

**ANA VALQUÍRIA CALIXTO**

**ÓXIDO NÍTRICO E COMPORTAMENTO AVERSIVO:  
ESTUDO DO SUBSTRATO NEURAL**

**Florianópolis - Santa Catarina  
Dezembro de 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ÓXIDO NÍTRICO E COMPORTAMENTO AVERSIVO:  
ESTUDO DO SUBSTRATO NEURAL**

**Ana Valquíria Calixto**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas (UFSC), como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

**Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima**

**Florianópolis - Santa Catarina**  
**Dezembro de 2008**

## AGRADECIMENTOS

A Professora **Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima** pelo apoio, orientação, por ter me recebido em seu laboratório e ter contribuído para minha formação profissional.

Ao Professor **Dr. Moacir Serralvo Faria** pela amizade, pela orientação e aprimoramento do trabalho com o seu conhecimento.

A todos os professores do departamento de farmacologia da UFSC pelos conhecimentos transmitidos que tanto auxiliaram na minha formação.

Aos Professores membros da banca examinadora do doutorado, **Roberto Andreatini, Cilene Lino de Oliveira, Jamil Assreuy, Leandro Bertoglio, Rui Prediger**, pela atenção e sugestões para aprimoramento deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório **Filipe Silveira Duarte, Marcelo Duzzioni, Cristiane Felisbino e Rebeca Marques de Carvalho** pelo apoio, compreensão e ajuda para realização deste trabalho.

Aos Professores **Jamil Assreuy** e **João Bastista Calixto** pelo fornecimento das drogas utilizadas neste trabalho.

A **Fernanda** pela realização da técnica de *Westernblot*.

Aos funcionários do Biotério Central e Setorial pelo fornecimento dos animais.

A minha amada família **Mauri, Luiza e Lucas** (que nasce em março 2009) razão da minha vida.

Aos animais que participaram com sua vida para realização dos experimentos.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

## RESUMO

As vias L-arginina/óxido nítrico (NO) estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e envolvidas na modulação da ansiedade. O labirinto em T elevado (LTE) é um teste animal validado farmacologicamente para o estudo da ansiedade experimental em ratos, onde o comportamento de esquiva inibitória (Esq) e o de fuga representam o medo condicionado e inato, respectivamente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS), nos comportamentos de Esq e fuga em ratos avaliados no LTE, após sua micro-injeção em diferentes estruturas cerebrais relacionadas ao comportamento defensivo. Além disso, investigamos se a via L-arginina/NO/cGMP do hipocampo ventral (HPCV) está envolvida na modulação da ansiedade em ratos avaliados no LTE, usando diferentes drogas com ação nesta via tais como L-NAME e 7-NI (inibidor preferencial da nNOS), azul de metileno, um inibidor não seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, e SNP, um doador de óxido nítrico. O tratamento central com L-NAME (50-800 nmol) não alterou os comportamentos de Esq e fuga. No entanto, a injeção de L-NAME (200 nmol) no ventrículo lateral (VL), amígdala basolateral (ABL), substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl), núcleo do septo lateral (NSL), mas não no núcleo do leito da estria terminal (NLET), prejudicou a Esq em comparação ao grupo controle. No HPCV, L-NAME (200 nmol) e 7-NI (10-20 nmol) inibiram o comportamento de Esq. SNP 80 nmol aumentou a Esq sem modificar a fuga, e o pré-tratamento com azul de metileno (10 nmol) bloqueou os efeitos promovidos pelo SNP. Nossos resultados sugerem que o NO está envolvido na modulação do medo condicionado no LTE via ABL, SCPdl e NNSL, mas o NLET parece não estar envolvido nestas respostas. Além disso, o NO, via HPCV, parece estar envolvido na elaboração de respostas aversivas compatível com a idéia de que a via NO/cGMP exerce uma função importante em reações defensivas de ratos avaliados no teste do LTE.

## ABSTRACT

The L-arginine/nitric oxide (NO) pathways are widely distributed in the central nervous system (CNS) and have been implicated in the modulation of anxiety. The elevated T-maze (ETM) is an animal test pharmacologically validated for the study of experimental anxiety in rats, and designed to evaluate inhibitory avoidance (AVOID) learning and one-way escape (ESC) from open arms, thought to represent learned (conditioned) and innate (unconditioned) fear, respectively. The aim of the present study was to evaluate the effect of prior treatment with the N $\omega$ -nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME), a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase enzyme (nNOS), on both AVOID and ESC behavior of rats in the ETM, when applied to different cerebral regions associated with defensive behaviors. Moreover, we investigated if the ventral hippocampal (VH) L-arginine/NO/cGMP pathway is involved in the modulation of anxiety in rats evaluated in the ETM using drugs with distinct spectral actions on the L-Arg/NO/cGMP pathway as L-NAME and 7-NI (preferential nNOS inhibitor), methylene blue (MB), a non-selective inhibitor of soluble guanylate cyclase enzyme, and SNP, a NO donor. Central treatment with L-NAME (50-800 nmol) did not impair the AVOID response through the trials and had no effect on the ESC behavior. Nevertheless, animals treated with L-NAME (200 nmol) into the lateral ventricle (LV), basolateral amygdala (BLA), dorsolateral periaqueductal gray matter (dIPAG), lateral septal nucleus (LSN), but not in the bed nucleus of *stria terminalis* (BNST), displayed impaired AVOID2 in comparison to the control group. In the VH, L-NAME (200 nmol) and 7-NI inhibited the AVOID (at doses 10 or 20 nmol) and ESC (at dose 20 nmol). SNP 80 nmol increased AVOID without modifies the ESC and the pre-treatment with MB 10 nmol blocked the effects promoted by SNP. Our results suggest that NO may underlie learned fear in the ETM via BLA, dIPAG and LSN, but not BNST. Moreover, NO may underlie learned fear via VH, compatible with the idea that NO/cGMP pathway exerts a positive modulatory role on defensive reactions in rats evaluated in the ETM.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABI - Amígdala basolateral**

**ABm - Amígdala basomedial**

**AL - Amígdala lateral**

**AM - Azul de metileno**

**ANOVA - Análise de Variância**

**DMSO - Dimetilsulfóxido**

**EDRF - Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês *-endothelium-derived relaxing factor*)**

**Esq1 - Esquiva 1**

**Esq2 - Esquiva 2**

**EPM - Erro padrão da média**

**GC - Guanilato-ciclase**

**GKc - Proteínas-quinases cíclica**

**GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina ( do inglês guanosina 3':5'-monofosfato cíclico)**

**GTP - Guanosina trifosfato**

**HPC - Hipocampo**

**HPCv - Hipocampo ventral**

**HPCd - Hipocampo dorsal**

**i.c.v .- intracerebroventricular**

**i.p. - Intraperitoneal**

**LB - Linha de base**

**LCE - Labirinto em Cruz Elevado**

**L-NAME - L-N-nitro-L-arginina-metil-ester**

**L-NOARG - N<sub>ω</sub>-nitro-L-arginina**

**LTE - Labirinto em T elevado**

**mtNOS - Sintase do óxido nítrico mitocondrial**

**NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma Reduzida**

**7-NI - 7-nitroindazol**

**NLET - Núcleo do leito da estria terminal**

**NO - Óxido Nítrico**

**NOS** - Sintase do óxido nítrico

**eNOS** - Sintase do óxido nítrico endotelial

**iNOS** - Sintase do óxido nítrico induzida

**nNOS** - Sintase do óxido nítrico neuronal

**NNSL** - Núcleo do Septo lateral

**PBS** - Salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

**SCP** - Substância cinzenta periaquedutal

**SCPd** - Substância cinzenta periaquedutal dorsal

**SCPdl** - Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

**SNC** - Sistema nervoso central

**SIN-1** - 3-morfolinossindnonimina

**SNP** - Nitroprussiato de sódio

**VL** - Ventrículo lateral

**WT** - *Wild-type*

**1400W** - *N*-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine]

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do ventrículo lateral de ratos	23
<b>Figura 2</b> - Efeito da administração de L-NAME em um dos ventrículos laterais (VL) de ratos avaliados no Labirinto em T Elevado. A) Linha de base (LB), Esquiva 1 (Esq1), Esquiva 2 (Esq2) avaliadas com intervalo de 30 seg. B) Fuga.	24
<b>Figura 3</b> - Desenho esquemático de um corte coronal na altura da amígdala basolateral de ratos.	25
<b>Figura 4</b> - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do núcleo do leito da estria terminal de ratos.	26
<b>Figura 5</b> - Desenho esquemático de um corte coronal na altura da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos.	27
<b>Figura 6</b> - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do septo lateral de ratos.	28
<b>Figura 7</b> - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do hipocampo ventral de ratos.	29
<b>Figura 8</b> - Efeito da injeção de L-NAME no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LTE. (A) comportamento de esquiva inibitória. (B) comportamento de Fuga.	32
<b>Figura 9</b> - Efeito da injeção de 7-NI no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LTE. (A) comportamento de esquiva inibitória. (B) comportamento de Fuga	34
<b>Figura 10</b> - Efeito da injeção de azul de metileno (MB, 10 nmol) e SNP (80 nmol) no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LTE. (A) comportamento de esquiva inibitória. (B) comportamento de Fuga	36



**LISTA DE TABELAS****Página**

<b>Tabela 1</b> - Efeito da injeção de L-NAME (50 ou 200 nmol) em diferentes estruturas cerebrais aversivo em ratos, avaliados no teste do labirinto em T elevado	30
<b>Tabela 2</b> -. Efeito da injeção de ODQ 50 nmol, AM (10 ou 30nmol) e SNP (20 e 80) nmol no Hipocampo Ventral de ratos, avaliados no teste do labirinto em T elevado	Apêndice
<b>Tabela 5</b> - Efeito da injeção central de L-NAME 200nmol e SNP (20 ou 80 nmol) em camundongos, avaliados no teste do labirinto em T elevado	Apêndice

<b>SUMÁRIO</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Óxido Nítrico	1
1.2	Óxido nítrico e sistema nervoso central	3
1.3	Óxido nítrico e comportamento aversivo	5
1.4	Óxido nítrico e comportamento aversivo - estudo do substrato neural	9
1.5	Hipocampo e comportamento aversivo	11
1.6	Avaliação experimental do medo e da ansiedade	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b>	<b>17</b>
3.1	Animais.	17
3.2	Cirurgia Estereotáxica	17
3.3	Drogas	18
3.4	Labirinto em T elevado	19
3.5	Labirinto em T elevado (LTE) – Procedimento Experimental	19
3.6	Procedimento de administração central da drogas	20
3.7	Perfusão e Histologia	21
3.8	Análise Estatística	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>23</b>
4.1	Experimento 1 <i>Curva</i> dose resposta ao L-NAME no ventrículo(VL)	
4.2	Experimento 2. Estudo de regiões específicas do comportamento defensivo	25
4.3	Experimento 3. Curva dose resposta de L-NAME no hipocampo ventral	
4.4	Experimento 4. Participação da via NO/GMPc	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Óxido Nítrico

O papel do óxido nítrico (NO) como um mensageiro biológico surgiu na década de 80, com Furchgott e Zawadzki (1980). Estes autores mostraram que o relaxamento do músculo liso vascular induzido pela acetilcolina era dependente do endotélio. Estudos adicionais mostraram que o endotélio poderia induzir relaxamento vascular através da produção de um fator lábil, capaz de se difundir para o músculo liso vascular e levar ao relaxamento. Esse fator foi então denominado “fator de relaxamento derivado do endotélio” (EDRF; *endothelium-derived relaxing factor*; Furchgott e Zawadzki, 1980). Alguns anos após a descoberta do EDRF, que possuía as mesmas características biológicas e químicas do NO, se descobriu que se tratava da mesma molécula (Ignarro e cols., 1987; Palmer e cols., 1987).

No músculo liso, o NO é capaz de induzir elevação no nível do monofosfato cíclico de guanosina (guanósina 3':5'-monofosfato cíclico GMPc) que, por sua vez, estimula quinases GMPc-dependentes, as quais são responsáveis pelo relaxamento muscular, ainda que uma diminuição no nível de cálcio intracelular induzido por GMPc também possa contribuir para tal relaxamento (Rashatwar e cols., 1987). Após sua descoberta no sistema vascular, a pesquisa acerca dos efeitos do NO ganhou ainda mais força e a sua produção foi comprovada em vários tecidos (Moncada e Higgs, 1995). Atualmente, a via da L-arginina / NO representa um alvo importante na sinalização inter e intracelular, estando implicada no controle de uma imensa variedade de funções fisiológicas (para revisão veja Zhang e Snyder, 1994; Moncada et al., 1991; Seddon et al., 2008) e patológicas (Kröncke et al., 1997; Oosthuizen et al., 2005; Aquilano et al., 2008; Chen et al., 2008).

O NO é uma molécula gasosa altamente hidrofóbica e relativamente reativa, sendo, portanto, facilmente difusível através de membranas biológicas. Sua instabilidade química decorre da presença de um par de elétrons não-pareados em sua órbita externa (Katayama, 1995). O NO é, portanto, um radical livre, sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por um processo oxidativo do nitrogênio do grupo guanidino terminal (Palmar, 1988). Essa reação é catalisada por diferentes isoformas de um grupo de enzimas, denominadas de sintases do NO ou *NO sintases* (NOS). As NOS catalisam a conversão de L-arginina em L-citrulina, produzindo NO como co-produto (Garthwaite, 1991). O NO sintetizado se difunde e, em células adjacentes, liga-se ao grupamento heme da enzima guanilato-ciclase (GC), que converte guanosina trifosfato (GTP) em GMPc (Snyder e Bredt, 1991). Como o NO é muito lábil (meia-vida de 15 s), muitos estudos têm manipulado os níveis de NO indiretamente, via manipulação de suas enzimas de síntese, as NOS.

Várias isoformas de NOS já foram clonadas em tecidos cerebrais (Bredt et al., 1991) e no endotélio vascular (Lammas et al., 1992). Além disso, macrófagos (Lowenstein et al., 1992), hepatócitos (Geller et al., 1993) e uma ampla variedade de tecidos, tais como coração, pulmão e baço, também exibem atividade NOS, mostrando, assim a grande importância fisiológica dessa via metabólica.

Estudos de biologia molecular revelaram a existência de três isoformas de NOS com grau de homologia em torno de 60% com algumas enzimas do complexo citocromo P-450 redutase. Duas destas enzimas são expressas constitutivamente, a isoforma neuronal (nNOS, NOS-1 ou tipo I) identificada em neurônios e musculatura esquelética, e a isoforma endotelial (e-NOS, NOS-3 ou tipo III) identificada em células endoteliais bovinas (Förstermann e Kleinert, 1995). Ambas as isoformas são dependentes de cálcio-calmodulina e estão envolvidas na sinalização celular. A

terceira isoforma, denominada NOS induzida (iNOS ou tipo II), foi descrita originalmente em macrófagos e, diferentemente das constitutivas, só é expressa após estimulação das células (Hecker et al., 1999). As enzimas constitutivas NOS-1 e NOS-3 produzem e liberam NO em quantidades nanomolar por curto período de tempo (segundos e minutos), em resposta à interação de agonistas, tais como acetilcolina, bradicinina e histamina, com seus respectivos receptores. A NOS-2 é cálcio-calmodulina independente, produz e libera grandes quantidades de NO (na ordem de micromolar), tendo sua expressão modulada em processos inflamatórios ou fisiopatológicos (Nathan et al., 1992; Hibbs et al., 1988; Marletta, 1994).

Giulivi e colaboradores (1998), assim como Tatoyan e Giulivi (1998) apontaram evidências da existência de uma NOS funcional nas mitocôndrias (mtNOS). A atividade da mtNOS foi observada no fígado de camundongos (Ghafourifar e Richter, 1997) e em cérebro de ratos (Lores- Arnáiz et al., 2003). Esta enzima, associada à membrana interna mitocondrial, é ativada constitutivamente, sendo dependente de cálcio. Exerce um controle importante na respiração mitocondrial e no metabolismo celular do oxigênio (Poderoso et al., 1999). Porém, não há certeza se a mtNOS é uma nova enzima ou se, por falta de um anticorpo específico, é uma das NOS já conhecidas (nNOS, eNOS ou iNOS) sendo expressa nas mitocôndrias, o que aponta para a necessidade de mais estudos para esclarecer este fato (Brookes, 2003).

