

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DA NEUROTRANSMISSÃO MEDIADA PELO ÓXIDO NÍTRICO NO
NÚCLEO DORSAL DA RAFE EM MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE E
DEPRESSÃO.**

Ailton Spiacci Junior

Maringá

2007

ALTON SPIACCI JUNIOR

Influência da neurotransmissão mediada pelo óxido nítrico no núcleo dorsal da rafe em modelos animais de ansiedade e depressão.

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria M. W. de Oliveira.

Maringá
2006

EPIGRAFE

“De fato, não fracasei ao tentar cerca de 10.000 vezes [...], simplesmente, encontrei 10.000 maneiras que não funcionam.”

Thomas A. Edison

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu e deu condições suficientes para a realização deste sonho, e a superar mais esta importante etapa da minha vida.

Aos meus pais Ailton Spiacci e Vani Fagá Spiacci, que me deram a vida, sempre me incentivaram nos estudos, deram-me total apoio, condições suficientes para a conquista de tudo que tenho e realização do mestrado.

Ao amor da minha vida Gabriela Bertequini Luiz, minha namorada, amiga, companheira e confidente, que esta sempre ao meu lado, pelo seu incentivo para a realização deste, que me apoiou e confortou em todos os momentos com sua paciência e sabedoria.

A professora Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira, pela orientação nesse trabalho, por todo seu esforço tornando possível a realização deste, por seus valiosos ensinamentos, pela sua dedicação e paciência ao repassar todo o seu conhecimento, por me iniciar na carreira científica, pela sua compreensão em relação às minhas limitações e pela sua eterna amizade.

Ao aluno Fábio Kanamaru, por sua inestimável colaboração na realização dos experimentos deste trabalho, assim como por sua eterna amizade.

Aos técnicos Marcos Alberto Trombelli e Solidalva, pelo apoio técnico, por seus valiosos ensinamentos e pela eterna amizade.

A todos os amigos do laboratório, por suas eternas amizades, pelo apoio, compreensão e alegria tornando assim agradável o ambiente de trabalho.

RESUMO

O núcleo dorsal da rafe (NDR) é um importante componente dos circuitos cerebrais envolvidos nas respostas de ansiedade e depressão. Densidades expressivas de neurônios produtores de óxido nítrico (NO) estão presentes no NDR. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos produzidos pela administração direta do precursor do NO, L-arginina (L-Arg), do inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME, e do análogo do GMPc, o 8-Br-GMPc, no NDR de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), teste do nado forçado (TNF) e campo aberto. Ratos Wistar machos (n= 8-12) receberam microinjeções de drogas ou salina no NDR, e após 10 min, foram submetidos à avaliação comportamental. L-Arg (100 e 200 nmol) aumentou a percentagem de tempo nos braços abertos no LCE, enquanto a administração de L-NAME (400 nmol) ou 8-Br-GMPc (25 e 50 nmol) diminuiu e aumentou, respectivamente, a atividade locomotora dos animais no LCE. Diminuição do tempo de imobilidade foi observado com baixas doses de L-Arg (50 nmol) e 8-Br-GMPc (12,5 e 25 nmol) no TNF, efeito este sugestivo de uma ação antidepressiva desses compostos; resultado oposto foi observado com L-NAME (100 e 200 nmol). No teste no campo aberto L-Arg (100 nmol) e L-NAME 200 (nmol) causaram aumento e diminuição respectivamente da atividade locomotora dos animais. Os efeitos podem estar relacionados com a produção de NO pelos neurônios do NDR, uma vez que o efeito do L-NAME foi revertido pela injeção de L-Arg. Estes resultados sugerem que o NO no NDR pode influenciar comportamentos relacionados à ansiedade e atividade motora. Estudos futuros serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nestes efeitos bem como a provável atividade antidepressiva do NO, independentemente dos efeitos motores.

Palavras-chave: Óxido nítrico, núcleo dorsal da rafe, ansiedade, depressão.

ABSTRACT

The dorsal raphe nucleus (DRN) has been considered an important component of the brain circuit that mediates anxiety- and depression-related behaviors. High densities of nitric oxide (NO)-producing neurons have been reported in the (NDR). The aim of this study was to evaluate the effects produced by direct administration of the NO precursor L-Arginine, the NOS inhibitor, L-NAME or the cGMP analogue, 8-Br-cGMP, into the DRN of rats submitted to the elevated plus maze (EPM) and the forced swim test (FST) and open field. Male Wistar rats (n=8–12/group) received intra-DRN microinjections of the drugs or saline and, 10 min later, were submitted to the behavioral tracing. L-Arginine (100 and 200 nmol) increased the percentage of time spent in the open arms of the EPM while the administration of NOS inhibitor L-NAME (400 nmol) and the cGMP analogue 8-Br-cGMP (25 and 50 nmol) decreased and increased, respectfully, the general motor activity of the animals. Antidepressant-like effects, characterized by a decrease in the immobility time, were observed with lower doses of L-Arginine (50 nmol) or 8-Br-cGMP (12.5 and 25 nmol) in the FST. An opposite effect was observed with L-NAME (100 and 200 nmol). Measurement of the open field test have demonstrated that these drugs interfere with locomotor activity. The behavioral effects can be linked to NO production in the DRN since the effect of L-NAME was counteracted by the injection of L-Arginine. The results suggest that NO may influence motor- and anxiety- related behaviors in the DRN. Further studies are needed to elucidate the mechanism involved in these effects and to address the question if it can also change depressive-like changes independently of motor effects.

