesinger, 2001). Nesse sentido, tem sido proposto que uma cooperação intercelular na captação, na síntese, no armazenamento e na liberação de arginina, ou seus metabólitos, é obrigatória para uma síntese *de novo* de óxido nítrico no sistema nervoso central. É possível supor que a disponibilidade de arginina, e, portanto, de substrato, não represente a etapa limitante na síntese de óxido nítrico no sistema

nervoso central, não sendo, assim, afetada por níveis mais elevados induzidos pela administração i.p. de L-arginina.

O presente estudo demonstrou que a ocorrência de hipertensão não altera a capacidade cognitiva dos animais porque, se as doses utilizadas no presente estudo foram eficazes em induzir o mesmo nível de hipertensão no momento da aquisição da LT, apenas ratos tratados com L-NAME na dose mais elevada (50mg.kg^{-1}) exibiram prejuízo de aprendizagem. Os grupos tratados com L-NAME nas doses de 5 e 10mg.kg^{-1} exibiram aquisição da LT, ainda que hipertensos. Não foi possível prever o efeito da hipertensão sobre a evocação de memória porque, durante o registro da LT_2 , todos os grupos tratados com L-NAME estavam normotensos. Ainda que o presente estudo não tenha avaliado a atividade da NOS no sistema nervoso central, os resultados sugerem que o efeito amnésico induzido pelo tratamento com L-NAME (50mg.kg^{-1}) seja decorrente, não do quadro hipertensivo induzido pela ação periférica da droga, mas, sim, à inibição da síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central.

Existem evidências crescentes de que o glutamato no SNC de mamíferos também contribui para a função cognitiva (Morris, 1989; Hlinák e Krejčí, 1998); a indução da LTP no hipocampo (estrutura considerada como a base neural da formação da memória) depende da ativação de receptores do tipo NMDA (Morris, 1986); a administração de MK-801, antagonista NMDA, induz prejuízo de aquisição (Itoh et al., 1991; Sharma e Kulkarni, 1992; Hlinák e Krejčí, 2002a) e retenção (Hlinák e Krejčí, 1998; Hlinák e Krejčí, 2000) da LT em camundongos.

Os resultados do presente estudo também reforçam o papel dos receptores NMDA na aquisição da LT desde que a administração prévia de MK-801 (0.15mg.kg^{-1}) induziu um efeito amnésico. Além disso, os resultados sugerem uma estreita relação entre a síntese de NO e a ativação dos receptores NMDA na aprendizagem da LT, visto que a co-administração de doses sub-efetivas de MK-801 (0.075mg.kg^{-1}) e L-NAME (5mg.kg^{-1}) induziram amnésia no teste da LT. Similarmente, também tem sido demonstrado que o efeito nootrópico de neuroesteróides pode envolver a síntese de NO, como sistema de amplificação de sinal dos receptores NMDA (Reddy e Kulkarni, 1998).

Tem sido proposto que uma vez sintetizado, o NO pode se difundir para fora do neurônio e atuar em células vizinhas, servindo como mensageiro na modulação sináptica, seja na LTP, seja na regulação de neurotransmissores, tais como noradrenalina, dopamina e serotonina (Kiss, 2000), que possuem um amplo papel na regulação de comportamento e cognição (Bohme, 1993). Por outro lado, a administração de L-NAME ou outros inibidores da NOS parece ser ansiolítica em modelos animais de ansiedade (Volke et al., 1995; Faria et al., 1997; Volke et al., 1997; Calixto et al., 2001). A síntese de NO na região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal de ratos parece ser também importante na modulação de reações de defesa (De Oliveira et al., 2001). Além disso, a produção de NO pode ser importante na mediação do efeito ansiogênico induzido pela administração intracerebroventricular (*i.c.v.*) de substância P em camundongos (Baretta et al., 2001).

Como visto anteriormente, a síntese de NO é importante na aprendizagem em vários paradigmas experimentais que utilizam estímulos aversivos (seja um choque elétrico, seja espaços abertos e elevados) como fonte de motivação da aprendizagem. Assim, é possível assumir que, pelo menos nesses estudos, a aprendizagem foi induzida pelo medo e implica a síntese de NO como fator importante na aprendizagem emocional em roedores.

Se a síntese de NO é importante na aprendizagem emocional, então o controle endógeno de sua síntese pode modular esse tipo de aprendizagem ou ainda o nível de medo/ansiedade dos animais. Nesse sentido, a agmatina, formada a partir da arginina, através de uma via metabólica alternativa, parece exercer um efeito inibitório sobre a enzima NOS e, conseqüentemente, a síntese de NO pode ser modulada pelo metabolismo da própria arginina. Por outro lado, a agmatina pode igualmente modular a ação do glutamato nos receptores NMDA (Yang e Reis, 1999). Assim, a síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central parece depender de um complexo padrão de regulação de todas as isoformas de NOS, envolvendo a oferta de arginina como substrato para as enzimas e produtos de metabolização da arginina, tal como a agmatina que inibe a atividade NOS e, conseqüentemente a síntese de NO.