## **1.2 Óxido nítrico e sistema nervoso central**

No sistema nervoso central (SNC), a participação do NO como neurotransmissor/neuromodulador foi inicialmente proposta por Garthwaite e colaboradores (1988) e confirmada por Snyder e Bredt (1991). A isoforma nNOS está bem caracterizada (Snyder e Bredt, 1991). Sua atividade depende da presença de

cálcio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH), e agonistas do receptor NMDA, por exemplo, ativam a enzima nNOS por promoverem um aumento do cálcio citosólico (Mayer e Miller, 1990; Vincent, 1994). O NO é um neurotransmissor multifuncional no SNC, que leva informações tanto anterógrada quanto retrogradamente. Muitos de seus efeitos são mediados pelo GMPc e a cascata de sinais NO / GMPc / GKc (proteínas-quinases dependentes de GMPc) está relacionada à modulação da liberação de neurotransmissores e à plasticidade sináptica (Feil e Kleppisch, 2008).

Neurônios contendo nNOS estão localizados em todo o cérebro. O NO tem sido implicado na regulação de uma grande variedade de comportamentos como agressão, ansiedade, depressão e cognição (Wultsch et al., 2007). Uma alta densidade de células positivas para nNOS está localizada no sistema límbico, particularmente no núcleo do septo lateral (NSL), no hipotálamo posterior, córtex entorrinal e amígdala, onde participa regulando o comportamento emocional e a agressividade (Albert e Walsh, 1984; Vincent e Kimura, 1992; Nelson et al., 1995). O NO também tem sido implicado nos processos de formação de memórias (Schuman e Madison, 1991), nocicepção (Moore et al., 1991; Handy et al., 1995), assim como no comportamento sexual (Nelson et al., 1995; Benelli et al., 1995) e alimentar (Morley e Flood, 1991).

O NO é sintetizado de forma cálcio-dependente, principalmente nos eventos celulares desencadeados por aminoácidos excitatórios (Zhang e Snyder, 1995), tais como transmissão sináptica anterógrada ou retrógrada (Garthwaite, 1991), além de processos de plasticidade neural, como memória e aprendizagem (Igram et al., 1998; Hölscher, 1997; Medina e Izquierdo, 1995). Por outro lado, o aumento pronunciado da liberação de aminoácidos excitatórios induz a síntese excessiva de NO, podendo

causar crises convulsivas e induzir neurotoxicidade (Hecker et al., 1995; Dawson et al., 1991, Nowicki et al., 1991). É também aventado que a síntese excessiva de NO, catalisada por iNOS, poderia contribuir para os processos neurodegenerativos subjacentes às doenças de Alzheimer e mal de Parkinson (Moncada e Higgs, 1993).

Vários estudos têm mostrado que o NO pode ser igualmente importante na expressão de comportamentos inatos em roedores. A administração de L-arginina ou de inibidores da NOS ( $N_{\omega}$ -nitro-L-arginina, L-NOARG, e L-N-nitro-L-arginina-metil-ester, L-NAME) interfere com a ingestão de alimentos em camundongos (Morley e Food, 1991) e o comportamento sexual de ratos (Bernelli et al., 1995). Animais “*knockout*” para NOS1 apresentam um perfil comportamental característico, com ansiedade reduzida e prejuízo do aprendizado e memória (Wultsch et al., 2007), o que é confirmado pela injeção de inibidores da NOS e do análogo de GMPc, a 8-BR-GMPc, no núcleo dorsal da rafe (Spiacci et al., 2008). Além disso, camundongos com deficiência na síntese de NO no SNC manifestam agressividade exacerbada, avaliada durante a interação agonística intra-específica (Nelson et al., 1995).

### 1.3 Óxido nítrico e comportamento aversivo

No SNC, a NOS está presente em várias estruturas responsáveis pela elaboração de respostas a eventos aversivos, entre elas o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo (HPC, Vincent, 1994), sendo plausível, portanto, o envolvimento da via L-arginina/NO na modulação da ansiedade experimental.

A este respeito, Quock e Nguyen (1992) mostraram que a administração aguda de L-NAME impede a ansiólise induzida pelo benzodiazepínico clordiazepóxido, sugerindo uma ação ansiogênica do NO. Por outro lado, Volke e colaboradores (1995) mostraram que o L-NAME apresenta um efeito do tipo ansiolítico no LCE,

quando administrado agudamente. Entretanto, a ansiólise não foi observada com o tratamento crônico com L-NAME, mesmo promovendo a redução nos níveis da NOS cerebral e, conseqüente, redução nos níveis centrais de NO (Aria et al., 1997). Não se sabe ao certo se há desenvolvimento de tolerância a ansiólise induzida pela inibição da síntese de NO em animais cronicamente tratados com L-NAME, ou se isto decorre da condição de hipertensão desenvolvida com este tratamento. No entanto, o efeito do tipo ansiolítico induzido pela administração aguda de L-NAME não parece ser devido às mudanças na pressão arterial, já que o tratamento crônico aumenta de modo similar à pressão arterial, sem modificar, porém, os níveis basais de ansiedade dos animais. Além disso, animais hipertensos não apresentam diferenças comportamentais quando avaliados no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE, Rosa et al., 1994). Complementarmente, Baretta e colaboradores (2001) mostraram o envolvimento do NO no efeito ansiogênico induzido pelo neuropeptídeo substância P, no LCE. Em concordância com estes achados, Volke e colaboradores (2003a, 2003b) o aumento do sinal NO/GMPc, pela administração sistêmica de sildenafil (um inibidor seletivo de fosfodiesterase do tipo 5) e L-arginina, promove um perfil do tipo ansiogênico em camundongos avaliados no LCE e no campo-aberto, ao passo que a administração de inibidores da nNOS promove efeitos do tipo ansiolítico e antidepressivo. Em adição, a exposição a um predador natural, o gato, ou a um ambiente aversivo, o LCE, faz com que a expressão de neurônios NADPH-positivos seja aumentada em várias áreas de defesa, como núcleos hipotalâmicos e a substância cinzenta periaquedutal (SCP), entre outras (Beijamini e Guimarães, 2006a, 2006b). Além disso, a inibição da NOS impede a sensibilização do medo induzido pela exposição repetida ao LCE (Sakae et al., 2008).



Assim, alterações dos níveis de NO têm sido relacionados a respostas comportamentais indicativas de ansiogênese ou de ansiólise em muitos estudos. A administração sistêmica de L-NAME aumenta os comportamentos relacionados à ansiedade nos testes do LCE, caixa claro-escuro e placa perfurada (*hole-board*; Czech et al., 2003), sugerindo que os efeitos observados nos diferentes paradigmas não são mero artefato ou devido a déficits motores. Resultados no mesmo sentido foram obtidos em animais tratados por via intracerebroventricular (i.c.v.) com 3-morfolinossindnonimina (SIN-1), um doador de NO, que aumentou o tempo despendido no compartimento iluminado da caixa claro-escuro (Li e Quock, 2002). Em contraste, o tratamento sistêmico agudo (Volke et al., 1998) ou sub-crônico (Dunn et al., 1998) com 7-nitroindazol (7-NI), um inibidor preferencial da nNOS, aumentou a exploração dos braços abertos do LCE. A injeção intraperitoneal de doadores de NO, assim como de seus precursores, também foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico do diazepam (Volke et al., 1998) e da morfina (Shin et al., 2003) em animais avaliados no LCE.

O uso de animais *knockout* para nNOS, no entanto, tem levado a resultados conflitantes. Alguns estudos relatam não haver diferenças entre camundongos *knockout* (nNOSK/O) e “*wild-type*” (WT) no LCE (Nelson et al., 1995; Bilbo et al., 2003), enquanto outros relatam que os animais *knockout* para esta enzima ficam menos tempo nos braços abertos quando comparados aos WT (Weitzdoefer et al., 2004), isto é, animais nNOSK/O apresentariam um perfil do tipo ansiogênico. No entanto, Wulsch e colaboradores (2007) mostraram que animais *knockout* para nNOS apresentam ansiedade reduzida, além de prejuízo dos processos de aprendizado e memória.

A literatura traz, portanto, várias evidências de que o NO desempenha papel chave na modulação da ansiedade experimental, embora os efeitos observados com

drogas que alteram seus níveis sejam contraditórios. Por outro lado, o achado de que o efeito ansiogênico do NO está presente apenas após estudos agudos, indica que a participação da via L-arginina / NO na ansiedade merece uma maior atenção por parte da comunidade científica. No entanto, a este respeito, grande parte dos estudos foi feita com a administração sistêmica aguda de drogas que afetam os níveis de NO. Assim, uma abordagem que pode trazer uma contribuição mais precisa acerca do papel das vias nitrérgicas na modulação dos comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo é o uso de manipulações farmacológicas anatomicamente mais precisas, o que fizemos no presente estudo.

Neurônios positivos para NOS estão localizados na maior parte das áreas relacionadas às reações de defesa (Guimarães et al., 2005). A presença de NOS constitutiva foi descrita na amígdala (Vincent, 1994) e na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd; Onstott et al., 1993), especialmente na SCP dorsolateral (SCPdl, Guimarães et al., 2005), áreas do chamado sistema cerebral aversivo que comanda comportamentos defensivos e elabora estados aversivos emocionais e motivacionais, tendo sido propostas como os principais substratos neurais do medo e da ansiedade (Graeff, 1990; Graeff et al., 1993). Guimarães e colaboradores (1994) mostraram que a microinjeção de L-NAME na SCPd induz ansiólise no LCE, enquanto Monzon e colaboradores (2001) observaram que a injeção de L-NOARG, um outro inibidor da produção de NO, na amígdala ou no HPC de ratos reduziu o tempo despendido nos braços abertos do LCE (Monzon et al., 2001), um efeito do tipo ansiogênico diametralmente oposto. Assim, dada a ampla distribuição da NOS no SNC, é muito provável que a mudança na produção de NO em diferentes estruturas cerebrais afete diferencialmente o comportamento dos animais, o que objetivamos verificar no presente estudo.

#### 1.4 Óxido nítrico e comportamento aversivo: estudo do substrato neural

Estudos imunohistoquímicos têm revelado a presença da enzima NOS em neurônios da região do complexo amigdalóide, conhecido como o repertório neuronal que modula muitos comportamentos de medo. A amígdala, dividida em amígdala lateral (AL), amígdala basolateral (ABI) e amígdala basomedial (ABm), é compreendida de 13 núcleos com cada núcleo sendo formado por sub-núcleos (Pitkanen, 2000). No entanto, somente alguns destes núcleos são importantes no controle do medo, dentre eles, destaca-se o complexo basolateral. Sugere-se que a amígdala esteja envolvida na integração de complexos *inputs* multisensoriais relacionados à percepção de estímulos ameaçadores (Blanchard e Blanchard, 1972).

Dentro do repertório aversivo, abaixo da amígdala está o núcleo do leito da estria terminal (NLET). O NLET é também uma estrutura límbica adjacente ao forâmen cerebral basal e ao septo, interconectado com muitas estruturas corticais e subcorticais, em particular a amígdala. Estas estruturas são relevantes porque se projetam para uma área comum a qual medeia sinais específicos de medo, que agem coletivamente produzindo uma resposta integrada de medo (Gewirtz, 2003). A literatura tem mostrado a distribuição de neurônios contendo NOS no NLET (Hadeishi Wood, 1996), tendo sido demonstrado que esta região está implicada em muitos processos relacionados ao estresse e ao medo incondicionado (Fendt et al., 2003; Lee et al., 1997; Levita et al., 2004; Sullivan et al., 2004).

Através de técnicas imunohistoquímicas, foram também marcados neurônios com NOS na substância cinzenta periaquedutal - SCP (Vincent e Kimura, 1992), região cerebral relacionada ao medo e à ansiedade que, em conjunto com a amígdala e o hipotálamo medial, formam o chamado sistema de fuga e luta ou sistema cerebral aversivo (Brandão et al., 1994). A SCP é uma estrutura mesencefálica que já foi

chamada de “via comum” para o comportamento afetivo-defensivo. Alguns trabalhos iniciais indicaram que esta estrutura está envolvida na integração e elaboração de estados motivacionais aversivos (Graeff, 1981). Posteriormente, outros autores mostraram que a estimulação elétrica desta região evoca padrões de comportamento defensivo em animais (Graeff e Schenberg 1978; Graeff, 1981, 1991). A estimulação elétrica desta estrutura produz um padrão típico de respostas caracterizado por atividade motora intensa acompanhada de saltos, reações neurovegetativas, como aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, respiração, piloereção, micção, defecação e exoftalmia em animais (Brandão et al., 1999). Na verdade, trata-se de uma região estudada há muito tempo pela sua importante função na emocionalidade em humanos. Nashold e colaboradores (1969) relataram que a estimulação da SCP em humanos produzia fortes reações emocionais, relatadas por pacientes como sensação de medo e morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas. A SCP se divide em quatro colunas longitudinais denominadas de dorso-medial, dorso-lateral, lateral e ventro-lateral que servem como módulos anatômicos distintos para funções específicas associadas com estas estruturas, tais como resistência vascular renal e função hipertensiva (Carrive e Bandler, 1991). A literatura tem sugerido que a SCP dorsal é uma estrutura chave na expressão de respostas defensivas (Vianna e Brandão, 2003) e que lesões nesta região podem abolir ou reduzir dramaticamente tanto o comportamento do medo inato (Blanchard et al., 1981), como o medo aprendido (LeDoux et al., 1988). O comportamento de congelamento, caracterizado por uma imobilidade tônica, por exemplo, é um comportamento defensivo decorrente da exposição dos animais a estímulos incondicionados de medo (Brandão et al., 2003), representando uma resposta comportamental de medo intenso e está associado ao repertório neural da SCP.

Outra região extremamente importante para a modulação do comportamento defensivo é a septo-hipocampal. O sistema septo-hipocampal desempenha um papel importante na detecção e avaliação dos estímulos exteroceptivos, conferindo a sua natureza, estabelecendo o grau de conflito quando as informações são concorrentes, e determinando os objetivos e planos de ações a serem tomadas. É, portanto, o sistema de tomada de decisão e resolução de conflitos (Brandão et al, 2003). O septo possui conexões recíprocas com o hipotálamo, giro do cíngulo, tálamo e amígdala, mas as principais conexões do septo são feitas com o hipocampo, através de fibras bidirecionais ao longo do eixo septo-hipocampal (Brodal, 1992). Estudos utilizando lesão do septo em animais de laboratório mostraram alterações comportamentais denominadas de síndrome septal, caracterizada por comportamento sexual alterado e aumento na agressividade (Brady e Nauta, 1953; 1955). Em humanos, uma hiperemocionalidade foi identificada após lesões nesta estrutura (Zeman e King, 1958).

### **1.5 Hipocampo e Comportamento Aversivo**

O hipocampo (HPC) é uma estrutura formada por seis regiões citoarquiteticamente distintas: o giro denteado, o HPC em si que é dividido em três áreas (CA1, CA2 e CA3), o córtex entorrinal, o subículo e o parasubículo, que são algumas vezes agrupados como complexo subicular (Amaral e Witter, 1989). Embora o papel da formação hipocampal na aprendizagem e memória esteja bem estabelecido nos mamíferos (O'Keefe and Nabel, 1978; Izquierdo et al 1992; Squire, 1992; Eichenbaum et al. 1994. Squire et al., 2004), mais recentemente um grande número de evidências vem se acumulando e ressaltando o seu envolvimento em mecanismo associado com o comportamento defensivo, medo e ansiedade (Gray 1982, Gray e McNaughton, 2000; Bannerman et al., 2004 B). As reações de medo

possam ser uma consequência necessária de suas operações mnemônicas, é também possível que esta estrutura controle o medo e ansiedade independentemente da aprendizagem (Gray e McNougton, 1982; 2000).melhorar a frase. A literatura também sugere que o HPC possa ser diferenciado ao longo do seu eixo dorso-ventral (Risold e Swanson, 1996, Moser e Moser, 1998) e, muitas evidências têm implicado a participação do HPC ventral (HPCv), na modulação das respostas defensivas a um estímulo ameaçador incondicionado (Bannerman et al., 2004 B). Este conhecimento tem sido estabelecido com uso de técnicas de lesão em roedores submetidos a diferentes modelos de ansiedade, como o LCE, o teste de interação social, o campo aberto, o Labirinto em T elevado (LTE), a caixa claro/escuro, o teste de hiponeofagia e o teste do odor de gato (Bannerman et al., 2002, Kjelstrup et al., 202; Bannerman et al., 2003; McHugh et al., 2004; Trivedi e Coover, 2004; Pentkowski et al., 2006). Os resultados obtidos nos testes comportamentais citados mostram redução nas respostas similares à ansiedade, implicando o HPCv na medição do comportamento defensivo incondicionado. Este redução também foi verificada com a infusão de lidocaína no HPC na porção ventral, mas não no dorsal, antes do teste, de ratos avaliados ao LCE (Bertoglio et al., 2006).ver referencia.