Keywords: nitric oxide, dorsal raphe nucleus, anxiety, depression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EBA – percentagem de entrada nos braços abertos

%TBA – percentagem de tempo gasto nos braços abertos

5-HT – 5-hidroxi-tiptamina / serotonina

5-HT1A – receptor serotoninérgico do tipo 1A

7-NI – 7-nitroindazol

8-Br-GMPc – 8-bromo monofosfato ciclico de guanosina

8-OH-DPAT – 8-hidroxi 2-(di-n-propilamino)-tetralina

BH₄ – tetrahidrobiopterina

Ca⁺⁺ – íon cálcio

c-Fos – proteína c-fos

DEA/NO – dietilamina do óxido nítrico

EDRF – fator de relaxamento derivado do endotélio

eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPMs – erro padrão das médias

FAD – dinucleotídeo adenina flavina

Fe – ferro

FMN – mononucleotídeo flavina

GABA – ácido gama amino-butírico

GCs – enzima guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato ciclica

GTP – guanosina trifosfato

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzida

i.p. – administração intraperitoneal

L-Arg – L-arginina

LCE – labirinto em cruz elevado

L-HOARG – L-N-hidroxi-arginina

L-NAME – nitro-L-arginina metil ester

L-NOARG – L-nitro-arginina

NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

NDR – núcleo dorsal da rafe

NMDA – N-metil D-aspartato

NMR – núcleo mediano da rafe

nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal

nNOS^{-/-} – animais knockout para o gene da enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NOS – enzima óxido nítrico sintase

NOSs – enzimas óxido nítrico sintases

PE-10 – polietileno

PVC – policloreto de vinila

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SIN1 – 3-morfolinosilnomina

SNAP – S-nitroso N-acetil penicilamina

SNC – sistema nervoso central

TNF – teste do nado forçado

UEM – Universidade Estadual de Maringá

WAY-100635 – N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazil]etil]-N-(2-piridinil)-ciclohexanocarboxamida

LISTA DE SÍMBOLOS E GRANDEZAS

°C – graus Celsius

°g – graus Gay-Lussac

μl – microlitro

μM –micromolar

cm – centimetro

gr – grama

h – hora

kDa – quilodalton

mg/kg – miligrama por quilograma

ml – mililitro

mm – milimetro

nmol – nanomol

s – segundos

W – WATTS

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	10
1.1 – Óxido Nítrico e Sistema Nervoso Central.....	14
1.2 - O Núcleo Dorsal da Rafe e o NO	16
1.3 – Participação do NO na Ansiedade e Depressão	18
1.4 - O NO e a Atividade Locomotora.....	20
2 - OBJETIVO	22
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 - Animais.....	25
3.2 - Drogas	25
3.3 – Procedimento	26
3.3.1 – Cirurgia.....	26
3.3.2 - Injeção de Drogas no NDR	27
3.3.3 - Avaliação Comportamental	27
3.3.3.1 - Labirinto em Cruz Elevado.....	27
3.3.3.2 – Teste do Campo Aberto	28
3.3.3.3 - Teste do Nado Forçado.....	28
3.3.4 - Análise Histológica.....	29
3.4 - Análise Estatística.....	31
4 – RESULTADOS.....	32
4.1 Labirinto em Cruz Elevado/Campo Aberto.....	33
4.2 – Teste do Nado Forçado	35
5 – DISCUSSÃO	47
6 – CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 – INTRODUÇÃO

Em 1980 Furchgott & Zawadzki relataram que o efeito vasodilatador induzido pela acetilcolina ocorreria devido a uma substância liberada pelas células do endotélio vascular, mediando o relaxamento da musculatura lisa. Esta substância, denominada de *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF), foi posteriormente identificada como óxido nítrico ([NO], PALMER *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987).

O NO constitui um gás incolor, altamente reativo e instável, difusível através das membranas biológicas; embora apresente meia-vida curta, é capaz de se propagar por centenas de micrômetros (WOOD & GARTHWAITE, 1994).

A síntese do NO ocorre pela deaminação oxidativa do aminoácido L-arginina (L-Arg) à L-citrulina com conseqüente liberação de NO (PALMER *et al.*, 1988). As enzimas que catalisam esta reação em mamíferos, fazem parte de uma família de enzimas denominadas de óxido nítrico sintases (NOS, KNOWLES & MONCADA, 1994; FORSTERMANN *et al.*, 1991). Estas, são hemoproteínas constituídas por duas subunidades idênticas com massas moleculares médias entre 125 - 155 kDa (STUEHR *et al.*, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1991; YUI *et al.*, 1991; POLLOCK *et al.*, 1991).

A família das NOSs possui 3 isoenzimas: a NOS neuronal (nNOS), também conhecida como tipo I, a induzida (iNOS) ou tipo II e a endotelial (eNOS) ou tipo III (OGDEN & MOORE, 1995; FORSTERMANN *et al.*, 1991), sendo que as isoformas apresentam homologia de 50 a 60% entre si (SESSA, 1994; LOWENSTEIN *et al.*, 1992). As três isoformas apresentam domínios catalíticos semelhantes (figura 01), sendo um domínio oxigenase, N-terminal, que apresenta arquitetura semelhante ao

do citocromo P450 (BREDDT *et al.*, 1991), onde estão localizados os sítios de ligação para o grupamento heme, para a tetrahydrobiopterina (BH₄) e para L-Arg, e um domínio redutase, C-terminal, que apresenta sítios de ligação para o dinucleotídeo adenina flavina (FAD), para o mononucleotídeo flavina (FMN) e para o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida [(NADPH) MCMILLAN & MASTERS, 1995; GHOSH & STUEHR, 1995; RICHARDS & MARLETTA, 1994].