6. CONCLUSÕES:

1. A administração de L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) prejudica a aprendizagem da latência de transferência em ratos no LCE.
2. O efeito amnésico induzido pelo L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) pode ser atribuído à inibição da síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central, visto que pode ser revertido pela co-administração de L-arginina ($200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Além disso, o tratamento prévio com D-NAME foi inefetivo em alterar a cognição dos animais.
3. A administração prévia de L-arginina ($50, 100$ e $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) não altera a aquisição da latência de transferência em ratos.
4. O efeito amnésico induzido pelo L-NAME ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) supostamente não é decorrente de uma ação periférica da droga, tal como hipertensão, visto que os grupos tratados com doses menores de L-NAME aprenderam a LT, ainda que hipertensos.
5. A ativação de receptores do tipo muscarínico e NMDA é importante para a aprendizagem da latência de transferência em ratos, porque a administração prévia de antagonistas (escopolamina, $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e MK-801, $0.15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) de tais receptores prejudica o processo de aquisição da referida aprendizagem.

6. Existe a possibilidade de uma interação entre a síntese de óxido nítrico e a ativação de receptores NMDA durante a aquisição da latência de transferência em ratos, visto que a co-administração de doses sub-efetivas de L-NAME ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e MK-801 ($0.075\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) produziram amnésia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; WATANABE, Y.; SAYTO, H. Differential role of nitric oxide in long-term potentiation in the medial and lateral amygdala. *Eur. J. Pharmacol.*, 297: 43-46, 1996.

AGNATI L.F.; ZOLI, M.; STROMBERG, I.; FUXE, K. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neurosci.*, 69: 711- 726, 1995.

ARANCIO, O.; KIEBLER, M.; LEE, C.J.; LEV-RAM, V.; TSIEN, R.Y.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell.*, 87: 1025-1035, 1996.

BARA, D.E.; FERRIS C.D.; SNYDER, S.H. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci.*, 24: 99- 106, 2001.

BARATTI, C.M.; KOPF, S.R. A nitric oxide synthase impairs memory storage in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 65: 197-201, 1996.

BARETTA, I.P.; ASSREUY, J.; DE LIMA, T.C.M. Nitric oxide involvement in the Anxiogenic-like effect of substance P. *Behav. Brain Res.* 121: 199-205, 2001.

BAUDRY, M. Synaptic Plasticity and Learning and Memory: 15 Years of Prog. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 70: 113-118, 1998.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências: Desvendando o sistema nervoso. *Artmed.* 2ª edição. 724, 740, 2002.

BERNABEU, R.; DE STEIN, M.L.; FIN, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport.*, 6: 1498-1500, 1995.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.*, 108: 197-203, 2000.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann. Rev. Psychol.* 39: 43-68, 1988.

BOHME, G.A.; BON, C.; LEMAIRE, M.; REIBAUD, M.; PIOT, O.; STUTZMANN, J.M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9191-9194, 1993.

BON, C.; BÖHME, G.A.; DOBLE, A.; STUTZMAN, J.M.; Blanchard, J.C. A role for nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.*, 4: 420-424, 1992.

BUNIN, M.A.; WIGHTMAN, R.M. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci.*, 22: 377-382, 1999.

BOXALL, A. R.; GARTHWAITE, J. Long-term depression in rat cerebellum requires both NO synthase and NO-sensitive guanylyl cyclase. *Eur. J. Neurosci.*, 8: 2209-2212, 1996.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci.*, 21: 294-299, 1998.

CALABRESI, P.; GUBELLINI, P.; CENTONZE, D.; SANCESARIO, G.; MORELLO, M.; GIORGI, M.; PISAN, A.; BERNARDI, G. A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J. Neurosci.* 19: 2489-2499, 1999.

CALIXTO, A.V.; VANDRESEN, N.; DE NUCCI, G.; MORENO JR, H.; FARIA, M.S. Nitric Oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.*, 55: 37-42, 2001.

CRAIG, H.B.; GIUSTETTO M.; HUANG, Y-Y; HAWKINS, R.D. ; KANDEL, E. R. Is Heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian Plasticity and Memory? *Nature reviews-neuroscience (Vol.I)*: 11-20, 2000.

DE OLIVEIRA, R.M.W.; 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. Biobehav. Rev.* 25: 679-685, 2001.