A literatura tem mostrado através de estudos das conexões anatômicas do HPCv tem indicado que esta estrutura está estritamente interconectada com a amígdala, especialmente com os núcleos basal e lateral (Sawanson e Cowan 1977; Petrovich et al., 2001 Pitkanen et al., 2000). Conexões recíprocas com a amígdala e diretas com o hipotálamo originam-se exclusivamente do HPCv (Petrovich et al., 2001). Entretanto, evidências neuroanatômicas mostram a integração do HPCv com várias estruturas neurais, estabelecidas na organização da resposta de defesa na mediação do comportamento defensivo.

O HPC é uma estrutura cerebral amplamente envolvida na modulação de vários comportamentos relacionados à ansiedade (Gray & McNaughton, 2000; Bannerman et al., 2004 A) e a respostas defensivas inatas a estímulos ameaçadores (Blanchard & Blanchard, 1972; Blanchard et al., 1977; Canteras et al., 2002). A integridade do HPC possibilita ao animal comparar as condições de uma ameaça atual com experiências passadas similares, permitindo-lhe, assim, escolher qual a melhor opção a ser tomada para garantir sua preservação, já que quando esta estrutura é destruída em ambos os hemisférios cerebrais, em mamíferos, os mesmos perdem a capacidade de reter memórias novas (Flora e Zilberstein, 2000). O HPC é uma região rica em neurônios contendo NO (Joca e Guimarães, 2006; Joca et al., 2007), sugerindo que esta região, em particular, pode desempenhar um papel chave na modulação da ansiedade experimental em ratos.

Atualmente, existem várias evidências sugerindo que o HPC funciona de forma diferenciada ao longo do seu eixo ventral e dorsal (Degroot e Treit, 2004; Engin e Treit, 2007; Moser e Moser, 1998), representando uma possível função dual na modulação dos comportamentos condicionado e incondicionado (Engin e Treit, 2007, Nascimento-Häckl e Carobrez, 2007). Sua região ventral tem sido particularmente associada a respostas emocionais (Bertoglio et al., 2006; Engin e Treit, 2007; Zarrindast et al., 2008). Recentemente, estudos com lesão do HPCv (incluindo regiões intermediárias do CA1 e *subiculum*), mas não do HPCd, mostraram uma redução significativa nos comportamentos defensivos durante a exposição ao odor de gato e ao contexto (Pentokowsky et al., 2006). Assim, a parte dorsal do HPC parece estar correlacionada aos aspectos mnemônicos, enquanto a parte ventral estaria envolvida com a ansiedade (Bannerman et al., 2004 A). Entretanto, esta segregação

é uma questão contraditória e alguns estudos não suportam esta hipótese (Engin e Treit, 2007, File et al., 2000).

Por outro lado, estudos investigando o envolvimento do NO na região hipocampal em modelos de ansiedade experimental têm gerado resultados conflitantes. Por exemplo, Ferreira e colaboradores (1999) mostraram que a administração de 7-NI no HPCv induziu um efeito do tipo-ansiolítico, no teste do LCE, enquanto que a injeção do análogo do GMPc ou de doadores de NO nesta mesma região bloqueou o efeito ansiolítico do etanol. Echeverry e colaboradores (2004) também mostraram que a injeção de L-NAME no giro denteado do HPCd induziu efeito do tipo ansiolítico no LCE, enquanto Spolidório e colaboradores (2007) observaram o mesmo efeito quando a injeção de inibidores da NOS no HPCd. Em contraste, Monzón e colaboradores (2001) observaram um efeito do tipo ansiogênico após a administração intra-CA<sub>1</sub> de L-NOARG no LCE. E um resultado similar foi recentemente obtido utilizando L-NAME e a L-arginina na região CA1 do HPC (Roohbakhsh et al., 2007).

## **1.6 Avaliação experimental do medo e da ansiedade**

O medo e a ansiedade têm sido muito estudados em vários modelos animais, e entre eles está o labirinto em T elevado (LTE), proposto por Viana e Graeff em 1994. O LTE é derivado do LCE (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985), utilizado para estudar a neurobiologia da ansiedade, não levando em conta que, clinicamente, existem diferentes tipos de transtornos de ansiedade. O modelo LTE possibilita estudar dois tipos de medo no mesmo animal, através do comportamento de esquiva inibitória e da fuga dos braços abertos. Estudos com três classes de compostos ansiolíticos como o agonista benzodiazepínico diazepam, o agonista de receptores 5-



HT<sub>1A</sub> buspirona e o antagonista não seletivo de receptores 5-HT<sub>2</sub> ritanserina, mostraram que estas drogas prejudicam a esQUIVA INIBITÓRIA, sem alterar as medidas de fuga do braço aberto do LTE (Graeff et al., 1998). Evidências clínicas mostraram que o transtorno de ansiedade generalizada é sensível a estas classes de ansiolíticos (Nutt, 1991; Davidson, 2001), o que corrobora o pressuposto de que a esQUIVA INIBITÓRIA estaria relacionada com o transtorno de ansiedade generalizada. Por outro lado, a administração crônica em ratos de compostos utilizados na clínica no tratamento do transtorno de pânico, como os antidepressivos imipramina e fluoxetina, apresenta efeito ansiolítico observado pela diminuição do tempo de fuga do braço aberto do LTE (Teixeira et al., 2000), o que corrobora a hipótese de que esta tarefa pode ser utilizada como um possível modelo experimental de pânico. Neste modelo, portanto, o comportamento de esQUIVA INIBITÓRIA avalia o medo condicionado e está relacionado ao transtorno de ansiedade generalizada, e o comportamento de fuga avalia o medo incondicionado e está relacionado ao transtorno de pânico (Graeff e Viana 1997).

Dados da literatura mostram que diferentes estruturas são ativadas através das tarefas de esQUIVA INIBITÓRIA e da fuga dos braços abertos. A esQUIVA INIBITÓRIA está associada com um aumento da produção de proteína *fos* na amígdala medial, no núcleo anterior do hipotálamo e no núcleo medial da rafe. Por outro lado, o comportamento de fuga está associado com o aumento da proteína *fos* na SCPd e na amígdala basolateral. A esQUIVA e a fuga ativam também o núcleo hipotalâmico dorsomedial e o núcleo paraventricular do tálamo (Silveira et al., 2001).

Assim, tendo em vista os dados da literatura mencionados neste estudo, nós investigamos as regiões do comportamento defensivo que participam dos dois tipos de medo e o envolvimento do NO nesses comportamentos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Considerando que existem diferentes tipos de medo e que regiões cerebrais distintas estão envolvidas nestes comportamentos, o presente trabalho objetivou estudar o envolvimento do NO, administrado em diferentes áreas do sistema defensivo, no comportamento aversivo de ratos avaliados no modelo de estudo comportamental LTE.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Verificar o envolvimento do NO no medo condicionado e no medo inato através do comportamento esquiva inibitória e da fuga dos braços abertos, em ratos expostos ao LTE.
2. Identificar o efeito do inibidor inespecífico da NOS, o L-NAME, em diferentes regiões cerebrais envolvidas no comportamento aversivo, e verificar a estrutura cerebral que participa nos dois tipos de medo.
3. Estudar o envolvimento de NO através de inibidores preferenciais da NOS neuronal na região que participa de forma mais evidente dos dois tipos de medo.
4. Verificar o papel da via NO/cGMP na modulação na reação defensiva de ratos avaliados no LTE.

### **3. MATERIAL E METODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos albinos, com aproximadamente 3 meses de idade, com peso entre 300 a 370 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Antes e após a cirurgia estereotáxica, os animais foram alojados em caixa de polipropileno (49 x 34 x 16 cm) em grupo de, no máximo, cinco animais, mantidos no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia com ciclo de claro e escuro de 12/12 horas (período claro iniciando às 7:00 horas), com temperatura mantida entre 22 a 24° C e livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados respeitando os princípios éticos da experimentação animal, postulados pela COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991) e foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA-23080.020840/2003-01/ UFSC).

#### **3.2 Cirurgia Estereotáxica**

Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uma solução de (1,5 ml/Kg) contendo xilazina (10 mg/ml; Dopaser<sup>®</sup>, Laboratórios Calier Ltda, Brasil) e quetamina (58 mg/ml; Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil). Em seguida, os ratos foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, USA) e, após assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo para a posição da calota craniana, onde foram fixados dois parafusos de aço inoxidável, próximos ao Bregma. Com o auxílio de uma broca de uso odontológico, a calota craniana foi perfurada para a introdução de cânula guia, confeccionadas a partir de um segmento de agulha hipodérmica (calibre 22 interno / 28 externo), que foram

posicionadas 1 mm acima de cada região, conforme as seguintes coordenadas do Atlas Estereotáxico para ratos (Paxinos & Watson, 1986):

1. Ventrículo lateral (VL) - planos anteroposterior (AP) = +0,8 mm; mediolateral (ML) =  $\pm$  1,5 mm; dorsoventral (DV) = -2,5 mm.
2. Amígdala Basolateral (ABL) - AP = -2,8 mm; ML =  $\pm$  4,8 mm; DV = -7,5 mm.
3. Núcleo do Leito da Estria Terminal (NLET) - AP = -0,4 mm; ML =  $\pm$ 1,5 mm; DV = -5,5 mm.
4. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCPdl) - AP = -7,5 mm; ML =  $\pm$  1,9 mm; DV = -2,0 mm (em ângulo de 22° do plano sagital).
5. Septo Lateral (NSL) - AP = -0,2 mm; ML =  $\pm$  1,0 mm; DV = -2,8 mm.
6. Hipocampo ventral (HPCv) – AP = -4,5 mm; ML =  $\pm$ 5.0 mm; DV = -5,0 mm.

Após a implantação da cânula-guia, a superfície craniana foi recoberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante, formando uma estrutura sólida que proporciona estabilidade e fixação da cânula-guia. Além disso, foi introduzido um fio de aço inoxidável (n<sup>o</sup>. 30) em cada cânula implantada para evitar eventuais obstruções. Depois da cirurgia, os ratos permaneceram por um período de sete dias em recuperação até serem submetidos aos testes comportamentais.

### 3.3 Drogas

N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) inibidor não seletivo da NOS, 7-nitroindazol (7-NI) inibidor seletivo da NOS neuronal, azul de metileno (AM) inibidor da guanilato ciclase, nitroprussiato de sodio (SNP), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) inibidor da guanilato ciclase, um doador de NO, foram obtidos da Sigma Co. (USA). As soluções foram preparadas imediatamente antes de seu uso e dissolvidas em salina em tampão fosfato (PBS; pH 7,4), exceto o 7-NI que

foi dissolvido em 5% DMSO mais PBS e o ODQ foi dissolvido em 100% de DMSO. O grupo controle recebeu somente PBS, ou 5% DMSO mais PBS, no mesmo volume.

### **3.4 Labirinto em T elevado**

O labirinto foi construído em acrílico transparente com três braços de iguais dimensões (50x10cm), elevado 50 cm do chão. O braço fechado do LT é formado de paredes com 40 cm de altura, enquanto os braços abertos são circundados por uma borda de 1 cm de altura, para evitar a queda dos animais são circundados por uma plataforma central (10x10 cm) e todo o chão do aparelho é confeccionado em acrílico preto. O aparelho está localizado em uma sala com luz vermelha (15 W) e a intensidade luminosa sobre todos os braços do LT é de 3 lux.

#### **3.4.1 Labirinto em T elevado (LTE) – Procedimento Experimental**

Cinco minutos após administração da droga, cada animal foi submetido ao teste comportamental no LTE, sendo colocado no final do braço fechado e o tempo de saída do animal para qualquer um dos braços abertos com as quatro patas foi registrado e adotado como latência de base (LB).

Após a saída do braço fechado, o animal então foi retirado do labirinto e colocado em uma caixa de polipropileno por trinta segundos; ao final desse período, o animal foi recolocado no braço fechado para que dois novos registros da latência de saída do braço fossem obtidos (intervalo de 30 segundos), caracterizando assim um treino de aquisição de esquiva inibitória dos braços abertos (Esq1 e Esq2). O tempo máximo adotado para a emissão de resposta foi de 300 segundos. Trinta segundos após o registro da Esq2, o animal foi colocado na extremidade de um dos braços

abertos e o tempo de entrada no braço fechado foi utilizado como latência de fuga (Fuga).

Com o objetivo de reduzir a interferência de pistas odoríferas sobre o comportamento exploratório dos animais, no intervalo entre um animal e outro, o labirinto foi limpo com um pano umedecido em álcool 10% e seco. A eventual queda de um animal implicou na sua exclusão. As sessões experimentais foram realizadas no período da tarde, entre 13:00 e 17:00 horas. Durante o teste experimental, o experimentador permaneceu dentro da sala experimental.

### **3.5 Procedimento de administração central da drogas**

Uma semana após a cirurgia, os animais receberam infusão de PBS, L-NAME, 7-NI, MB ou SNP, conforme o protocolo experimental. As infusões foram efetuadas por meio de agulhas injetoras que excedem as medidas de comprimento das cânulas-guias em 1 mm. A injeção foi realizada por microseringas Hamilton de 5  $\mu$ l em um volume de 2  $\mu$ l no VL e 0,5  $\mu$ l nas outras regiões. Conectados por meio de tubos de polietileno à agulha injetora foi introduzida na cânula-guia. Após a infusão, a agulha injetora permaneceu no local por mais 30 s, para facilitar a difusão da solução.

Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase diurna do ciclo claro/escuro entre 13:00 e 17:00 horas, o animal foi retirado e o aparelho foi limpo com uma solução de etanol 10%.

**Experimento 1** - Um grupo de animais recebeu L-NAME (50, 100, 200, 400, 800 nmol), ou PBS, em um volume de 2  $\mu$ l em um dos ventrículos laterais para realização da curva dose-resposta.

**Experimento 2** – Cada grupo de animais receberam L-NAME (50 ou 200 nmol) ou volume equivalente de PBS em uma das regiões do repertório defensivo selecionadas, ABL, MCPd, NSL, NLET ou HPCv em um volume 0,5 µl.

**Experimento 3** - Os animais receberam 0,5 µl de PBS, L-NAME (50, 200 ou 400 nmol) ou 7 NI (10 ou 20 nmol), no HPCv no HPCv.

**Experimento 4** - Os animais foram divididos em quatro grupos que receberam duas injeções de 0,25 µl de cada uma das drogas: PBS + PBS, PBS + SNP 80 nmol, PBS + AM10 nmol ou AM10 nmol SNP 80 nmol no HPCv.

### 3.6 Perfusão e Histologia

Ao final do procedimento experimental, todos os ratos foram sacrificados com uma *overdose* de pentobarbital e, em seguida, transcardialmente perfundidos com solução fisiológica (NaCl 0,9%), seguido por formalina 10%. O encéfalo foi removido imediatamente e pós-fixadas na solução de formalina por 24 h, sendo transferido para uma solução de sacarose 30% em refrigeração até sua secção. Os encéfalos foram então congelados e cortados a 30 µm de espessura em cortes seriados em um criostato (GM150; Leica, Germany). As seções foram montadas em gelatina revestidas de lâminas, e corados com tionina. Os locais de injeção foram localizados sob o microscópio óptico sem conhecimento dos dados comportamentais. Todos os animais com as injeções deslocadas das regiões estudadas foram descartados, o número de acerto foi em cerca de 70% por região.

### 3.7 Análise Estatística

Todos os valores foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com o

tratamento, como o fator independente e os parâmetros (LB, Esq 1 e 2) como medidas repetidas. A latência de Fuga foi analisada por ANOVA univariada. Tanto as esquivas como a fuga foi comparada pelo teste *post-hoc de* Student-Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ . Todos os testes foram realizados utilizando o *software* Statistica® versão 6.0 e os gráficos foram desenhados com o *software* GraphPad Prism versão® 4.0.