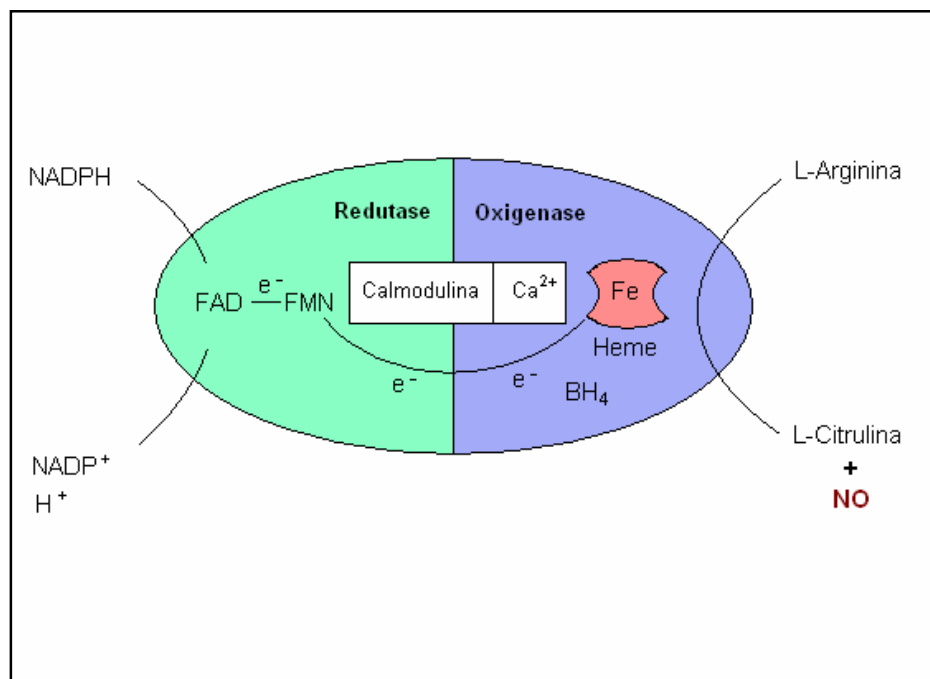


Figura 01 – Representação esquemática da enzima NOS. Os elétrons doados pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) no domínio redutase atingem o grupo heme no domínio oxigenase via dinucleotídeo adenina flavina (FAD)/ mononucleotídeo flavina (FMN), onde interagem com o ferro (Fe) e tetrahydrobiopterina (BH₄), convertendo a L-Arginina em L-Citrulina, consequentemente liberando NO.

A eNOS é uma enzima constitutiva das células do endotélio vascular, dependente de cálcio (Ca⁺⁺) ligado ao sítio calmodulina (POLLOCK *et al.*, 1991; BREDDT & SNYDER, 1990), e está associada à membrana celular por meio de um sítio N-terminal (POLLOCK *et al.*, 1992). O NO produzido pelas células endoteliais promove relaxamento da musculatura lisa vascular acarretando vasodilatação; este também

promove a inibição da agregação plaquetária e a inibição da proliferação celular da musculatura lisa vascular (MONCADA *et al.*, 1991).

A iNOS está presente nos macrófagos e neutrófilos, sendo esta independente do complexo Ca^{++} /calmodulina e sua ativação se dá por certas citocinas ou lipopolissacarídeos. Contrária as outras isoenzimas, a iNOS pode produzir grandes quantidades de NO por um longo período de tempo (STUEHR *et al.*, 1991). Por ser um radical livre, o NO produzido pelos macrófagos age como um agente citostático e citotóxico (MONCADA *et al.*, 1991).

A nNOS, é uma enzima constitutiva, muito semelhante a eNOS, dependente de complexo Ca^{++} /calmodulina (BREDT & SNYDER, 1990). Está presente no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico (SCHMIDT *et al.*, 1992; SPRINGALL *et al.*, 1992; BREDT *et al.*, 1990) e na musculatura esquelética (NAKANE *et al.*, 1993).

Quando ativada, a NOS sintetiza o NO em duas etapas: na primeira etapa o NADPH doa elétrons a um sítio redutase da NOS, sendo a L-Arg convertida em N-hidroxi-L-arginina (L-HOARG); em uma segunda etapa ocorre a oxidação da L-HOARG em citrulina com a conseqüente liberação do NO. As duas etapas são catalisadas pela NOS, sendo necessário Ca^{++} ou magnésio, calmodulina e NADPH como co-fatores. (ALDERTON *et al.*, 2001; OGDEN & MOORE, 1995; MAYER *et al.*, 1991). Depois de sintetizado, o NO difunde-se por centenas de micrometros, podendo interagir com diferentes alvos. As ações fisiológicas do NO, com exceção do produzido pela iNOS o qual age como radical livre, estão principalmente relacionadas com a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) sensível ao NO que, por sua vez, catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em 3'5'-monofosfato cíclico de

guanosina (GMPc) elevando os níveis deste nas células (KRUMENACKER *et al.*, 2004; SCHUMAN & MADISON, 1994). O NO quando ligado a GCs, é capaz de elevar em 200 vezes sua taxa catalítica (FRIEBE & KOESLING, 2003). O aumento no nível intracelular de GMPc, pode interferir diretamente na permeabilidade de canais iônicos, como por exemplo os de potássio (KASTER *et al.*, 2005; NAKAMURA & GOLD, 1987), modificar a atividade de fosfodiesterases dependentes de GMPc ou ativar quinases dependentes de GMPc (FRIEBE & KOESLING, 2003).

1.1 – O Óxido Nítrico e o Sistema Nervoso Central

A partir de 1981 quando Green *et al.* demonstraram que células de mamíferos eram capazes de sintetizar óxidos de nitrogênio, muitos pesquisadores tentaram evidenciar quais células seriam capazes de gerar NO, nitrito e nitrato, e quais as suas funções.

A evidência relatada por Garthwaite *et al.* (1988) de que o NO era produzido no SNC bem como a presença da enzima NOS no cérebro de ratos (BREDT *et al.*, 1991), fez com que diversos pesquisadores reconhecessem o NO como neurotransmissor, neuromediador, neuromodulador ou segundo mensageiro do SNC (LEDO *et al.*, 2004; ESPLUGUES, 2002; BREDT & SNYDER, 1994; SOUTHAM & GARTHWAITE, 1993; MONCADA *et al.*, 1991).

Utilizando técnicas de histoquímica para a detecção da atividade enzimática da NADPH-diaforase, imunohistoquímica para identificação da nNOS e hibridização *in situ* para detecção do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) da nNOS, inúmeros trabalhos demonstraram a distribuição desta enzima em diversas estruturas límbicas

do SNC. Altas densidades da nNOS foram encontradas nos córtices piriforme e cingulado, núcleos hipotalâmicos, córtex pré-frontal, substância cinzenta periaquedutal, núcleos da rafe e núcleos amigdalóides (VINCENT & KIMURA, 1992; BREDET *et al.*, 1991).