DOYLE, C.; HÖLSCHER, C.; ROWAN, M.J.; ANWYL, R. The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitroindazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. *J. Neurosci.*, 16: 418-424, 1996.

FARIA, M.S. Papel do Oxido Nítrico em um modelo animal de Ansiedade. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Campinas-UNICAMP, para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia, Campinas, 1998.

FARIA, M.S.; MUSCARA, M.N.; MORENO, H.JR.; TEIXEIRA, S.A.; DIAS, H. B.; GRAEFF, F.G.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway induces anxiolysis in the elevated plus maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, 323: 91-94, 1997.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 743-760, 1999.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H.; SANDERS, J.F; MABBUTT, P.S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacol.*, 113: 543-546, 1994.

FIN, C.; DA CUNHA, C.; BROMBERG, E.; SCHIMITZ, P. K.; BIANCHIN, M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory process. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 63: 113-115, 1995.

FRUSSA-FILHO, R.; OTOBONI, J.R.; UEMA, F.T.; SÁ-ROCHA L.C. Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze effects of age and isolation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24: 725-728, 1991.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 336: 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 14: 60-67, 1991.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: *Handbook of anxiety, The neurobiology of anxiety*, ed. G.D. Burrows, M. Routh e R. Noyes, pp 307-354, Elsevier, Amsterdam, 1990.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 811-829, 1994.

GRAEFF, F.G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 237-246, 1998.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos, P. 135-177, 1999.

HALEY, J.E.; MALEN, P.L.; CHAPMAN, P.F. Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperatures in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 160: 85-88, 1993.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of α 2-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear- motivated behavior. *N. S. Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1984.

HEBB, D.O. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Wiley, New York., 1949.

HLINÁK, Z.; KREJČÍ, I. Concurrent administration of subeffective doses of scopolamine and MK-801 produces a short-term amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav. Brain Res.*, 91: 83-89, 1998.

_____ Oxiracetam prevents the MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav. Brain Res.*, 117: 147-151, 2000.

_____ MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav. Brain Res.*, 131: 221-225, 2002a.

_____ Oxiracetam prevented the scopolamine but not the diazepam induced memory deficits in mice. *Behav. Brain Res.*, 133: 395-399, 2002b.

HÖLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 20: 298-303, 1997.

HUANG, A.M.; LEE, E.H., Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 50: 327-332, 1995.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 9265-9269, 1987.

ITOH, J.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology*, 101: 27-33; 1990.

ITOH, J.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 194: 71-76, 1991.

IZQUIERDO, I. Mechanism of the amnesic action of scopolamine. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10: 175-177, 1989.

_____ Endogenous systems that modulate the acquisition, consolidation, post-hoc addition of information, and retrieval of memories. In: Morato S, Carobrez A.P e Lima T.C.M (eds.), *Neurosciences and Behavior -2*. Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, pp 21-30, 1990.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA-A receptor modulation of memory: The role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12: 260-265, 1991.

IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. *Neuroscience*, 18: 1-11, 1992.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amígdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behav. Neural Biol.*, 58: 16-26, 1992 a.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; JERUSALINSKY, D.; DA CUNHA, C. Post - training memory processing in amígdala, septum and hippocampus: Role of benzodiazepines/GABA-A receptors and their interaction with other neurotransmitter systems. *Rev. Neurosci.*, 3: 11-23, 1992 b.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; BIANCHIN, M.; WALZ, R.R; ZANATTA, M.S.; DA SILVA, R.C.; E SILVA, M.B.E.; RUSCHEL, A.C.; PACZKO, N. Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems. *Behav. Brain Res.*, 58: 91-98, 1993.

JOLY, G.; SCHINI, V.B.; VANHOUTE, P.M. Ballon injury and interleukin-1 β induce nitric oxide synthase activity in rat carotid arteries. *Circulation Res.*, 71: 331-338, 1992.

KANDEL, E.R.; TAUC, L. Heterossinaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J. Physiol.*, 181: 1-27, 1965 a.

KANDEL, E.R.; TAUC, L. Mechanism of heterossinaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J. Physiol.*, 181: 28-47, 1965 b.

KISS, J.P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res. Bull.*, 52: 459-466, 2000.

KISS, J.P.; VIZI, E.S. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci.*, 24: 211-215, 2001.

KOPF, S.R.; BARATTI, C.M. Enhancement of the post- training cholinergic tone antagonizes the impairment of retention induced by a nitric oxide synthase inhibitor in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 65: 207-212, 1996.

KUMAR, S.; KULKARNI, S.K. Influence of antidepressant drugs on learning and memory paradigms in mice. *Indian J. Exp. Biol.*, 34: 431-435, 1996.