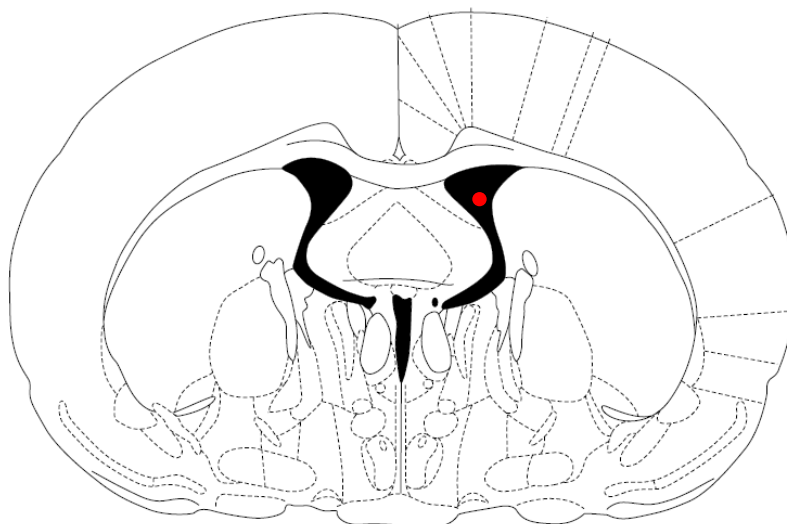


## 4. RESULTADOS

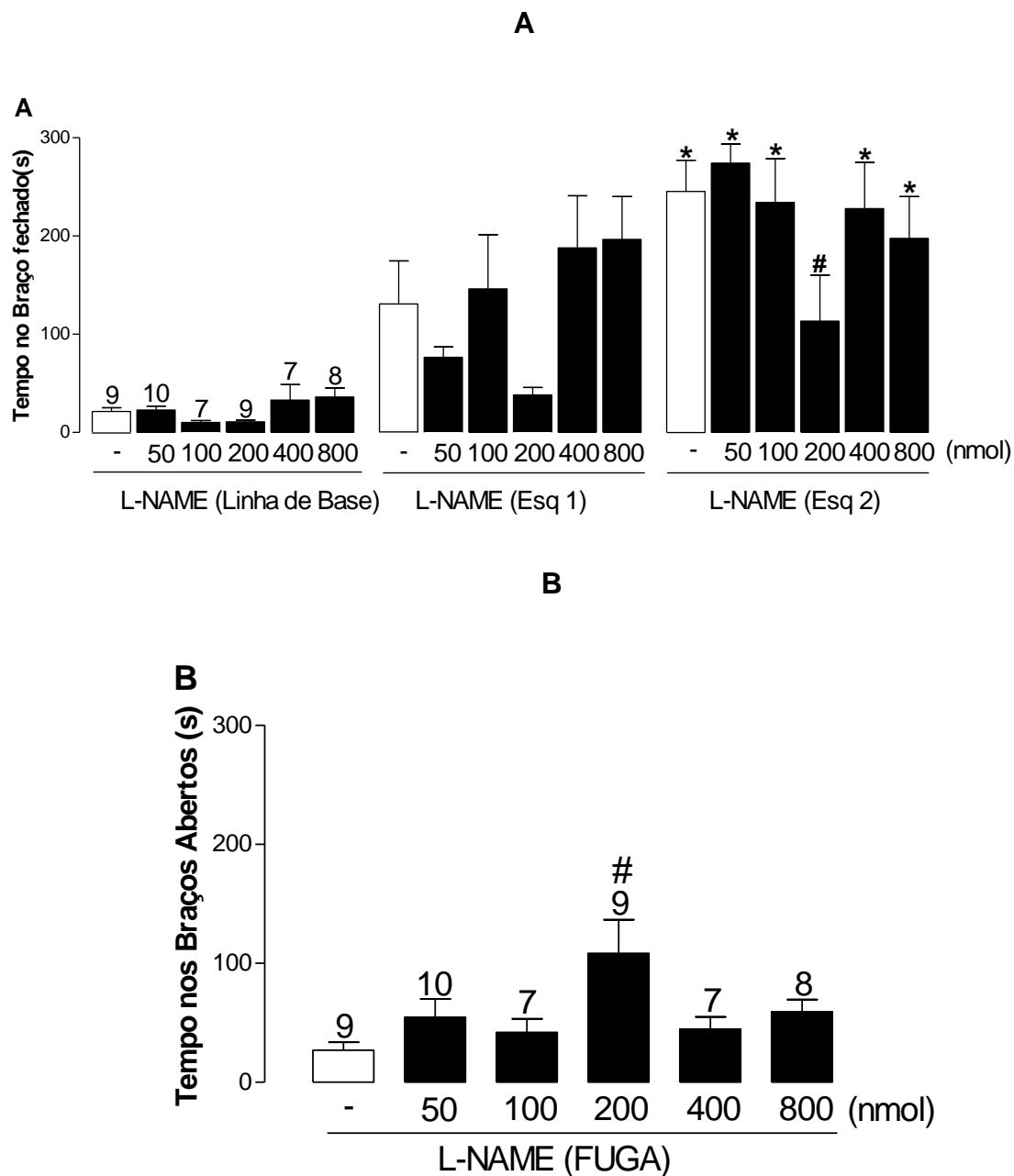
### 4.1 Experimento 1. Curva dose resposta ao L-NAME no ventrículo lateral (VL)

A figura 2A mostra a Latência Basal (LB), Esquiva 1 (Esq1) e Esquiva 2 (Esq2) de ratos tratados com PBS (n= 09), ou L-NAME (50, n = 10; 100, n = 07; 200, n = 09; 400, n = 07 ou 800 nmol, n = 08) injetados no ventrículo lateral (VL, Figura 1). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os tratamentos (PBS e várias doses de LNAME) ( $F_{5,44} = 3,056$ ;  $p < 0,019$ ), comportamentos (LB, Esq1 e Esq2) ( $F_{5,44} = 65,212$ ;  $p < 0,001$ ) e a interação tratamento *versus* comportamento ( $F_{5,44} = 2,203$ ;  $p < 0,025$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo tratado com L-NAME (50, 100, 400 e 800 nmol;  $p < 0,001$ ). O grupo tratado com L-NAME 200 nmol exibiu uma diminuição do tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo PBS ( $F_{5,44} = 3,13$ ;  $p < 0,05$ ).

O teste de Student-Newman-Keuls revelou aumento do tempo de permanência no braço aberto durante a fuga no grupo L-NAME 200 quando comparado ao grupo PBS (PBS  $F_{5,44} = 3,13$ ;  $p < 0,05$  Fig. 2B).



**Figura 1** - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do ventrículo lateral de ratos, o ponto ilustrando o sítio de infusão de PBS ou L-NAME. Adaptado a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

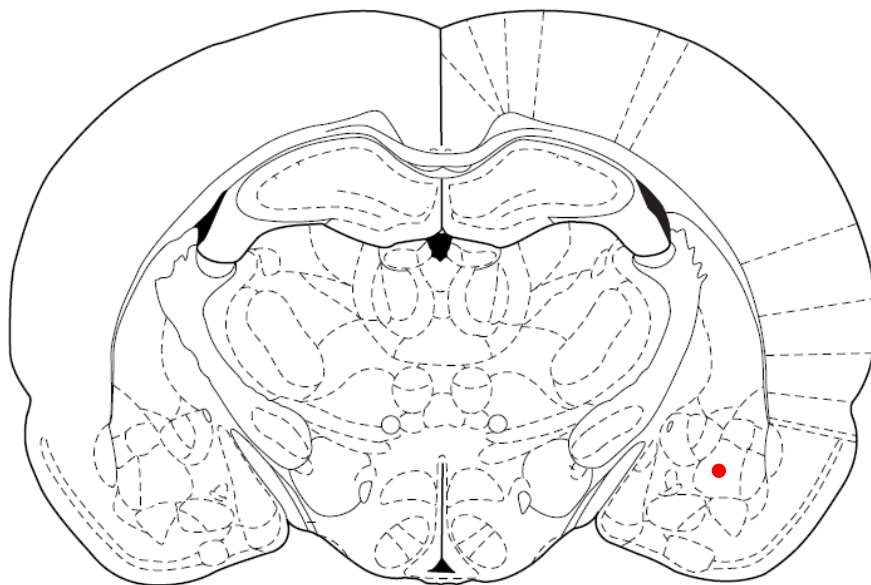


**Figura 2** - Efeito da administração de L-NAME em um dos ventrículos laterais (VL) de ratos avaliados no Labirinto em T Elevado. A) Linha de base (LB), Esquiva 1 (Esq1), Esquiva 2 (Esq2) avaliadas com intervalo de 30 seg. B) Fuga foi avaliada após o treino da Esq 2. O teste de Newman-Keuls detectou diferença significativa entre o grupo L-NAME 200 nmol quando comparado grupo controle no comportamento de fugal. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,01$  comparado com a LB. # $p < 0,01$  comparado com PBS.

## 4.2 Experimento 2. Estudo de regiões específicas do comportamento defensivo

### Amígdala Basolateral (ABI)

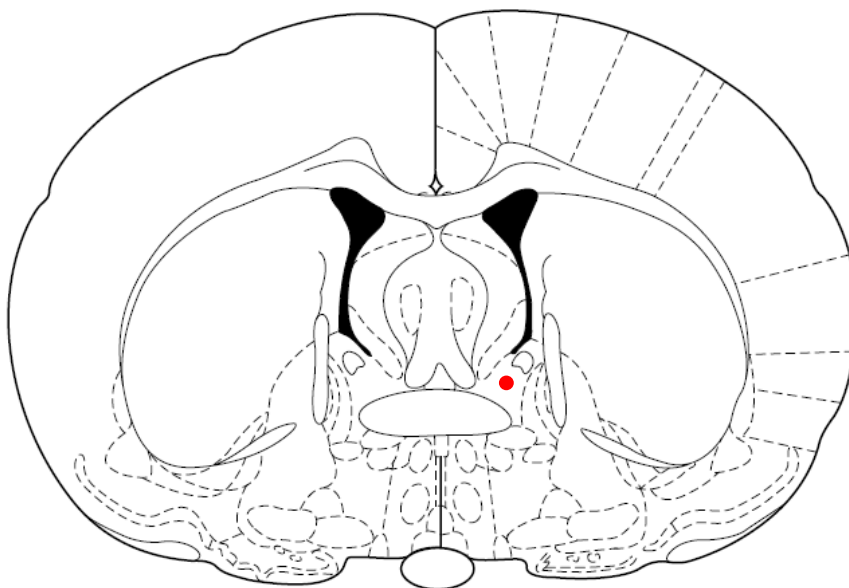
A tabela 1 mostra a Latência Basal (LB), Esquiva 1 (Esq1) e Esquiva 2 (Esq2) de ratos tratados com PBS ( $n = 12$ ) ou L-NAME (50,  $n = 11$  ou 200 nmol,  $n = 08$ ) injetados no ABI (Figura 3). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os comportamentos ( $F_{2,28} = 42,02$ ;  $p < 0,001$ ), a interação tratamento *versus* comportamento ( $F_{2,28} = 5,06$ ;  $p < 0,001$ ), mas não em tratamentos ( $F_{2,28} = 2,529$ ;  $p < 0,098$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,001$ ) ou L-NAME (50 nmol,  $p < 0,001$ ), mas não L-NAME 200 nmol ( $p > 0,05$ ) quando comparados com a respectiva LB. O grupo tratado com L-NAME 200 nmol exibiu diminuição do tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo PBS. O teste de Student-Newman-Keuls não detectou diferenças entre os grupos, relativas ao comportamento de Fuga dos braços abertos.



**Figura 3** - Desenho esquemático de um corte coronal na altura da amígdala basolateral de ratos, o ponto ilustrando o sítio de infusão de PBS ou L-NAME. Adaptado a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

### **Núcleo do Leito da Estria Terminal (NLET)**

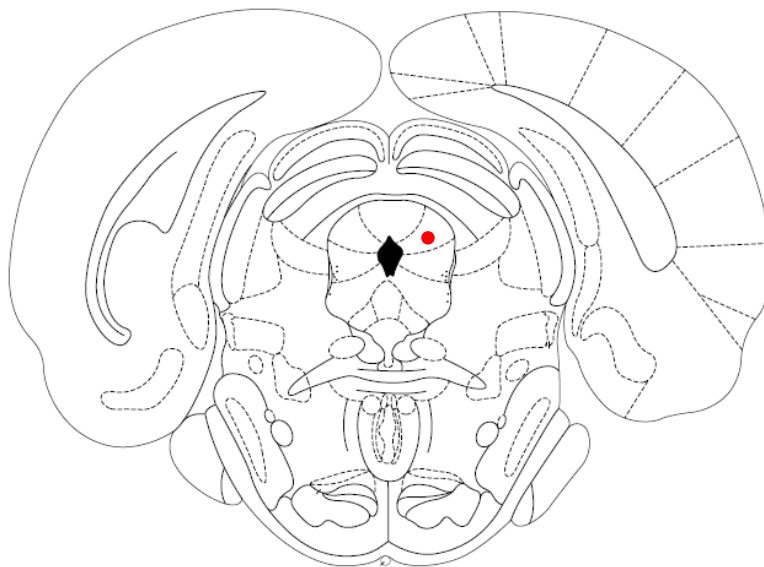
A tabela 1 apresenta as diferenças entre BL, Esq1, Esq2 ao longo das sessões nos grupos de ratos tratados com PBS (n = 08) ou L-NAME (50, n = 07 ou 200 nmol, n = 07) injetados no NLET (Figura 4). ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os comportamentos ( $F_{2,18} = 45,785$ ;  $p < 0,0001$ ), a interação tratamento *versus* comportamento ( $F_{2,18} = 0,366$ ;  $p < 0,831$ ), mas não em tratamentos ( $F_{2,18} = 1,117$ ;  $p < 0,349$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,001$ ) ou L-NAME (50 e 200 nmol,  $p < 0,05$ ) quando comparados com a respectiva LB. O grupo tratado com L-NAME 200 nmol exibiu diminuição do tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo PBS. O teste Student–Newman–Keuls não detectou diferenças entre os grupos, relativas ao comportamento de Fuga dos braços abertos.



**Figura 4** - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do núcleo do leito da estria terminal de ratos, o ponto ilustrando o sítio de infusão de PBS ou L-NAME. Adaptado a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

**Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral (SCPdl)**

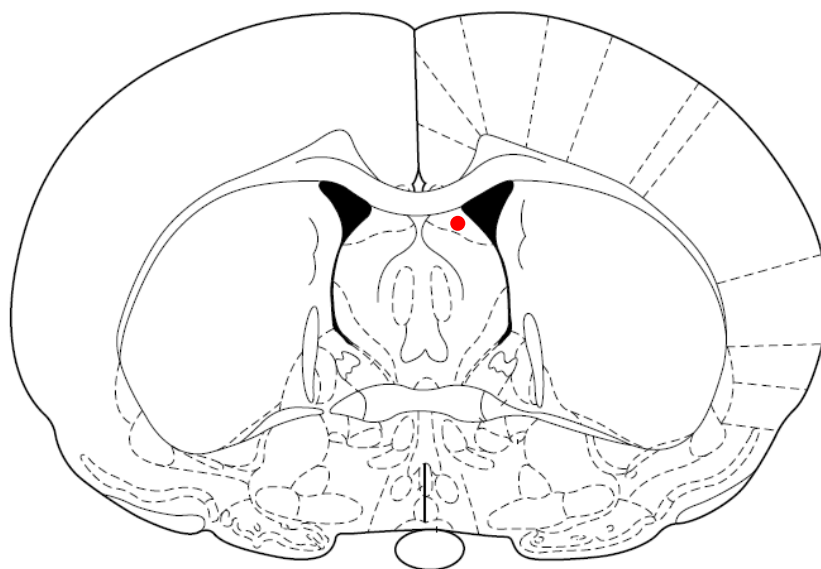
A tabela 1 mostra a LB, Esq1 e Esq2 de ratos tratados com PBS ( $n = 10$ ) ou L-NAME (50,  $n = 09$  ou 200 nmol,  $n = 09$ ) injetados no SCPdl (Figura 5). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os tratamentos ( $F_{2,25} = 5,644$ ;  $p < 0,01$ ), comportamentos ( $F_{2,25} = 43,549$ ;  $p < 0,001$ ) e da interação tratamento *versus* comportamento ( $F_{2,25} = 4,448$ ;  $p < 0,01$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,001$ ) ou L-NAME (50 nmol,  $p < 0,001$ ), mas não L-NAME 200 nmol ( $p > 0,05$ ) quando comparados com a respectiva LB. O grupo tratado com L-NAME 200 nmol exibiu diminuição do tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 ( $p < 0,01$ ), quando comparado com o grupo PBS. O teste de Student-Newman-Keuls não revelou diferenças entre os grupos, relativas ao comportamento de Fuga dos braços abertos.