Devido sua ampla distribuição no SNC, o NO participa de diversos processos fisiológicos, por exemplo: na modulação da liberação de vários transmissores neurais (SILVA *et al.*, 2003; KAEHLER *et al.*, 1999; GETTING *et al.*, 1996; SEGIETH *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1995), ciclo circadiano (KAMERMAN *et al.*, 2002), aprendizado e memória (WASS *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2005), olfato (OKERE & KABA, 2000), potenciação à longo prazo (O'DELL *et al.*, 1994), depressão à longo prazo (SHIBUKI & OKADA, 1991), sono (CLEMENT *et al.*, 2005), ansiedade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001), atividade locomotora (DEL BEL *et al.*, 2005), dor (PRADO *et al.*, 2002; KAWABATA *et al.*, 1993), plasticidade sináptica (LI & WIERASZKO, 1994), dano neuronal (WEISSMAN *et al.*, 1992) e neurotoxicidade/neuroproteção (LIPTON *et al.*, 1993; BUISSON *et al.*, 1993). Outros autores relatam a participação do NO em processos patológicos, por exemplo: epilepsia (DEL-BEL *et al.*, 1997; MOLLACE *et al.*, 1991), doença de Alzheimer (NATHAN *et al.*, 2005), isquemia cerebral (CODERRE, 1993)

Dependendo da localização, a ativação da nNOS ocorre por dois mecanismos principais: a) estimulação de receptores associados ao influxo e/ou mobilização de Ca^{++} , ou b) abertura de canais de Ca^{++} -voltagem dependentes por potenciais de ação gerados nos terminais pré-sinápticos. No neurônio pós-sináptico, o maior estímulo para a formação do NO é a ativação de receptores de glutamato, especialmente os receptores do tipo NMDA (n-metil-d-aspartato), pois estes estão

efetivamente associados a um canal altamente permeável ao Ca^{++} (DAWSON *et al.*, 1991). Assim, o influxo de Ca^{++} ativa a nNOS promovendo a geração do NO, o qual por sua vez ativa as GCs presente na mesma célula ou em células vizinhas, acarretando um aumento nos níveis de GMPc intracelular (SCHUMAN & MADISON, 1994; GARTHWAITE *et al.*, 1988).

1.2 - O Núcleo Dorsal da Rafe e o NO

Os núcleos da rafe são constituídos por corpos celulares morfologicamente distintos e organizados, responsáveis pela produção de grande quantidade de serotonina (5-HT) no SNC (JACOBS & AZMITIA, 1992; MOLLIVER, 1987). Os núcleos da rafe podem ser classificados anatomicamente em: 1) núcleos caudais, localizados no bulbo, e compreendem os núcleos magno, obscuro e pálido da rafe, que são responsáveis pela produção da 5-HT encontrada no cordão espinhal, e, 2) núcleos rostrais, que compreendem os núcleos dorsais (NDR) e mediano da rafe (NMR), localizados na ponte e mesencéfalo, de onde partem fibras serotoninérgicas que inervam a várias estruturas prosencefálicas (JACOBS & FORNAL, 1999). As fibras originadas no NDR dirigem-se para o córtex pré-frontal, substância cinzenta periaqueductal, septo lateral, amígdala, striatum e hipocampo frontal; já as fibras originadas no NMR inervam o hipocampo dorsal, septo mediano, hipotálamo e córtex (MOLLIVER, 1987). As fibras nervosas provenientes do NDR e NMR compõem dois distintos sistemas serotoninérgicos, que diferem em suas características eletrofisiológicas, organização topográfica, morfologia, sensibilidade a neurotoxinas e agentes psicoativos (HENSLER, 2006).

Considerando a inervação serotoninérgica proveniente da rafe, Deakin & Graeff (1991) sugeriram que as vias 5-HT originadas no NDR, participariam ativamente das

respostas relacionadas ao estresse e a ansiedade. Assim as vias 5-HT que inervam a amígdala e o córtex frontal, facilitariam o medo condicionado, enquanto que vias que inervam o sistema periventricular e substância cinzenta periaquedutal dorsal inibiriam as reações de fuga e luta. Já as vias 5-HT originadas do NMR participariam de processos relacionados com a depressão (GRAEFF *et al.*, 1996).

Outros autores relatam a participação do NDR em variados processos fisiológicos como: dor, ciclo circadiano, sono e tônus muscular (HORNUNG, 2003). É importante destacar também a participação deste núcleo na atividade locomotora, como demonstrado por Hillegaart (1990), onde a administração de 5-HT ou do agonista seletivo para o receptor 5-HT_{1A}, 8-hidroxi 2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) no NDR resultou em marcante supressão da atividade locomotora em ratos.

Recentemente, Beijamini & Guimarães (2006a) evidenciaram que a exposição de ratos ao labirinto em cruz elevado (LCE, estímulo aversivo) ou a situações que geram reações de defesa, como por exemplo, a exposição de ratos a um predador (BEIJAMINI & GUIMARAES, 2006b), causam ativação de neurônios no NDR, observado pelo aumento da expressão de c-Fos, um marcador da ativação neuronal nesta região.

Utilizando técnicas de imunohistoquímica **Dun *et al.* (1994)** demonstraram a presença de neurônios imunorreativos para NOS no NDR de ratos. Neste mesmo estudo os autores mostraram que a maioria dos neurônios imunorreativos para NOS era também positiva para 5-HT evidenciando assim a co-localização do NO e 5-HT nos neurônios do NDR. Um estudo recente mostrou a co-localização de nNOS em cerca de dois terços dos neurônios serotoninérgicos do NDR (DE SILVA *et al.*, 2005).

Evidências experimentais indicam um papel modulador do NO sobre a liberação de 5-HT no SNC. Através do estudo *in vivo*, utilizando a técnica de microdialise, Pallotta *et al.* (1998) demonstraram que a infusão de NMDA (25 μ M) no núcleo da rafe de ratos, diminuiu substancialmente a concentração de 5-HT local com concomitante aumento da liberação de 5-HT no córtex pré-frontal; já a administração de NMDA (100 μ M) apresentou efeito oposto, o pré-tratamento com um inibidor seletivo da nNOS 7-nitroindazole (7-NI) injetado no mesmo núcleo aboliu completamente o efeito do NMDA na dose de (100 μ M). Com o auxílio da mesma técnica, observou-se que o doador de NO S-nitro-N-penicilamina (SNAP), quando administrado em baixas doses (500 μ M) na rafe diminuía a liberação local de 5-HT e aumentava a liberação no córtex pré-frontal, enquanto altas doses (5 mM), promovia efeitos opostos (SMITH & WHITTON, 2000). Estas evidências indicam que o NO na rafe pode modular a liberação de 5-HT em diversas regiões cerebrais.