LANCASTER, J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1: 18-30, 1997.

LeDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol. Psychiat.*, 44: 1229-1238, 1998.

MACKERNAN, M.G.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*, 390: 607-611, 1997.

MALENKA, R.C.; NICOLL, R.A. Long-term potentiation -a decade of progress. *Science*, 17: 1870- 1874, 1999.

MAREN, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci.*, 22: 561-567, 1999.

MAYFORD, M.; BACH, M.E.; HUANG, Y.Y.; WANG, L.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, 274: 1678-83, 1996.

MCGAUGH, J.L. Drug facilitation of learning and memory. *Ann. Rev. Pharmacol.* 13: 229-241, 1973.

MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory process. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 63: 113-115, 1995.

MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M.; MACHIDA, H. The effects of anxiolytics and anxiogenics on evaluation of learning and memory in an elevated plus-maze test in mice. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 17: 121-127, 1995.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260, 1955.

MOORE, P.K.; HANDY, R.L.C. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase - is no NO really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol. Sci.*, 18: 204-211, 1997.

MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP-5. *Nature*, 319: 774-776, 1986.

MORRIS, R.G.M. Synaptic plasticity and Learning: Selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP-5. *J. Neurosci.*, 9: 3040- 3057, 1989.

MORRIS, R.G.M. The role of NMDA receptors in certain kinds of learning and memory. In L. R. Squire and E. Lindenlaub (Eds.), *The Biology of Memory*, Schattauer, Stuttgart, pp. 299-316, 1990.

PAPA, M.; PELLICANO, M.P.; SADILE, A.G. Nitric oxide and long-term habituation to novelty in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, 738, 316-324, 1994.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, 14: 149-167, 1985.

PESOLD, C.; TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.*, 671: 213-221, 1995.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.*, 64: 51- 68, 2001.

QUEVEDO, J.; VIANNA, M.; ZANATTA, M.S.; ROESLER, R.; JERUSALINSKY, D.; QUILIFELDT, J.A. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav. Pharmacol.*, 8: 713-717, 1997.

RAMÓN Y CAJAL. S. La fine structure des centres nerveux. *Proc. R. Soc. Lond.*, 55: 444-468, 1894.

REDDY, S.D.; KULKARNI, S.K. Possible role of nitric oxide in the nootropic and anti-amnesic effects of neurosteroids on aging- and dizolcipine- induced learning impairment. *Brain Res.* 799: 215-229, 1998.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.*, 20: 298-303, 1992.

ROBINSON JR, G.S.; CROOKS JR, G.B.; SHINKMAN, P.G.; GALLAGHER, M. Behavioural effects of MK-801 mimic deficits associated with hippocampal damage. *Psychobiol.*, 17: 156-164, 1989.

ROGAN, M.T.; STAUBLI, U.V.; LEDOUX, J.E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390: 604-7, 1997.

SCHINI-KERTH, V.B.; VANHOUTTE, P.M. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp. Physiol.*, 80: 885-905, 1995.

SCHUMAN, E.M.; MADISON, D.V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 254: 1503-1506, 1991.

SHARMA, A.C.; KULKARNI, S.K. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 16: 117-125, 1992.

SON, H.; HAWKINS, R.D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P.L.; FISHMAN, M.C.; KANDEL, E.R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*, 87: 1015- 1023, 1996.

SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in the rat brain. *Neuropharmacol.*, 32: 1267-1277, 1993.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 463-469, 1993.

VIZI, E.S.; KISS, J.P. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus.*, 8: 566-607, 1998.

VOLKE, V.; KÖKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J.; MÄNNISTÖ, P.T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, 6: 1413-1416, 1995.

VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KÖKS, S.; BOURIN, M.; MÄNNISTÖ, P.T.; VASAR, E. 7-nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacol.*, 131: 399-405, 1997.

WAKATSUKI, H.; GOMI, H.; KUDOH, M.; KIMURA, S.; TAKAHASHI, K.; TAKEDA, M.; SHIBUKI, K. Layer-specific NO dependence of long-term potentiation and biased NO release in layer V in the rat auditory cortex. *J. Physiol. Lond.*, 513: 71-81, 1998.

WALKER, D.L.; GOLD, P.E. Effects of the novel NMDA antagonist, NPC12626, on long-term potentiation, learning and memory. *Brain Res.*, 549: 213-221, 1991.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 64: 365-391, 2001.

YANG, X.C.; REIS, D.J. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288: 544-549, 1999.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEEF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res. Bull.*, 44: 1-5, 1997.

ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Animal Sci.*, 40: 198-201, 1990.

ZHANG, S.; CHEN, J.; WANG, S. Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Res.*, 801: 101-106, 1998.