**Figura 5** - Desenho esquemático de um corte coronal na altura da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos, o ponto ilustrando o sítio de infusão de PBS ou L-NAME. Adaptado a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

### Septo Lateral (NSL)

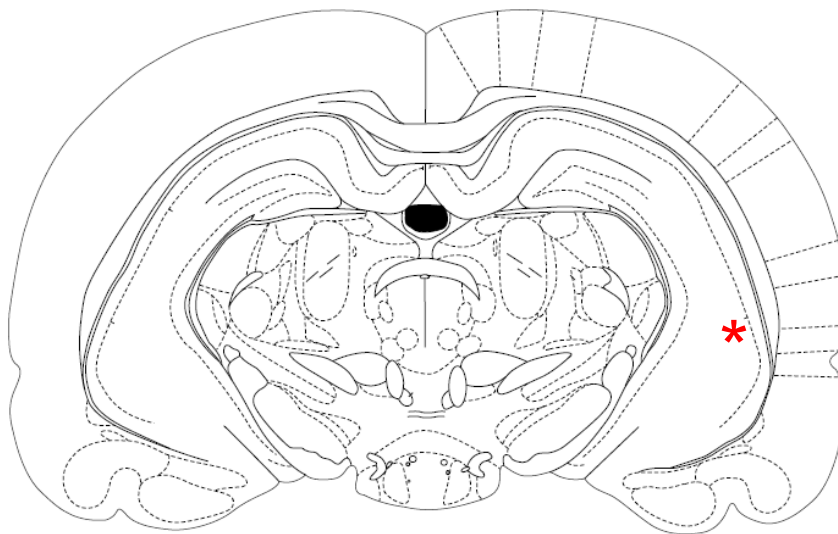
A tabela 1 mostra a LB, Esq1 e Esq2 de ratos tratados com PBS (n = 05) ou L-NAME (50, n = 06 ou 200 nmol, n = 07) injetados no NSL (Figura 6). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os comportamentos ( $F_{2,15} = 34,192$ ;  $p < 0,001$ ), a interação tratamento *versus* comportamento ( $F_{2,15} = 3,295$ ;  $p < 0,01$ ), mas não tratamentos ( $F_{2,15} = 2,729$ ;  $p < 0,098$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,001$ ) ou L-NAME (50 nmol,  $p < 0,001$ ), mas não L-NAME 200 nmol ( $p > 0,05$ ) quando comparados com a respectiva LB. O grupo tratado com L-NAME 200 nmol exibiu diminuição do tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo PBS. O teste de Student-Newman-Keuls não revelou diferenças entre os grupos, relativas ao comportamento de Fuga dos braços abertos.



**Figura 6** - Desenho esquemático de um corte coronal na altura do septo lateral de ratos, ponto ilustrando o sítio de infusão de PBS ou L-NAME. Adaptado a partir do Atlas Paxinos e Watson (1986).

### **Hipocampo Ventral (HPCv)**

A tabela 1 mostra a LB, Esq1 e Esq2 de ratos tratados com PBS (n = 10) ou L-NAME (50, n = 09 ou 200 nmol, n = 09) injetados no HPCv (Figura 7). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os tratamentos ( $F_{2,24} = 7,19$   $p < 0,01$ ), tentativas ( $F_{2,48} = 22,93$   $p < 0,001$ ) e a interação tratamento *versus* tentativas ( $F_{4,48} = 5,84$ ;  $p < 0,001$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,001$ ) ou L-NAME 50 nmol,  $p < 0,001$ , em comparação a respectiva LB ( $p < 0,001$ ). O tratamento com L-NAME 200 nmol promoveu uma diminuição significativa no tempo de permanência nos braços fechados quando comparado ao grupo controle PBS. O L-NAME 200nmol promoveu um aumento no tempo de permanência nos braços abertos durante a Fuga, comparada com o grupo PBS ( $F_{2,24} = 4,91$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 7-** Desenho esquemático de um corte coronal do hipocampo ventral de ratos, o ponto ilustrando o sítio de infusão de PBS ou L-NAME. Adaptado a partir do Atlas Paxinos e Watson (1986).

**Tabela 1** - Efeito da injeção de L-NAME (50 ou 200 nmol) em diferentes estruturas cerebrais do comportamento aversivo em ratos, avaliados no teste do labirinto em T elevado.

Estruturas Cerebrais	Parâmetros Comportamentais	Tratamentos		
		PBS	L-NAME 50 nmol	L-NAME 200 nmol
VL	LB	21,3 ± 3,8	22,9 ± 4,0	10,9±1,9
	ESQ1	130,9 ± 43,8	76,6 ± 10,4	38,2 ±7,6
	ESQ2	245,4 ± 31,8*	274,2 ± 19,3*	113,3 ± 46,9 <sup>#</sup>
	FUGA	26,9 ± 6,8	54,4 ± 15,26	108,4 ± 28,2 <sup>#</sup>
ABL	LB	10,8 ± 21,2	14,0 ± 3,3	21 ± 12,8
	ESQ1	87,2 ± 29,8	51,5 ± 20,8	54,4 ± 35,2
	ESQ2	242,8 ± 25,2*	182,6 ± 34,6*	71,5 ± 35,0 <sup>#</sup>
	FUGA	41,3 ± 8,0	40,1 ±8,3	28,6 ± 7,5
NLET	LB	15,4 ± 3,6	13,3 ± 3,1	19,3 ± 5,8
	ESQ1	58,1 ± 35,1	17,8 ± 3,1	25,7 ± 5,4
	ESQ2	252,4 ± 97,6*	192,5 ± 9,1*	205,4 ± 51,3*
	FUGA	55,1 ± 9,7	33,7 ± 7,8	33,0 ± 8,8
SCPdl	LB	16,2 ± 3,6	7,6 ± 2,2	12,0 ± 4 7
	ESQ1	101,5 ± 39,6	29,2 ± 9,2	19,1 ± 3,5
	ESQ2	230,1 ± 32,8*	211,8 ± 40,4*	74,2 ± 30,2 <sup>#</sup>
	FUGA	52,5 ± 13,4	92,0 ± 52,9	72,7 ± 38,7
NSL	LB	12,6 ± 4,4	21,6 ± 10,4	19,8 ± 12,1
	ESQ1	74,40 ± 56,4	51,6 ± 17,6	25,7 ± 14,04
	ESQ2	231,8 ± 56,3*	252,4 ± 34,1*	88 ± 43,94 <sup>#</sup>
	FUGA	55,0 ± 16,2	49,3 ± 19,2	41,2 ± 8,7
HPCv	LB	12,40±4,82	6,55±1,21	6,0±1,59
	ESQ1	48,0±28,44	87,66±40,36*	37,12±25,93
	ESQ2	179,1±45,32*	241,5±23,54*	14,87±2,53 <sup>#</sup>
	FUGA	25,7± 6,2	59,11±16,33	111,12±31,84 <sup>#</sup>

Os dados são apresentados como média ± EPM. Abreviaturas: VL = ventrículo lateral, ABL = amígdala basolateral, NLET = núcleo do leito da estria terminal, SCPdl = substância cinzenta periaquedutal dorsal, NSL = septo lateral e HPCv = Hipocampo Ventral. LB = linha de base, Esq = esquiava. \* $p < 0,01$  quando comparados à linha de base, <sup>#</sup> $p < 0,01$  quando comparado ao grupo PBS. Os dados foram analisados pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o fator tratamento como variável independente e as tentativas (LB, Esq1 e Esq2), como medidas repetidas. O parâmetro Fuga foi analisado pela ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student Newman Keuls.



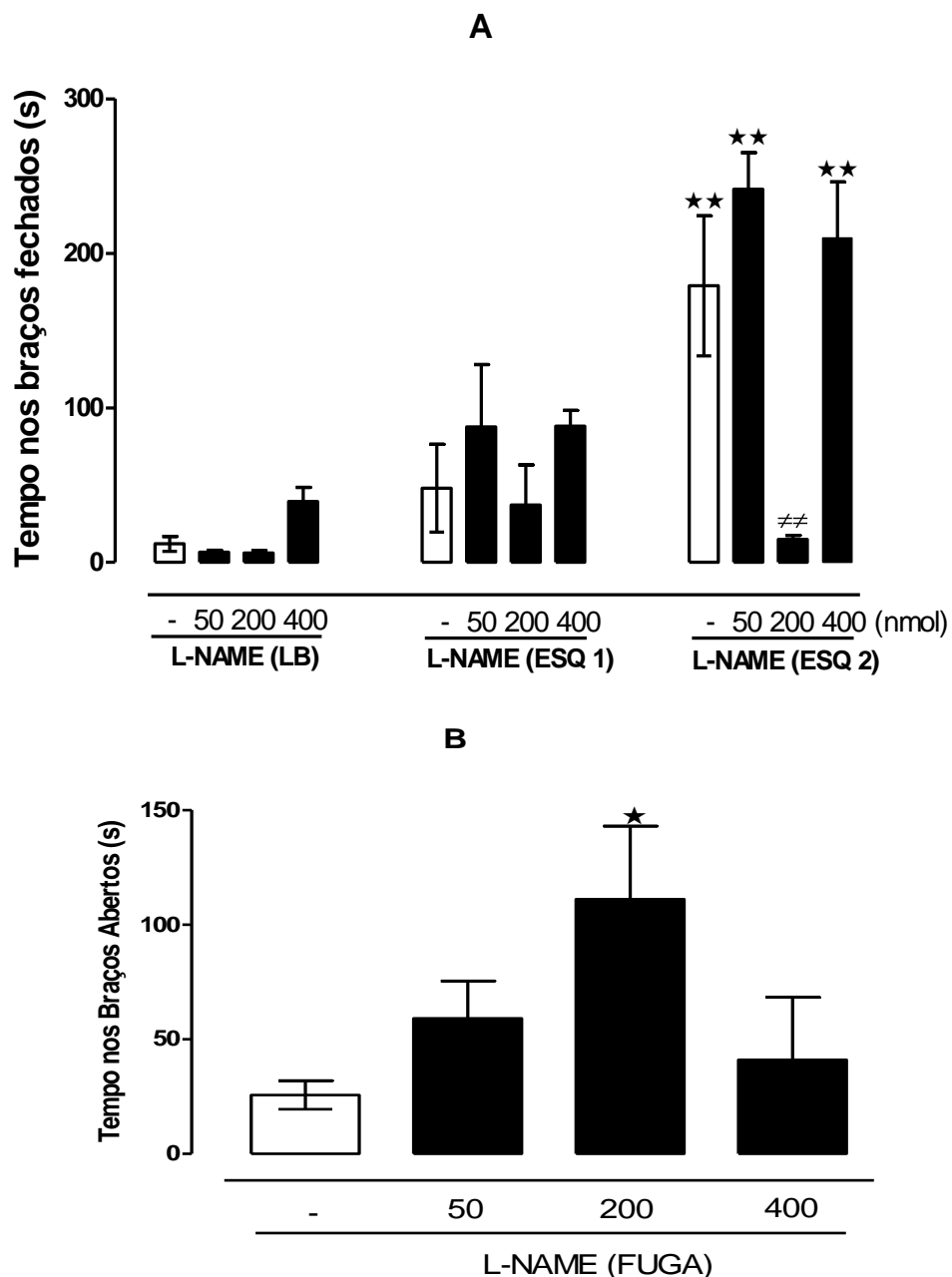
#### 4.4 Experimento 3. *Curva dose resposta de L-NAME no hipocampo ventral*

A Figura 8A mostra o LB, Esq1 e Esq2 de ratos tratados com PBS (n = 10) ou L-NAME (50, 200 ou 400nmol, n = 09) injetados no HPCv. ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo entre os tratamentos ( $F_{3,93} = 8,10$   $p < 0,001$ ), tentativas ( $F_{2,93} = 32,58$   $p < 0,001$ ) e a interação tratamento *versus* tentativas ( $F_{6,93} = 3,85$ ;  $p < 0,05$ ). O teste de Student–Newman–Keuls mostrou que o tempo de permanência nos braços fechados durante a Esq2 foi significativamente maior no grupo que recebeu PBS ( $p < 0,05$ ) ou L-NMAE 50nmol ( $p < 0,001$ ), em comparação a respectiva LB ( $p < 0,05$ ). O tratamento com L-NAME 200 nmol promoveu uma diminuição significativa no tempo de permanência no braço fechado quando comparado ao grupo controle PBS. O L-NAME 200 nmol promoveu um aumento no tempo de permanência nos braços abertos durante a Fuga comparada com o grupo PBS ( $F_{3,30} = 4,30$ ,  $p < 0,05$ , Fig 8B).

##### 4.4.1 Localização dos sítios de infusão - HPCv



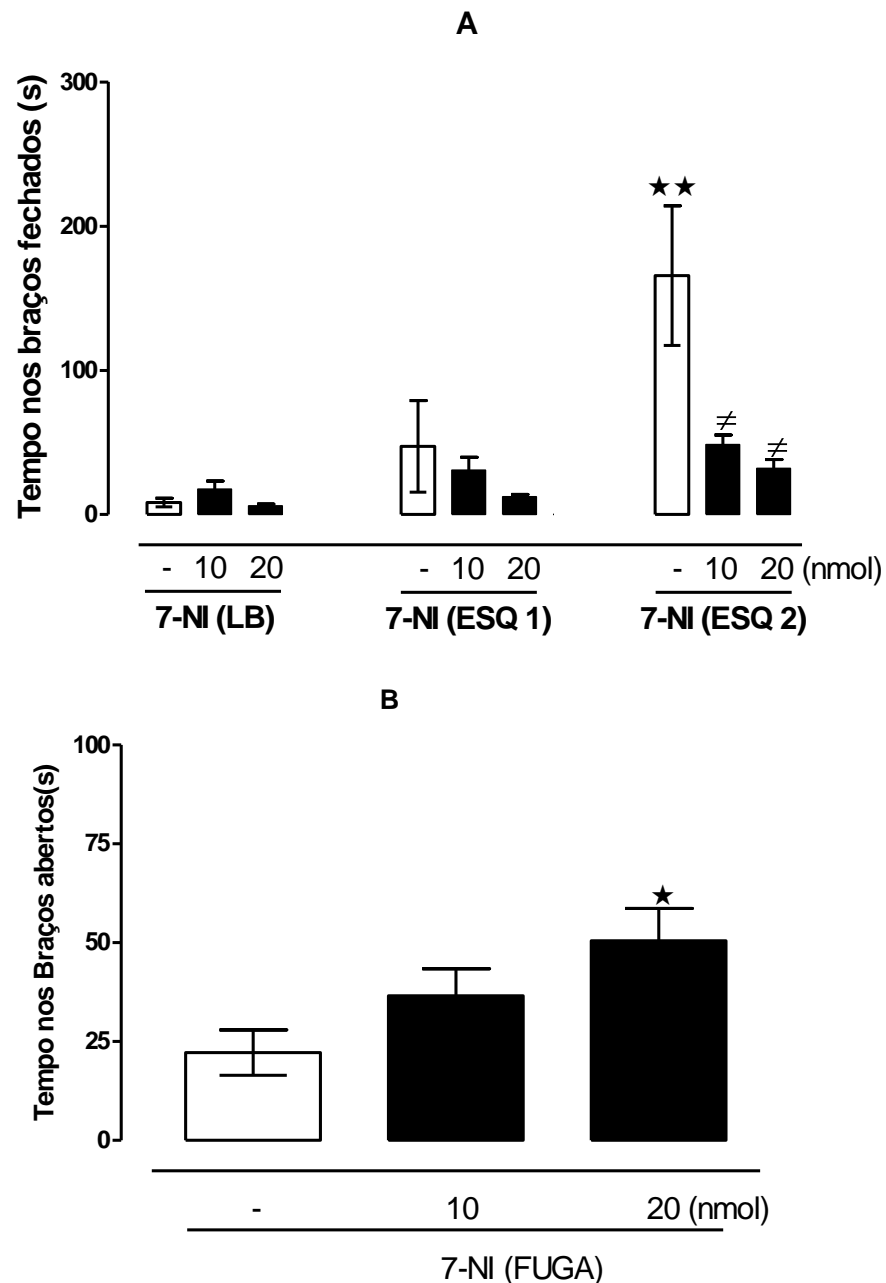
Fotografia de corte frontal do hipocampo ventral, corado pela técnica de Nissl, ilustrando o sítio de infusão das drogas.