1.3 – Participação do NO na Ansiedade e Depressão

A ocorrência de eventos estressantes, de natureza aguda ou crônica, tem sido sistematicamente associada ao desenvolvimento de estados emocionais como a ansiedade e a depressão (GRAEFF *et al.*, 1996; POST, 1992). Evidências experimentais mostram que o NO pode participar na modulação destes estados. Por exemplo, camundongos mutantes, com deleção do gene da nNOS (nNOS^{-/-}), quando colocados em uma arena, exibem comportamento mais agressivo se comparados a animais selvagens, iniciam mais ataques e não assumem postura submissa na presença do animal dominante (NELSON *et al.*, 1995). Estímulos aversivos como por exemplo, exposição de ratos ao LCE, ou que causem reações de defesa, exposição a um predador, acarretam a ativação de neurônios produtores de NO em

várias regiões do SNC incluindo o NDR, demonstrado por técnicas de imunohistoquímica (BEIJAMINI & GUIMARAES, 2006a; BEIJAMINI & GUIMARAES, 2006b).

Estudos em roedores mostram que a redução na produção do NO induz de forma significativa efeitos tipo ansiolítico e antidepressivo. Por exemplo, os inibidores da NOS (YILDIZ *et al.*, 2000; HARKIN *et al.*, 1999; JEFFERYS & FUNDER, 1996) assim como inibidores da GCs (HEIBERG *et al.*, 2002; EROGLU & CAGLAYAN, 1997) reduziram o tempo de imobilidade de forma dose-dependente no teste do nado forçado (TNF). De forma interessante o efeito antidepressivo dos inibidores da NOS pode ser dependente da 5-HT endógena, uma vez que, doses não efetivas de L-nitro-arginina metil ester (L-NAME) foram capazes de potencializar o efeito comportamental da imipramina e fluoxetina no TNF, sendo que este efeito não foi observado com a reboxetina, um inibidor da recaptura de noradrenalina (HARKIN *et al.*, 2004; HARKIN *et al.*, 2003). Do mesmo modo a administração sistêmica de L-NAME (FARIA *et al.*, 1997) ou 7-NI (VOLKE V. *et al.*, 2003), produziu efeito ansiolítico no LCE.

Considerando comportamentos relacionados à ansiedade, Quock & Nguyen (1992) mostraram que o tratamento sistêmico com o inibidor da NOS, L-NG-nitro arginine (L-NOARG), antagoniza o efeito ansiolítico do clordiazepóxido em camundongos submetidos ao LCE. Baseados no mesmo paradigma experimental, outros autores mostraram efeito ansiogênico para o L-NOARG (DE OLIVEIRA *et al.*, 1997) e L-nitro-arginina metil éster (L-NAME) (VALE *et al.*, 1998) administrados intraperitonealmente (*i.p.*) em ratos. Estes resultados permitiram a inferência de que o NO produzia efeito ansiolítico, visto que a inibição de sua síntese aumentava a

ansiedade em roedores. No entanto, resultados opostos também foram descritos. A administração de inibidores da formação do NO como o L-NOARG, L-NAME, azul de metileno ou 7-NI em ratos, provocou um aumento do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE (FARIA *et al.*, 1997; EROGLU & CAGLAYAN, 1997; WILEY *et al.*, 1995; VOLKE *et al.*, 1995; DUNN & WHITENER, 1986), efeitos considerados caracteristicamente ansiolíticos. Com os mesmos objetivos Kurt *et al.* (2004) demonstraram que, o tratamento sistêmico de camundongos com o sildenafil (1mg/Kg), um inibidor específico da fosfodiesterase 5, enzima que cliva o GMPc, causou uma diminuição do tempo de permanência de ratos nos braços abertos, sem alterar a atividade locomotora destes animais. O efeito observado foi revertido pela administração de azul de metileno, um inibidor da enzima GCs, evidenciando um estado ansiogênico causado pela ativação da via NO-GMPc.

Já microinjeção de drogas diretamente em estruturas cerebrais, como por exemplo, os inibidores L-NAME, L-NOARG (GUIMARAES *et al.*, 1994) ou azul de metileno (DE-OLIVEIRA & GUIMARAES, 1999) na substância cinzenta periaquedutal dorsal produziram efeitos ansiolíticos em ratos submetidos ao teste do LCE. Em adição, a administração de doadores de NO, como o 3-morpholino-sydnonimina (SIN-1) e 2-(N,N-Dietilamino)-diazolato ([DEA/NO], DE OLIVEIRA *et al.*, 2000) bem como do análogo GMPc o 8-bromo monofosfato cíclico de guanosina [8Br-GMPc] (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001) resultava em característica reação de fuga em ratos colocados numa arena circular.

1.4 - O NO e a Atividade Locomotora

Os efeitos contraditórios dos inibidores da NOS sobre a ansiedade, segundo Del Bel *et al.* (2002) podem ser devido ao fato de que estas drogas estariam interferindo

com a atividade locomotora, visto que inibidores da NOS quando administrados sistemicamente reduzem a atividade locomotora espontânea (DEL BEL *et al.*, 2002b; DZOLJIC *et al.*, 1997; SANDI *et al.*, 1995), o efeito hiperlocomotor induzido pela fenciclidina (NODA *et al.*, 1995) e por agonistas dopaminérgicos em roedores (STARR & STARR, 1995; ABEKAWA *et al.*, 1994). Além disto, a injeção sistêmica de inibidores da NOS induz catalepsia em camundongos (DEL BEL *et al.*, 2002a; ARAKI *et al.*, 2001; DEL BEL *et al.*, 1998; MARRAS *et al.*, 1995).

Embora o mecanismo dos inibidores da NOS sobre a atividade locomotora não esteja totalmente esclarecido acredita-se que o mesmo esteja relacionado com a modulação do NO sobre diversos transmissores neurais. Por exemplo, Smith & Whitton (2001) demonstraram que o glutamato modula a liberação de dopamina nos núcleos da rafe e no córtex frontal via receptor NMDA, e este efeito é antagonizado pelo inibidor seletivo da nNOS 7-NI, implicando o NO na modulação da liberação de dopamina.

Como descrito acima, vários estudos demonstraram os efeitos da administração sistêmica de drogas que interferem com o a concentração de NO no SNC, e também sobre as respostas comportamentais de ansiedade e depressão. De forma mais estrita, muitos autores, utilizando a injeção de drogas diretamente em regiões cerebrais, demonstram a participação do NO na neurotransmissão em diversas estruturas envolvidas com estes comportamentos. Apesar de expressiva densidade da enzima nNOS ter sido evidenciadas no NDR, não existe um estudo comportamental no qual administra-se diretamente neste núcleo drogas que interferem com os níveis de NO, visto que, do NDR partem fibras serotoninérgicas, que estão envolvidas na ansiedade e depressão.

2 - OBJETIVO

Foi objetivo do presente trabalho:

1. Avaliar os efeitos comportamentais resultantes da microinjeção de drogas que interferem diferencialmente com a neurotransmissão mediada pelo óxido nítrico no NDR, utilizando os modelos do LCE, TNF e campo aberto.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (75 dias de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), os quais foram mantidos em grupos de 5 animais, em gaiolas de acrílico (25 x 18 x 35 cm) no biotério local do laboratório de Neuropsicofarmacologia do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, sob condições ambientais controladas: temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre 7 e 19h), água e alimentação fornecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos no biotério local até atingirem o peso adequado (300 – 330gr) para posteriormente serem submetidos à cirurgia estereotáxica.

Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com o guia da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento para o cuidado e uso de animais de laboratório, que está de acordo com as políticas e leis internacionais. Foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento do animal.

3.2 - Drogas

Para a realização do procedimento cirúrgico foram utilizadas: benzilpenicilina procaína, sulfato de diidroestreptomicina e piroxicam (Pentabiótico, Novartis), cloridrato de lidocaína (Eurofarma-Pearson) e tiopental sódico (Abbott).

O precursor do NO L-Arg (100, 200 and 400 nmol), o inibidor da enzima NOS, L-NAME (50, 100 and 200 nmol) e o análogo do GMPc, 8-Bromoguanosina 3':5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc, 6.25, 12.5 and 25 nmol), (Sigma-Aldrich) foram

dissolvidos em solução de salina (0,9%) estéril, imediatamente antes do uso. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios que investigaram o efeito destes compostos em outras estruturas cerebrais como a substância cinzenta periaquedutal dorso lateral e a amígdala medial (FORESTIERO *et al.*, 2006; GUIMARAES *et al.*, 1994).

3.3 – Procedimentos

3.3.1 – Cirurgia

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (45 mg/Kg, *i.p.*) e foram fixados em aparelho estereotáxico, em seguida receberam injeção de lidocaina 2% (0,4 ml subcutânea) na região dorsal da cabeça. Através de uma incisão, fez-se a exposição do crânio, pela remoção do tecido epitelial e periósteo, onde foram perfurados três orifícios no osso com uma broca dental, sendo dois para a inserção de parafusos de suporte e um para a inserção da cânula-guia. Foram utilizadas cânulas de aço inoxidável (0,6 mm de diâmetro por 15 mm de comprimento), fixadas ao crânio por acrílico autopolimerizante, o qual fixou também um mandril de aço inoxidável de 15 mm de comprimento inserido na cânula para evitar sua obstrução. Para a inserção da cânula-guia no NDR, utilizou-se coordenadas obtidas do atlas de Paxinos & Watson (1997); tendo como referência o lambda (ângulo de 36°, ântero-posterior 1,4 mm, médio-lateral 3,7 mm e dorso-ventral 6,2 mm), permanecendo a cânula 1 mm acima do NDR.

Após a cirurgia os animais receberam pentabiótico veterinário (0,2 ml) por via intramuscular, foram identificados e mantidos próximos a uma lâmpada de 60 W até a

completa recuperação do efeito da anestesia, posteriormente foram alojados em grupos de 3 animais por gaiola, as quais permaneceram no biotério local.

3.3.2 - Injeção de Drogas no NDR

Após um período de 5 a 7 dias, os animais receberam injeção única ou combinada no NDR por meio de uma agulha gengival inserida na cânula-guia (16 x 0,3 mm), a qual estava conectada a uma microseringa (Haminton 5 µl, USA) através de um tubo de polietileno (PE-10). O volume de 0,3 µl foi injetado em um tempo de 30 segundos, com o auxílio de uma bomba de infusão, sendo a agulha mantida por mais 30 segundos no local de injeção, para evitar refluxo da solução injetada. Após administração da droga no NDR os animais foram mantidos em uma caixa individual por 10 minutos antes de serem expostos ao teste do LCE, TNF ou campo aberto. No caso da administração combinada de drogas no NDR, injetou-se a primeira droga no, sendo o animal mantido em uma caixa individual por 10 minutos, em seguida administrou-se a segunda droga no mesmo local, onde o animal foi mantido por 10 minutos na mesma caixa para posteriormente serem submetidos aos testes comportamentais. Cada animal foi submetido somente a um teste comportamental, com exceção aos que foram submetidos ao teste do campo aberto, os quais foram analisados previamente no teste do LCE.

3.3.3 - Avaliação Comportamental

3.3.3.1 - Labirinto em Cruz Elevado

Para a avaliação comportamental de possível atividade ansiolítica/ansiogênica dos tratamentos, foi utilizado o modelo LCE (PELLOW & FILE, 1986; PELLOW *et al.*, 1985). O equipamento é feito de madeira, constituído de 4 braços (50 x 10 cm)

perpendiculares, mantidos elevados a 65 cm do chão; dois braços são fechados por paredes (40 cm) sendo os outros dois abertos e cercados apenas por uma lâmina de acrílico de (1 cm) de altura para prevenir a eventual queda dos animais. Os animais foram colocados na plataforma central do LCE (com a face virada para um dos braços fechados) e exploraram o aparelho por 5 minutos. Foram quantificados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. O teste do LCE foi realizado em sala iluminada com temperatura ambiente (23 ± 1 °C), com privação de ruídos, entre as 8:00 - 11:00 horas, sendo este gravado para posterior análise. O labirinto foi limpo com álcool etílico 70° gl e seco com papel toalha minutos antes de cada animal ser exposto ao mesmo.