**Figura 8** - Efeito da injeção de L-NAME no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LTE. (A) comportamento de esquiiva inibitória. (B) comportamento de fuga (30 s após a esquiiva). A LB, Esq 1 e 2 foram medidas com 30 s de intervalo. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM. \*\* $P < 0,001$  quando comparado à LB. ##  $P < 0,001$  quando comparado com o grupo PBS. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o fator tratamento como variável independente e as tentativas (LB, Esq1 e Esq2) como medidas repetidas. O parâmetro fuga foi analisado pela ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Student Newman Keuls.

### **Inibição da NOS neuronal no hipocampo ventral**

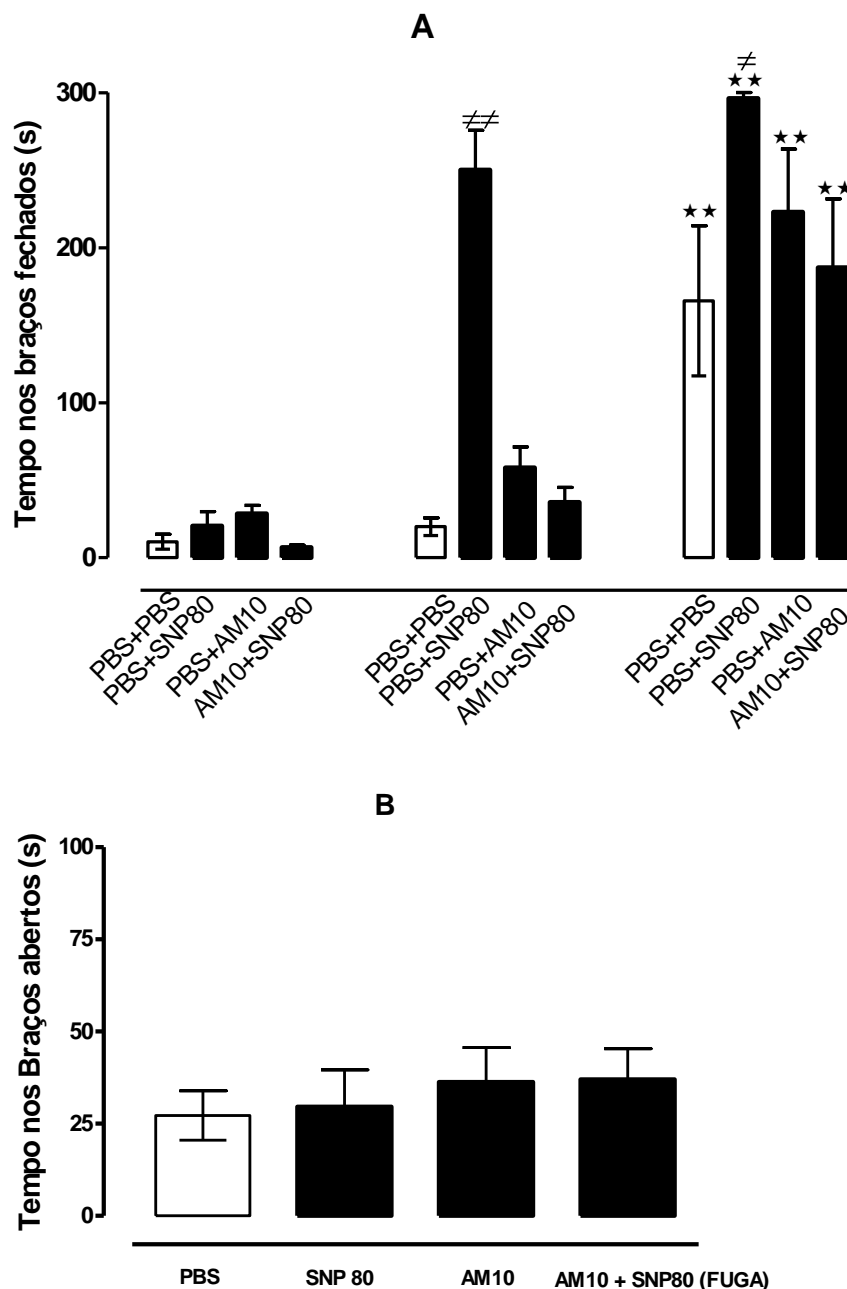
A Figura 9A mostra o comportamento dos ratos tratados com PBS ou 7 NI (10 ou 20 nmol). A ANOVA revelou diferenças significativas entre os grupos nos tratamentos ( $F_{2,57} = 4,61$ ;  $p < 0,05$ ), tentativas ( $F_{2,57} = 6,67$ ;  $p < 0,05$ ) e na interação tratamento *versus* tentativas ( $F_{4,57} = 2,79$ ;  $p < 0,05$ ). O grupo tratado com 7NI, nas doses de 10 e 20 nmol, prejudicou a Esq2 ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. A Esq2 foi significativamente maior nos grupos tratados anteriormente com PBS ( $p < 0,001$ ), comparado com as respectivas LB ( $p < 0,001$ ). O tratamento com 7NI 20 nmol promoveu um aumento na FUGA, quando comparado ao grupo controle ( $F_{2, 19} = 4,45$ ;  $P < 0,05$ ; Fig.9B).



**Figura 9** - Efeito da injeção de 7-NI no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LTE. (A) comportamento de esquiava inibitória. (B) comportamento de fuga (30 s após a esquiava). A LB, Esq 1 e 2 foram medidas com 30 s de intervalo. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM. \*\* $P < 0,001$  quando comparado à LB. ##  $P < 0,001$  quando comparado com o grupo PBS. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o fator tratamento como variável independente e as tentativas (LB, Esq1 e Esq2) como medidas repetidas. O parâmetro fuga foi analisado por ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student Newman Keuls.

#### 4. 5 Experimento 4. Participação da via NO/GMPc

A Figura 10A - mostra a LB, Esq1 e Esq2 do comportamento de ratos tratados com PBS + PBS, PBS + SNP 80 nmol, PBS + MB 10 nmol ou MB 10 nmol+ SNP 80 nmol. A ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento ( $F_{3,81} = 16,16$ ;  $p < 0,001$ ), tentativas ( $F_{2,81} = 67,81$ ;  $p < 0,001$ ) e na interação tratamento versus tentativas ( $F_{6,81} = 4,67$ ;  $p < 0,001$ ). A Esq2 foi significativamente maior nos grupos PBS + PBS ( $p < 0,001$ ), PBS + SNP 80nmol ( $p < 0,001$ ), PBS + MB 10nmol ( $p < 0,001$ ) e SNP80+ MB10nmol ( $p < 0,05$ ) quando comparados com as respectivas LB. A administração de PBS + SNP80nmol aumentou significativamente Esq1 e Esq2 em relação ao grupo PBS+ PBS ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). O pré-tratamento com PBS+MB 10 nmol bloqueou o aumento da Esq1 e Esq2 promovido pelo SNP ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Não houve nenhuma alteração no comportamento de FUGA após a administração de diferentes drogas ( $p > 0,05$ ; Fig.10B).



**Figura 10** - Efeito da injeção de azul de metileno (MB, 10 nmol) e SNP (80 nmol) no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LTE. (A) comportamento de esquiiva inibitória. (B) comportamento de fuga (30s após a esquiiva). A LB, Esq1 e 2 foram medidas com 30s de intervalo. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM.  $**P < 0,001$  quando comparado à LB.  $^{\#} P < 0,001$  quando comparado com o grupo PBS. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o fator tratamento como variável independente e as tentativas (LB, Esq1 e Esq2) como medidas repetidas. O parâmetro fuga foi analisado por ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student Newman Keuls.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que ratos são hábeis em adquirir informações do ambiente, que guiarão a sua exploração em um ambiente novo, a medida em que a exploração ocorre, o animal aprende que regiões do campo exploratório que proporcionam maior ou menor segurança. Os resultados do presente estudo demonstraram que três exposições consecutivas do animal ao LTE (LB, Esq1 e Esq2) foram suficientes para o animal adquirir o comportamento de esquiva inibitória (Viana e Graef;1997; Calixto et al., 2001).

Em concordância com relatos prévios da literatura (Conde et al.,1999; Calixto, 2001; Santos et al., 2006), o presente estudo mostrou que ratos controle (tratados com PBS) exibiram um aprendizagem do comportamento da esquiva inibitória dos braços abertos no teste do LTE. Este achado contrasta com a medida de referência (latência basal), quando o animal estabelece seu primeiro contato com os braços abertos do labirinto, há uma maior latência para a saída do braço fechado.

O presente estudo também mostrou que em ratos tratados centralmente com L-NAME 200 nmol no VL o tempo de permanência nos braços fechados durante a ESQ2 foi menor quando comparado ao grupo tratado com PBS e às outras doses de L-NAME (50, 100, 400 e 800 nmol), indicando um provável efeito do tipo ansiolítico. Este efeito não deve ser atribuído à alteração na atividade locomotora, porque nenhum tratamento foi capaz de alterar os valores LB. Este efeito ansiolítico não foi observado em doses mais baixas ou mais elevadas de L-NAME. Uma provável explicação é que doses menores não foram provavelmente suficientes para inibir efetivamente as enzimas NOS, e as doses mais elevadas podem inibi-la de uma forma diferente (Paige et al., 2007). Este efeito foi dose específico e está em

conformidade com a literatura referente ao L-NAME injetado em outras regiões límbicas relacionadas ao medo e à ansiedade (De Oliveira et al., 2001; Guimarães et al., 2005; Calixto et al., 2008) sugerindo um possível efeito do tipo ansiolítico para esta droga. Uma curva dose-resposta similar foi mostrada anteriormente após injeção central ou sistêmica de inibidores da NOS (Cappendijk et al., 1995, Leza et al 1996;; Masood et al., 2003, Del Bel et al., 2004).

Nossos resultados anteriores apontaram para o importante papel do NO na modulação da ansiedade experimental em ratos (Calixto et al., 2001; Faria et al., 1999) e camundongos (Baretta et al., 2001) em diferentes modelos animais, tais como o LTE e o LCE.

Observamos que tanto os animais controle (PBS), quanto os tratados com L-NAME 50 nmol, adquiriram o comportamento de esquiva inibitória, quando comparados à LB, caracterizado pelo aumento do tempo de permanência no braço fechado durante a Esq2. Entretanto, o L-NAME 200 nmol reduziu o tempo de permanência no braço fechado, quando comparado ao grupo controle, sugerindo um provável efeito do tipo ansiolítico nas regiões estudadas neste trabalho, em concordância aos resultados obtidos por outros autores no teste do LCE (Guimarães et al., 1994; De Oliveira e Guimarães, 1999; Forestiero et al., 2006). No entanto, somente o VL e o HPCv alteraram o comportamento de fuga dos braços abertos, observado entre os grupos controle e tratados com L-NAME 200nmol, mostrando que a manipulação farmacológica dos níveis de NO nestas regiões foram capazes de interferir com o medo incondicionado. A alteração no comportamento de fuga pode ser uma particularidade dessas regiões, no entanto esses resultados necessitam serem melhor investigados pois, a literatura apresenta uma mudança no protocolo experimental através da pré-exposição do animal aos braços abertos do labirinto, tal



alteração não foi adotado no nosso trabalho. Tem sido demonstrado que a pré-exposição leva a uma diminuição do tempo gasto em atividade exploratória no braço aberto, assegurando que durante as medidas de fuga, os animais estão realmente fugindo do estímulo aversivo (Teixeira et al., 2000; Flausino et al., 2002; Poltronieri et al., 2003).

O efeito ansiolítico induzido pela inibição da síntese de NO promovida pelo L-NAME no LTE já havia sido previamente descrito por Calixto e colaboradores (2001) usando uma via de administração sistêmica (i.p.). O presente resultado, portanto, reforça e estende esses achados com o uso da via de administração central e em estruturas específicas. A administração i.c.v. de drogas que afetam o sistema nitrérgico permitiu-nos inferir que o inibidor da NOS é capaz de alcançar regiões cerebrais que participam da modulação do comportamento defensivo, uma vez que os ventrículos laterais estão circundados por várias estruturas do sistema límbico. Buscamos então determinar o substrato neural envolvido no comportamento defensivo, observado quando da injeção central do L-NAME.

Em relação à administração do inibidor da NOS, L-NAME, na ABL, estudos têm revelado a presença da enzima NOS em neurônios nesta região que é conhecida como a região neuronal que modula muitos comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade. Além disso, existem evidências que esta área límbica é essencial para os efeitos ansiolíticos de diversos compostos (Vazdarjanova 2000). Este núcleo, portanto, age como interface entre a entrada sensorial e a saída motora para as respostas comportamentais de medo, memória e aprendizagem (Davis e Whalen, 2001). O complexo basolateral da amígdala é uma estrutura crucial para o controle da emoção, comportamento condicionado a emocionalidade, aprendizagem e memória (Vazdarjanova, 2000). A ABL é, assim, uma estrutura chave envolvida na elaboração

de respostas de medo e nos processos de aquisição, consolidação e expressão do medo condicionado. Lesões da ABL são capazes abolir completamente a resposta autonômica a estímulos de medo condicionado (Davis, 2000; Fendt e Fanselow, 1999; LeDoux, 1988). Estudos moleculares e eletrofisiológicos, porém, têm mostrado que os núcleos amigdalóides também estão envolvidos na expressão do medo incondicionado (Davis et al. 1992; Maren e Quirk, 2004). A este respeito, alguns estudos têm enfatizado o envolvimento da ABL na modulação do comportamento do medo induzido pelo odor do predador (Vazdarjanova et al., 2000; Takahashi et al., 2005; Li et al., 2004).

No presente estudo, o efeito ansiolítico do L-NAME (200 nmol) foi mantido quando este inibidor foi injetado na ABL. No comportamento de fuga dos braços abertos, não houve diferença significativa entre os tratamentos, nas doses utilizadas, sugerindo que o medo inato não é alterado pela diminuição dos níveis de NO nesta região.

Quanto à injeção de L-NAME no NLET, região do comportamento aversivo estudada no nosso trabalho, a literatura tem mostrado que esta região participa em muitos processos autonômicos, neuroendócrinos e motivacionais relacionados ao estresse e ao medo incondicionado (Fendt et al., 2003; Lee et al., 1997; Levita et al., 2004; Sullivan et al., 2004). Entretanto, nossos resultados não mostraram qualquer efeito da inibição da NOS pelo L-NAME nesta região, seja na aprendizagem da esQUIVA inibitória, seja na fuga dos braços abertos do LTE. A falta de efeito do L-NAME no NLET pode ser devida à faixa de doses do L-NAME utilizada, que talvez não tenha sido capaz de modificar o comportamento dos ratos quando administrada nesta estrutura em particular. Outra possibilidade para explicar nossos achados

poderia ser a falta de sensibilidade do LTE para o estudo da possível participação do NO do NLET na modulação do comportamento defensivo de ratos.

Com relação a SCP, a literatura tem mostrado que neurônios nitrérgicos são ativados em regiões relacionadas ao comportamento defensivo após a exposição ao predador, em particular na SCPdl (Moreira e Guimarães, 2008). Estes neurônios também podem estar envolvidos com a resposta comportamental de ratos expostos ao LCE, já que vários estudos mostram que administração sistêmica de inibidores da NOS resulta em um efeito do tipo ansiolítico em animais avaliados no LCE (Guimarães et al., 2005). Considerando a presença da NOS na SCP, alguns estudos mostram que o bloqueio da síntese de NO nesta região também induz um efeito do tipo ansiolítico em ratos avaliados no mesmo teste, o LCE (Dunn, 1998; Faria, 1997). Corroborando estes resultados, a injeção de 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido (carboxi-PTIO), um inibidor não seletivo de NO, na mesma região, diminuiu a exploração dos braços abertos dos animais avaliados no LCE (Guimarães et al., 2005). Nossos resultados com a injeção do inibidor da NOS na SPCdl também sugerem um efeito do tipo ansiolítico para o L-NAME, na dose de 200 nmol, em animais avaliados no LTE, evidenciando o papel do NO da SCPdl no medo aprendido, sem quaisquer alterações no comportamento de fuga relacionado ao medo incondicionado.