3.3.3.2 – Teste do Campo Aberto

Imediatamente após a exposição ao LCE, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliação da atividade locomotora. Este modelo é formado por uma caixa de madeira (70 x 70 x 40cm) dividida em 25 quadrantes (17,5 x 17,5cm) pintados no chão. Os animais foram colocados no centro da caixa e exploraram por 5 minutos. Sendo analisados o número de cruzamentos (quadrantes que o animal cruzou) e o número de elevação do corpo, ficando apoiado somente nas patas traseiras. O teste do campo aberto foi realizado nas mesmas condições do LCE, sendo a caixa limpa com álcool etílico 70 ° gl e papel toalha minutos antes de cada animal ser exposto ao mesmo.

3.3.3.3 - Teste do Nado Forçado (TNF)

Na avaliação comportamental de um possível efeito antidepressivo foi utilizado o teste do nado forçado proposto por Porsolt *et al.* (1977). Este modelo

consiste em um cilindro de PVC (60 x 45 cm) contendo água limpa (23 ± 1 °C), de forma que o animal não consiga escapar e que não tenha contato das patas e cauda com o fundo do cilindro. Inicialmente os animais eram colocados no centro do cilindro, por 15 minutos (pré-teste). Vinte e quatro horas após o pré-teste os animais receberam injeção de drogas no NDR e foram novamente submetidos ao TNF, agora por 5 minutos, sendo quantificado o tempo de imobilidade, ou seja, o tempo que o animal ficou parado ou realizando apenas movimentos suficientes para manter o nariz fora d'água, e a latência para a ocorrência do primeiro episódio de imobilidade. Ao término do pré-teste e teste os animais foram secos em toalhas e mantidos na caixa próximos a uma luz de 60W. O TNF ocorreu nas mesmas condições do LCE, sendo a água do cilindro trocada antes de cada exposição ao cilindro.

3.3.4 - Análise Histológica

Ao término da análise comportamental, os animais foram anestesiados com éter etílico e o local da injeção foi marcado com a injeção de 0,2 µl de azul de Evans através de agulha gengival inserida na cânula-guia. Posteriormente os animais foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo, por meio de uma bomba de perfusão, com 100 ml de solução salina (0,9%) por um período de 5 minutos, seguida de 100 ml solução de formaldeído 10% por mais 5 minutos. Os cérebros foram então retirados e acondicionados em solução de formaldeído a 10% por um período de 48 horas para fixação.

Após a fixação do tecido, este foi congelado com nitrogênio líquido e cortado em secções coronais de 40 µm, com o auxílio de um aparelho criostato (Cryocut 1800).

As secções foram estendidas em lâminas de vidro e coradas com cresil-violeta para a identificação do sítio de injeção.

3.4 - Análise Estatística

Foram considerados para análises estatística apenas os animais cujas injeções ocorreram no NDR, conforme análise histológica. Na caso do LCE, foram calculadas as percentagens de entrada nos braços abertos ($100 \times n^{\circ}$ entrada nos braços abertos/ n° total de entrada nos braços abertos e fechados) e de tempo gasto nos braços abertos ($100 \times$ tempo nos braços abertos/ tempo total nos braços abertos e fechados). Os dados obtidos foram transformados em médias \pm erro padrão das médias (EPMs), e foram submetidos a análise de variâncias de uma via (ANOVA), seguida da análise *post-hoc* pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os dados das curvas dose-resposta foram submetidos a análise de regressão linear para verificar se a resposta é dose-dependente.

4 – RESULTADOS

4.1 Labirinto em Cruz Elevado/Campo Aberto

A administração de L-Arg (100, 200 e 400 nmol) no NDR não modificou o número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,37)}=0,620$; $p=0,606$) nem a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ($F_{(3,37)}=2,817$; $p=0,05$) quando comparada com o grupo que recebeu salina; mas, L-Arg (100 e 200 nmol) aumentou a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($F_{(3,37)}=6,603$; $p=0,001$) quando comparada com o grupo que recebeu salina (figura 03), já L-Arg (400 nmol) não alterou o número de entradas nos braços fechados. A análise de regressão linear demonstrou que o efeito da L-Arg (100, 200 e 400 nmol), administrada no NDR, sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos é do tipo dose-dependente ($r^2=0,26$; $F_{(3,37)}=8,96$; $p=0,006$), sendo que segue a forma de curva em U-invertido.

A administração de L-NAME no NDR diminuiu todos os parâmetros avaliados no LCE: o número de entradas nos braços fechados (L-NAME 400 nmol, $F_{(3,39)}=8,166$; $p<0,001$), porcentagens de entrada e de tempo nos braços abertos (L-NAME 200 e 400 nmol, $F_{(3,39)}=9,171$; $p<0,001$ e $F_{(3,39)}=17,11$; $p<0,001$), quando comparado com o grupo que recebeu salina (figura 04). O efeito do L-NAME é dose-dependente como demonstrado pela curva de regressão linear para o número de entradas nos braços fechados ($r^2=0,45$; $F_{(3,39)}=23,34$; $p<0,0001$), porcentagens de entrada e de tempo nos braços abertos respectivamente ($r^2=0,35$; $F_{(3,39)}=15,33$; $p=0,0005$; $r^2=0,41$; $F_{(3,39)}=19,39$; $p=0,0001$).