A área septal, em comum com outras regiões investigadas neste estudo, há neurônios contendo NOS (Vincent, 1992). Nossos resultados mostraram um efeito do tipo ansiolítico do L-NAME 200 nmol quando injetados no NSL. Funcionalmente, inúmeras evidências têm implicado o septo no medo e na ansiedade. Por exemplo, lesão no septo pode reduzir o medo incondicionado de ratos, sugerindo que esta região normalmente tem um papel excitatório no controle da ansiedade (Menard e

Trent, 1999; Degroot e Trent, 2003). Como nas demais regiões estudadas, neste trabalho, a injeção do inibidor de NOS no NSL não alterou o comportamento de fuga dos braços abertos.

Nossos resultados mostram, no entanto, que a injeção de L-NAME no HPCv diminui o tempo de permanência no braço fechado (medo condicionado) e aumenta o tempo de permanência nos braços abertos (medo inato) de forma mais evidente. Na verdade, observamos que a injeção do inibidor de NOS no NSL assim como no HPCv, diminui o tempo de permanência nos braços fechados do LTE, porém, somente o tratamento no HPCv foi capaz de alterar o tempo de permanência nos braços abertos, indicando uma modulação da resposta de medo inato pelo NO do HPCv.

Em função destes resultados e considerando que o HPC é uma região rica em neurônios com marcação para NOS (De Oliveira, 2000; Doyler e Slater, 1997), procedeu-se um estudo mais detalhado nesta região, com o intuito de melhor compreender a participação da via NO/GMPc nos dois tipos de medo, inato e condicionado. Assim, utilizamos o L-NAME ou 7-NI, inibidor não-seletivo e inibidor preferencial da nNOS, respectivamente, o inibidor seletivo da enzima guanilato-ciclase (GC) azul de metileno (AM), e o doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP); injetados no HPCv, para melhor caracterizar o papel do NO no comportamento aversivo de ratos avaliados no LTE.

A injeção de L-NAME no HPCv promoveu alteração no tempo de permanência no braço fechado durante a ESQ2 quando comparado ao grupo controle. No HPCv o L-NAME participou tanto do medo condicionado quanto do medo inato.

Evidências mostram que o hipocampo contribui para várias funções cerebrais que podem ser dissociadas ao longo do seu eixo dorso-ventral, em particular em

relação ao controle das emoções, comportamentos associados a emocionalidade (Engin, 2007). O hipocampo é uma região rica em neurônios que contêm NO e isso faz do hipocampo um alvo para a investigação dos efeitos do sistema nitrérgico na ansiedade em roedores. A enzima nNOS é constituinte, localizada no citosol,  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina-dependente, que está presente somente em células neuronais, dendritos, e axônios, tendo uma discreta localização em diferentes estruturas cerebrais (Förstermann et al., 1991). A NOS desempenha um papel importante na modulação do comportamento defensivo em roedores (Chiavegatto et al., 1998; Guimarães et al., 2005; Calixto et al 2001,2008), no entanto, o papel dos neurônios que contêm nNOS em HPCv ainda não está bem definido. Nossos resultados mostraram que os ratos tratados com PBS exibiram uma aprendizagem a partir do comportamento de esquiva inibitória dos braços abertos no teste LTE. O tratamento com L-NAME no HPCv diminuiu o tempo de permanência braços abertos em relação ao grupo controle, na dose de 200 nmol, mas não em doses superiores ou inferiores, obtendo-se uma curva dose-resposta em U como visto no VL. A administração de 7-NI, um composto heterocíclico que inibe preferencialmente a nNOS, no HPCv apresentou um efeito do tipo ansiolítico, prejudicando o comportamento de esquiva inibitória dos braços abertos no LTE, com doses 10 ou 20 nmol. Esse efeito talvez se deva a uma redução do medo, motivando os animais a explorar o labirinto e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de permanência no braço fechado.

Já foi demonstrado que os inibidores da NOS interagem em uma variedade de maneiras, dependendo dos sítios de complexação, diferentes de tempo e substrato-dependência e mecanismo de inibição. Ambos os inibidores utilizados neste estudo, 7-NI e L-NAME induziram um efeito do tipo ansiolítico semelhantes no LTE. No entanto, o efeito observado por 7-NI foi mais evidente, uma vez que este fármaco

apresenta um perfil de preferência na inibição da nNOS em relação ao L-NAME. 7-NI atua junto ao BH4 vinculado ao sítio localizado adjacente a L-Arg na região do cofator heme nos processos de inibição enzimática da NOS, sem causar um aumento na pressão sanguínea, conhecido por ser dependente de eNOS (Moore et al., 1997), pois atravessa a barreira hemato-encefálica (Alderton et al., 2001). O L-NAME, por sua vez, é um inibidor não-seletivo da NOS, que concorre com o sítio da L-Arg pelo seu substrato (Moore et al., 1997).

A literatura mostra o papel chave do hipocampo nos mecanismos associados ao comportamento defensivo, ao medo e à ansiedade (Gray e McNaughton, 2000; Bannerman et al., 2004 A). Como já citado, o hipocampo é funcionalmente dividido ao longo do eixo dorso-ventral (Degroot e Treit, 2004; Moser e Moser, 1998), sendo a região ventral, mas não a dorsal, envolvida na modulação das respostas aversivas a estímulos inatos. O HPCv medeia as respostas de ansiedade inatas, como a esquiva dos braços abertos, enquanto o HPCd é mais especializado em funções cognitivas e memória (Bannerman et al., 2004 B). A região ventral do hipocampo difere da parte dorsal em suas conexões anatômicas, projetando para o córtex pré-frontal (Jay e Witter, 1991; Verwer et al., 1997), além de estar intimamente ligado ao núcleo do leito da estria terminal e à amígdala (Petrovich et al., 2001; Pitkanen et al., 2000; Swanson e Cowan, 1977), assim como a outras estruturas sub-corticais associadas ao eixo HPA (Burwell et al., 1995; Jacobsen e Sapolsky, 1991).

Alguns estudos mostram que lesões do HPCv induzem efeitos do tipo ansiolíticos em diferentes modelos animais de ansiedade (Gray e MacNaughton, 2000; Bannerman et al., 2004 B). Assim, a administração de lidocaína no HPCv imediatamente após o estresse social reduz significativamente o efeito ansiogênico produzido pela derrota (Calfa et al., 2007). Em concordância e estendendo os dados

da literatura, nossos dados mostram que a injeção intra-HPCV de SNP, um doador de NO, promove um efeito do tipo ansiogênico no LTE, indicando que o aumento de NO no HPCv facilita a esquiva inibitória, sugerindo uma modulação tônica do medo condicionado (aprendido) pelo sistema nitrérgico nesta estrutura cerebral, efeito este (ansiogênico) já pode ser observado durante a Esq1. Nossos dados também mostram a participação da via da guanilato-ciclase neste efeito já que o ODQ (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1-ona), um inibidor altamente seletivo de GC, assim como o AM, promoveu efeitos do tipo ansiolítico e o efeito ansiogênico do SNAP foi bloqueado pela co-administração AM e SNAP (dados não apresentados).

Assim, o conjunto de nossos resultados mostra que o NO está envolvido não só na modulação do medo inato (Calixto et al., 2008a), mas também do medo aprendido (via HPCV; Calixto et al., 2008b), em concordância com a hipótese de que a via NO/cGMP exerce um papel modulatório positivo nas reações de defesa avaliadas no LTE. No entanto, este papel do NO ocorre provavelmente via interação com outros neurotransmissores, como o glutamato, a serotonina e o GABA (Guimarães et al., 2005; Wulsch et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Resstel et al., 2008). A importância de nossos achados está, portanto, no fortalecimento do entendimento de alvos alternativos, no caso o sistema nitrérgico, para o tratamento clínico de distúrbios de ansiedade, como apontado por Strohle (2005).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no nosso trabalho permitem-nos concluir que:

- O tratamento com L-NAME, inibidor não seletivo de NOS, na dose de 200nmol afetou o medo condicionado, promoveu um efeito do tipo-ansiolítico em ratos avaliados ao LTE, caracterizado pelo prejuízo da esquiva inibitória e alterou o comportamento de fuga no ventrículo lateral.
- O efeito ansiolítico do L-NAME 200nmol foi mantido quando este inibidor foi administrado nas demais regiões que regulam o comportamento defensivo, estudadas neste trabalho, exceto no NLET, indicando a participação destas estruturas na regulação do medo aprendido pelo NO.
- A administração de 7-NI, inibidor preferencial de nNOS, no hipocampo ventral mostrou um perfil ansiolítico, indicando que a inibição da nNOS prejudica o comportamento de esquiva inibitória dos braços abertos do LTE, e aumentou o tempo que o animal levou para fugir na dose de 20nmol do braço aberto nesta região.
- O SNP, doador de NO, por outro lado, facilitou a resposta de esquiva inibitória (Esq1) e este efeito foi bloqueado com a co-administração de AM e SNP, reforçando o papel do NO na regulação do medo no hipocampo ventral .
- Assim, o hipocampo ventral (HPCv) parece ter uma papel chave na regulação do medo condicionado e do medo inato, pois a manipulação farmacológica do sistema nitrérgico nesta região afetou tanto o comportamento de esquiva inibitória, como a fuga dos braços abertos do LTE, respectivamente.
- Em conjunto, nossos resultados mostram que o NO participa do medo condicionado e do medo inato via hipocampo ventral, em ratos avaliados no



LTE, o que está de acordo com a hipótese de que a via NO/cGMP exerce um papel modulatório positivo nas reações de defesa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert DJ, Walsh ML, White R. Rearing rats with mice prevents induction of mouse killing by lesions of the septum but not lesions of the medial hypothalamus or medial accumbens. *Physiol Behav.* 1984; 32(1):143-5.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(3):593-615.
- Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem Res.* 2008;10:11064-008-9697-6.
- Bannerman DM, Deacon RM, Offen S, Friswell J, Grubb M, Rawlins JN. Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral Neuroscience.* 2002; 116: 884–901.
- Bannerman DM, Grubb M, Deacon RMJ, Yee BK, Feldon J, Rawlins JNP. Ventral Hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioral Brain Research.* 2003; 139:197-213
- Bannerman DM, McHugh SB, Deacon RM, Rawlins JN. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci.* 2004; 118:63-78 (a).
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28:273-83 (b).
- Barretta IP, Assruy J, De Lima TCM. Nitric oxide involvement in the anxiogenic-like effect of substance P. *Behav Brain Res.* 2001; 121:199-205.

- Benelli A, Bertolini A, Poggioli R, Caazzuti E, Cavazzuti E, Calza L, Giardino L, Arletti R. Nitric Oxide is involved in male sexual behavior of rats. *Eur J Pharmacol.* 1995; 294:505-10.
- Beijamini V, Guimarães FS. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Res Bull.* 2006; 69:347-55 (a).
- Beijamini V, Guimarães FS. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res.* 2006;170(1):52-61(b).
- Bertoglio LJ, Joca SRL, Guimarães FS (2006) Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res* 175:183–188.
- Bilbo SD, Hotchkiss AK, Chiavegatto S, Nelson RJ. Blunted stress responses in delayed type hypersensitivity in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol.* 2003;140:41-8.
- Blanchard DC, Williams G, Lee EMC, Blanchard RJ. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiological Psychology.* 1981; 9:157-163.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol.* 1972; 81:281-90.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. Aggressive behavior in the rat. *Behav Biol.* 1977; 21:197-224.
- Brady JV, Nauta WJ. Subcortical mechanisms in emotional behavior: affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1953; 46:339-46.

- Brady JV, Nauta WJ. Subcortical mechanisms in emotional behavior: the duration of affective changes following septal and habenular lesions in the albino rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1955; 48:412-20.
- Brandão M L, Cardoso S H, Melo L L, Motta V, Coimbra N C. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994; 18:339-46.
- Brandão ML, Vianna, D M, Masson S. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2003; 25:36-41.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999; 23:863-75.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric Oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci*. 1991; 12:125-8.
- Brodal P, Bjaalie JG. Organization of the pontine nuclei. *Neurosci Res*. 1992; 13:83-118.
- Brookes PS, David W, Shiva SK, Doeller\_EJ, Barone MC, Rakesh RP, Lancaster LR, Darley-Usmar V. Control of Mitochondrial Respiration by NO Effects of Low Oxygen and Respiratory State. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2003; 34: 31603–31609.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus*. 1995; 5:390-408.

- Calfa G, Bussolino D, Molina VA. Involvement of the lateral septum and the ventral Hippocampus in the emotional sequel induced by social defeat: role of glucocorticoid receptors. *Behav Brain Res* 2007;181:23-34.
- Calixto AV, Vandresen N, De Nucci G, Moreno H, Faria MS. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. *Brain Res Bull.* 2001; 55:37–42.
- Calixto AV, Duarte FS, Moraes CKL, Faria MS, De Lima TCM. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. *Behavioural Brain Research.* 2008; 189:341–349.
- Calixto, AV, Duarte FS, Duzzioni M, Nascimento Häckl LP, Faria MS, De Lima TCM. Role of ventral hippocampal oxide nitric/cGMP pathway in the anxiety-related behaviors in rats as evaluated in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 2008 (submetido à publicação).
- Cappendijk SL, Duval SY, de Vries R, Dzoljic MR. Comparative study of normotensive and hypertensive nitric oxide synthase inhibitors on morphine withdrawal syndrome in rats. *Neurosci Lett.* 1995;183:67-70.
- Canteras NS, The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2002; 71:481-491.
- Carrive P, Bandler R. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal gray: A correlative functional and anatomical study. *Brain Research*, 1991; 541:206-215.
- Chen J, Qin J, Liu X, Han Y, Yang Z, Chang X, Ji X, Nitric oxide-mediated neuronal apoptosis in rats with recurrent febrile seizures through endoplasmic reticulum stress pathway. *Neuroscience Letters.* 2008, 10.1016.

- Chiavegatto S, Scavone C, Canteras NS. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport*. 1998; 9:571-6.
- Conde CA, Costa V, Tomaz C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999; 63:63–69.
- Czech DA, Kazel M, Harris JA nitric oxide synthesis inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester attenuates lipoprivic feeding in mice. *Physiology Behavior*. 2003; 80:75-79.
- Davidson JR. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*. 2001; 62:46-50.
- Davis M, Falls WA, Miserendino MJ. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdale. *J Neurosci*. 1992; 12:854-63.
- Davis M, Shi C. The amygdala. *Curr Biol*. 2000; 24:10:131.
- Davis M, Whalen PJ. The amygdale: vigilance and emotion. *Mol. Psychiatry*. 200;1 6:13-34.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88:7797-801.
- DeGroot A, Treit Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res*. 2004; 1001:60-71.
- DeGroot A, Treit D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience*. 2003; 117:493-501.

- De Oliveira RMW, Deakin JF, Guimarães FS. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) expression in the hippocampal formation of patients with schizophrenia and affective disorder. *J Psychopharmacol*. 2000; 14:8-12.
- De Oliveira RW, Del Bel EA, Guimarães FS. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsal periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001; 25:679-685.
- De Oliveira RW, Guimarães FS. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32:1529-1532.
- De Oliveira HC, Wulff A, Saviani EE, Salgado I. Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1777:470-6.
- Doyler CA, Slater P. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience*. 1997; 76: 387-395.
- Dunn RW, Reed AT, Copeland PD, Frye CA. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*. 1998; 37:899-904.
- Dusse, L.M.S.A.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2003. 39;4.
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. Two functional components of the hippocampal memory system. *Behavioral and Brain Sciences*. 1994; 17:449-517.
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience*. 2004; 125:981-93.

- Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol.* 2007; 18:365-74.
- Flausino Jr., O.A., Zangrossi Jr., H., Salgado, J.V., Viana, M.B. Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71, 251–257.
- Faria MS, Muscara MN, Moreno Jr H, Teixeira SA, Dias HB, Graeff FG, De Nucci G. Acute inhibition of the L-Arginine/nitric oxide pathway induces anxiolysis in the elevated plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 323:91–94.
- Fendt M, Endres T, Apfelbach R. Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethyl thiazoline, a component of fox feces. *J. Neurosci.* 2003; 23:23–28.
- Fendt M, Fanselow M S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosc Biobehav Rev.* 1999; 23:743-760.
- Feil R, Kleppisch T. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol.* 2008; 184:529-60.
- Flora FR, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2000; 46, 3:265-271.
- Förstermann U, Kleinert H. Nitric Oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1995; 352:351-64.
- Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42:1849-57.



- Forestiero D, Manfri CM, Guimrães FS, de Oliveira RM. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; 184:166-72.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373-376.
- Ferreira VM, Valenzuela CF, Morato GS. Role of nitric oxide-dependent pathways in ethanol-induced anxiolytic effects in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 1999; 23:1898-904.
- File SE, Kenny PJ, Cheeta S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 66:65-72.
- Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*. 1991; 14:60-7.
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di SM, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:3491-3495.
- Gewirtz JC, Mcnish KA, Davis M. Lesions of the medial Nucleus of stria terminalis block sensitization of the acoustic startle reflex produced by repeated stress, but not fear-potentiated startle. *Psychopharm Biol Psychitat*. 1998; 22:625-848.
- Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997; 418:291-6.
- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*. 1998; 273:11038-43.

- Graeff FG, Audi EA, Almeida SS, Graeff EO, Hunziker MH. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990; 14:501-6.
- Graeff FG. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res* 1981; 14:239–65.
- Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998; 23:237-46.
- Graeff FG. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: London: Macmillan Press. 1991; 288–312.
- Graeff FG, Schenberg LC. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1978; 9:287-95.
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J. Med Biol Res* 1993; 23:67-70.
- Graeff FG, Viana MB, Mora P. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21:791–9.
- Gray JA, McNaughton N. Anxiolytic action on the behavioral inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 2000; 61:161-76.
- Gray JA, *The neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system.* Oxford University Press. Oxford 1982.
- Guimarães FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2005; 29:1313–1322.

- Guimarães FS, De Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport*. 1994; 5:1929–1932.
- Hadeishi Y, Wood RI. Nitric oxide in mating behavior circuitry of male Syrian hamster brain. *J Neurobiol*. 1996; 30; 480-92.
- Handy RL, Wallace P, Gaffen ZA, Whitehead KJ, Moore PK. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the mouse. *Br J Pharmacol*. 1995;116:2349-50.
- Handley SI, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 1984; 327:1-5.
- Hecker M, Cattaruzza M, Wagner AH. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*. 1999; 32:9-16.
- Hecker M, Schott C, Bucher B, Busse R, Stoclet JC. Increase in serum NG-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol*. 1995; 275:1-3.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 157:87-94.
- Hölscher C. Nitric Oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 1997; 20:298-303.
- Ignarro LJ, Buga G M, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84:9265-9269.

- Igram DK, Spangler EL, Kametani H, Meyer RC, London ED. Intracerebroventricular injection of N $\omega$ -nitro-L-Arginina in rats impairs learning in a 14-unit T-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 341:11-16.
- Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of the rat. *Behavioral and Neural Biology.* 1992; 58:16–2.
- Jacobsen L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Review* 1991; 12:118-134.
- Jay TM, Witter MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferent in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 1991; 313:574-86.
- Joca SR, Guimarães FS, Del-Bel E. Inhibition of nitric oxide synthase increases synaptophysin mRNA expression in the hippocampal formation of rats. *Neurosci Lett.* 2007; 421:72-6. Epub 2007 May 24.
- Joca SR, Guimarães FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. 2006; 185:298-305.
- Katayama Y. Nitric Oxide: Mysterious Messenger. *Dojindo NewNSLetter.* 1995;1.
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide.* 1997; 1:107-20.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002; 99:10825–10830.

- Lammas S, Marsden P A, Li G K. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89:6348-6352.
- LeDoux JE, Iwata J, Cichetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *Journal of Neuroscience.* 1988, 8: 2517-2529.
- Lee Y, Davis M. Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotrophin releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J. Neurosci.* 1997; 17: 6434–6446.
- Leza JC, Lizasoain I, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P. Correlation between brain nitric oxide synthase activity and opiate withdrawal. *Naunyn\_Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996; 353:349-54.
- Levita L, Hammack SE, Mania I, Li X I, Davis M, Rainnie DG. 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub>-like receptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: electrophysiological and behavioral studies. *Neuroscience.* 2004; 128: 583–596.
- Li S, Chung E, Quock RM. Role of cyclic GMP in nitrous-oxide-induced anxiolytic-like behavior in the mouse light-dark exploration test. *Behav Neurosci.* 2004;118:648-52.
- Li S, Quock RM. Effects of a nitric oxide donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. *Eur J Pharmacol.* 2002; 447:75-8.
- Lores-Arnaiz S, Boveris A, D'Amico G, Costa LE. Enalapril increases mitochondrial nitric oxide synthase activity in heart and liver. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5:6917.
- Lowenstein C. Snyder S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 1992; 70:705-707.

- Maren S, Quirk GJ. Neuronal signaling of fear memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5:844-52.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994; 78:927-30.
- Masood A, Banerjee B, Vijayan VK, Ray A. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003; 458:135-9.
- Mayer ML, Miller RJ. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in mammalian neurons. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; 11:254-60.
- Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol.* 1993; 26:45:367-74.
- McHugh SB, Deacon RMJ, Rawlins JNP, Bannerman M. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience.* 2004; 118:63–78.
- Medina JH, Izquierdo I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol Learn, Mem.* 1995; 63:113-115.
- Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999; 23:591–613.
- Moncada S, Higgs A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J. Review* 1995; 9:1319-30.
- Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 30:2002-2012.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-42.

- Monzón ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*. 2001; 22:1043-7.
- Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol*. 1991; 102:198-202.
- Moore PK, Handy RL. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase-is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18:204-11.
- Moreira FA, Guimarães FS. Lack of effects of clomipramine on Fos and NADPH-diaphorase double-staining in the periaqueductal gray after exposure to an innate fear stimulus. *Physiol Behav*. 2008; 94:316-21.
- Morley JE, Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci*. 1991; 49: 707-717.
- Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 1998; 8:608-19.
- Nascimento-Häckl LP, Carobrez AP. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2007; 88:177-85.
- Nashold BS Jr, Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg*. 1969; 30:14-24.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6:3051-64.

- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Behavioral abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 378, 383.
- Nowicki JP, Duval D, Poignet H, Scatton B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol*. 1991; 204:339-40.
- Nutt DJ, Glue P. Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: a psychopharmacological perspective. *Pharmacol Ther*. 1989;44:309-34.
- O'Keefe J, Nadel L. *The hippocampus as cognitive map*. Oxford, University Press, Oxford. 1978.
- Onstott B, Mayer B, Beitz AJ. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral periaqueductal gray of rats analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res*. 1993; 610:3317-24.
- Oosthuizen F, Wegener G, Harvey BH. Nitric oxide as inflammatory mediator in post-traumatic stress disorder (PTSD): evidence from an animal model. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2005; 1:109-23.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature*. 1987; 32: 524-526.
- Palmer RMJ, Rees DD, Aston DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 153:1251-6.
- Paige JS, Jaffrey SR. Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting NOS dimerization and protein-protein interactions. *Curr Top Med Chem*. 2007; 7:97-114.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, Academic Press, 1986.



- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985; 14:149-67.
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*. 2001; 38:247–289.
- Pentkowski NS, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard RJ. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*. 2006; 23: 2185–2196.
- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 911:369-91.
- Pitkanen A, Jolkkonen E, Kempainen S. Anatomic heterogeneity of the rat mygdaloid complex. *Folia Morphol (Warsz)*. 2000; 59:1-23.
- Poderoso JJ, Lisdero C, Schöpfer F, Riobó N, Carreras MC, Cadenas E, Boveris A. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem*. 1999; 274:37709-16.
- Poltronieri, S.C., Zangrossi Jr., H., Viana, M.B., 2003. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res*. 147, 185–192.
- Quock RM, Nguyen E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci*. 1992; 51:PL255-60.
- Rashatwar SS, Cornwell TL, Lincoln TM. Effects of 8-bromo-cGMP on  $Ca^{+2}$  levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of  $Ca^{+2}$  -ATPase by sGMPc – dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:5685-5689.

- Resstel LB, Corrêa FM, Guimarães FS. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2008; 18:2027-35.
- Risold PY, Swanson L W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*. 1996; 272:1484-1486.
- Roohbakhsh A, Moghaddam AH, Massoudi R, Zarrindast MR. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34:223-9.
- Rosa WC, Oliveira GM, Nakamura-Palacios EM. Effects of the antihypertensive drugs alpha-methyldopa and hydralazine on the performance of spontaneously hypertensive rats in the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27:55-9.
- Sakae DY, Pereira LO, da Cunha IC, de Lima TC, Paschoalini MA, Faria MS. Systemic administration of a nitric oxide synthase inhibitor impairs fear sensitization in the plus-maze. *Neurobiol Learn Mem*. 2008; 90:455-9.
- Santos P, Bittencourt AS, Schenberg LC, Carobrez AP. Elevated T-maze evaluation of anxiety and memory effects of NMDA/glycine-B site ligands injected into the dorsal periaqueductal gray matter and the superior colliculus of rats. *Neuropharmacol* 2006; 51:203-12.
- Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*. 1991; 254:1503-6.
- Seddon MD, Chowienczyk PJ, Brett SE, Casadei B, Shah AM. Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. *Circulation*. 2008; 117:1991-6.

- Silveira MC, Zangrossi H, Viana MB, Silveira R, Graeff FG. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 2001; 126:13–21.
- Snyder SH, Bredt DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12:125-8.
- Spiacci A Jr, Kanamaru F, Guimarães FS, Oliveira RM. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 88:247-55.
- Spolidório PCM, Echeverry MB, Iyomasa M, Guimarães FS Del Bel EA. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide–cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychophar.* 2007; 195:183–192.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: A synthesis of findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Reviews.* 1992; 99:195-231.
- Squire LR, Stark CEL, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annual Review Neuroscience.* 2004; 27:279-306.
- Ströhle A. New pharmacological treatment approaches for anxiety disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 2005; 169:503-26.
- Sullivan G M, Apergis J, Bush DEA, Johnson LR, Hou M, Le Doux JE. Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus, *Neuroscience.* 2004; 128:7–14.
- Swanson LW, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 1977; 172:49-84.

- Takahashi LK, Nakashima BR, Hong H, Watanabe K. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience Biobehavioral Review*. 2005; 29:1157-67.
- Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 1998; 273:11044-8.
- Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 65:571-6.
- Trivedi MA, Coover GD. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2004; 81: 172–184.
- Vazdarjanova A. Does the basolateral amygdala store memories for emotional events. *Trends Neurosci*. 2000; 23:345-6.
- Verwer RW, Meijer RJ, Van Uum HF, Witter MP. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*. 1997; 7:397-402.
- Vianna DML, Brandão ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian J Med Biol Research* .2003; 36:557-566.
- Viana MB, Tomaz C, Graeff FG. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1994; 49:549–554.
- Vincent SR. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1994; 42:129-60.
- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992; 46: 755–784.

- Volke V, Köks S, Vasar E, Bourin M, Bradwein J, Männistö PT. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. *Neuroreport* 1995; 6:1413-1420.
- Volke V, Soosaar A, Köks S, Vasar E, Männistö PT. L-Arginine abolishes the anxiolytic-like effect of diazepam in the elevated plus-maze test in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998; 351:287-90.
- Volke V, Wegener G, Vasar E. Augmentation of the NO-cGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. *J Physiol Pharmacol.* 2003; 54:653-60 (a).
- Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behav Brain Res.* 2003; 140(1:141-7 (b).
- Zhang J, Dawson T M, Snyder S H. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthase in Neurotoxicity. *Science.* 1994; 263: 687-689.
- Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995; 35:213-33.
- Zarrindast MR, Babapoor-Farrokhran S, Babapoor-Farrokhran S, Rezayof A. Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety-related behavior. *Life Sci* 2008; 82:1175-81.
- Zeman W, King FA. Tumors of the septum pellucidum and adjacent structures with abnormal affective behavior: an anterior midline structure syndrome. *J Nerv Ment Dis.* 1958; 127:490-502.
- Weitzdoerfer R, Hoeger H, Engidawork E, Engelmann M, Singewald N, Lubec G, Lubec B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide.* 2004; 10:130-40.

Wulsch T, Chourbaji S, Fritzen S, Kittelt S, Grünblatt E, Gerlach M, Gutknecht L, Chizat F, Golfier G, Schmitt A, Gass P, Lesch KP, Reif A. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. *J Neural Transm Suppl.* 2007; 72:69-85.

## 8. APÊNDICE

Os dados apresentados abaixo são de experimentos em que foram feitas curvas dose-resposta a outros compostos que alteram a transmissão nitrérgica, como o ODQ, um inibidor altamente seletivo, irreversível, do sítio heme da guanilato ciclase solúvel que compete com o NO pelo mesmo sítio de ligação (Garthwaite et al 1991) o AM (azul de metileno), um inibidor da estimulação da guanilato ciclase mediada por NO amplamente usado para inibir processos mediados pelo GMPc (Mayer B et al., 1993), e o SNP (nitroprussiato de sódio), um doador de óxido nítrico que aumenta os níveis de GMPc (Dusse et al 2003), em doses descritas na literatura e usando nosso protocolo experimental. Esses dados não aparecem no corpo da tese, assim como nos artigos. O ODQ é diluído com 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) que centralmente destrói membrana e como apresentou resultado semelhante ao AM optamos em usar no corpo da tese os resultados do AM.

O estudo cujos resultados estão na primeira tabela foi realizado com ratos *Wistar* machos e, na segunda tabela, o estudo usou camundongos *Swiss* machos. Os experimentos foram realizados na maioria com ratos, foi utilizado camundongo neste experimento para padronizar o modelo também com esta espécie de animal.

**Tabela 2** - Efeito da injeção de ODQ (50 nmol), AM (10 ou 30nmol) e SNP (20 e 80 nmol) no Hipocampo Ventral de ratos, avaliados no teste do labirinto em T elevado.

SÍTIO DE INJEÇÃO	Parâmetros comportamentais	Tratamentos					
		PBS (n=10)	ODQ 50nmol (n=7)	AM 10nmol (n=7)	AM 30nmol n=7)	SNP 20nmol (n=8)	SNP 80nmol (n=8)
HPCv	LB	12,40±4,82	8±2,28	28,28±5,47	20,28 ± 8,23	20,87 ± 9,19	20,5 ± 9,18
	ESQ1	48±28,45	10,85±3,35	58±13,49	84,28±39,26	36,62 ± 12,16	250 ± 25,63*
	ESQ2	179,1±45,3*	20±7,72 <sup>#</sup>	222,8±40,71*	52,71 ± 14,14 <sup>#</sup>	198,62±41,62*	296,25±3,75*
	FUGA	25,1±6,2	90,14±23,98	36,28 ± 9,35	35,57±10,45	43,62 ± 8,68	29,62 ± 9,96

Os dados são apresentados como média ± EPM. Abreviaturas: HPCv = Hipocampo Ventral. LB = linha de base, ESQ = esquiva. \* $p < 0,01$  quando comparados à linha de base, <sup>#</sup> $p < 0,01$  quando comparado ao grupo PBS. Os dados foram analisados pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o fator tratamento como variável independente e as tentativas (LB, ESQ1 e ESQ2), como medidas repetidas. O parâmetro Fuga foi analisado pela ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student Newman Keuls.

**Tabela 3** - Efeito da injeção central de L-NAME 200nmol e SNP (20 ou 80 nmol) em camundongos, avaliados no teste do labirinto em T elevado.

SÍTIO DE INJEÇÃO	Parâmetros comportamentais	Tratamentos			
		PBS (n=8)	L-NAME 200nmol (n=10)	SNP 20nmol (n=7)	SNP 80nmol (n=5)
i.c.v.	LB	13,87± 5,44	11,7 ±3,27	15,71 ±3,73	17,6± 5,93
	ESQ1	35 ±9,82	26,6± 18,93	25,28± 5,43	18,2± 55,92
	ESQ2	224,5±41,2*	34,9 ±29,5. <sup>#</sup>	212,85±48,24*	182,6± 71,9*
	FUGA	146,5±37,31	150,9± 35,4	164,42± 43,4	96,2± 54,5

Os dados são apresentados como média ± EPM. Abreviaturas: LB = linha de base, ESQ = esquiva. \* $p < 0,01$  quando comparados à linha de base. <sup>#</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo PBS. Os dados foram analisados pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o fator tratamento como variável independente e as tentativas (LB, ESQ1 e ESQ2), como medidas repetidas. O parâmetro Fuga foi analisado pela ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student Newman Keuls.