Já a administração de 8-Br-GMPc (25 e 50 nmol) no NDR aumentou o número de entrada nos braços fechados ($F_{(3,38)}=22,99$; $p<0,001$), quando comparadas com o

grupo controle (figura 05). No entanto, a administração de 8-Br-GMPc (12,5; 25 e 50 nmol) não modificou a percentagem de entradas ($F_{(3,38)}=1,428$; $p=0,251$) e nem a percentagem de tempo gasto nos braços abertos ($F_{(3,38)}=0,286$; $p<0,835$) quando comparado com o grupo que recebeu salina (figura 05). A análise da curva de regressão linear mostrou que o efeito do 8-Br-GMPc no número de entrada nos braços fechados é dose-dependente ($r^2=0,63$; $F_{(3,38)}=45,96$; $p<0,0001$)

No tratamento combinado, a administração de L-NAME (200 nmol) no NDR diminuiu todos os parâmetros comportamentais analisados no LCE: o número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,31)}=8,792$; $p<0,001$), a percentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(3,31)}=6,901$; $p<0,001$) e também a percentagem de tempo gasto nos braços abertos ($F_{(3,31)}=4,216$; $p=0,04$), quando comparados com o grupo que recebeu salina. A posterior administração de L-Arg (100 nmol) reverteu os efeitos do L-NAME (200 nmol) em relação ao número de entradas nos braços fechados ($p<0,01$) e a percentagem de tempo gasto nos braços abertos ($p<0,05$, figura 06).

Quando submetidos ao teste do campo aberto, a L-Arg (100 nmol), aumentou o número de cruzamentos ($F_{(3,31)}=14,23$; $p<0,001$) e elevações ($F_{(3,31)}=14,89$; $p<0,001$), quando comparados com o grupo que recebeu salina. No grupo que recebeu L-NAME (200 nmol) ocorreu diminuição de ambos os parâmetros, o número de cruzamentos ($F_{(3,31)}=16,69$; $p<0,001$) e elevações ($F_{(3,31)}=14,89$; $p<0,001$), quando comparados com o grupo que recebeu apenas salina, como observado na figura 07. Esses efeitos do L-NAME foram revertidos pela posterior administração de L-Arg (100 nmol, $p<0,05$).

4.2 – Teste do Nado Forçado

Os resultados demonstram que a administração no NDR de L-Arg aumentou o tempo de latência (L-Arg 100 nmol, $F_{(3,33)}=11,65$; $p<0,001$) e diminuiu o tempo de imobilidade (L-Arg 50 e 100 nmol, $F_{(3,33)}=23,21$; $p<0,001$), quando comparado com o grupo que recebeu salina (figura 8). O efeito da L-Arg sobre os parâmetros analisados no TNF é dose-dependente, assim demonstrada pela análise da curva de regressão linear (latência: $r^2=0,53$; $F_{(3,33)}=25,17$; $p<0,0001$; tempo de imobilidade: $r^2=0,63$; $F_{(3,33)}=37,30$; $p<0,0001$)

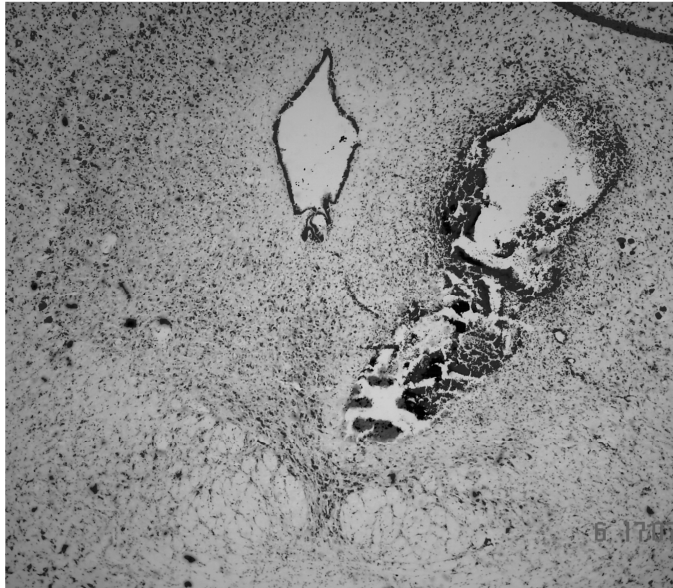
A administração no NDR de L-NAME (100 e 200 nmol) diminuiu a latência ($F_{(3,33)}=12,05$; $p<0,001$) e aumentou o tempo de imobilidade (L-NAME 200 nmol, $F_{(3,33)}=15,20$; $p<0,001$), quando comparado com o grupo que recebeu salina (figura 9). A curva de regressão linear mostrou um efeito dose-dependente do L-NAME no TNF (latência: $r^2=0,66$; $F_{(3,33)}=43,55$; $p<0,0001$; tempo de imobilidade: $r^2=0,58$; $F_{(3,33)}=30,46$; $p<0,0001$).

Já o grupo que recebeu 8-Br-GMPc no NDR, somente a dose de 25 nmol produziu um aumento da latência ($F_{(3,37)}=43,42$; $p<0,001$); enquanto que as doses de (12,5 e 25 nmol) diminuíram o tempo de imobilidade ($F_{(3,37)}=47,64$; $p<0,001$) quando comparados com o grupo que recebeu salina (figura 10). Assim como a L-Arg o efeito do 8-Br-GMPc é dose-dependente (latência: $r^2=0,72$; $F_{(3,37)}=67,58$; $p<0,0001$; tempo de imobilidade: $r^2=0,69$; $F_{(3,37)}=57,18$; $p<0,0001$).

No tratamento combinado, o grupo que recebeu L-Arg 100 nmol mostrou um aumento significativo sobre a latência e uma diminuição do tempo de imobilidade ($F_{(3,31)}=18,28$; $p<0,001$) e ($F_{(3,31)}=16,09$; $p<0,001$) respectivamente, quando

comparados com o grupo que recebeu salina (figura 11). A pré-injeção da dose inefetiva de L-NAME (50 nmol, $p>0,05$) no NDR, impediu o aparecimento dos efeitos da L-Arg sobre a latência e o tempo de imobilidade ($p<0,001$, figura 11).

A)



B)



Figura 02: **A)** Fotomicrografia (40X) da secção coronal do cérebro de rato, podendo-se observar o local da micro-injeção no núcleo dorsal da rafe (NDR) logo abaixo do aqueduto cerebral (bregma 7,84 mm). **B)** diagrama esquemático dos sítios de injeção (pontos preto) no NDR (bregma 7,64 a 8,00 mm). **Fonte:** Paxinos & Watson (1997).

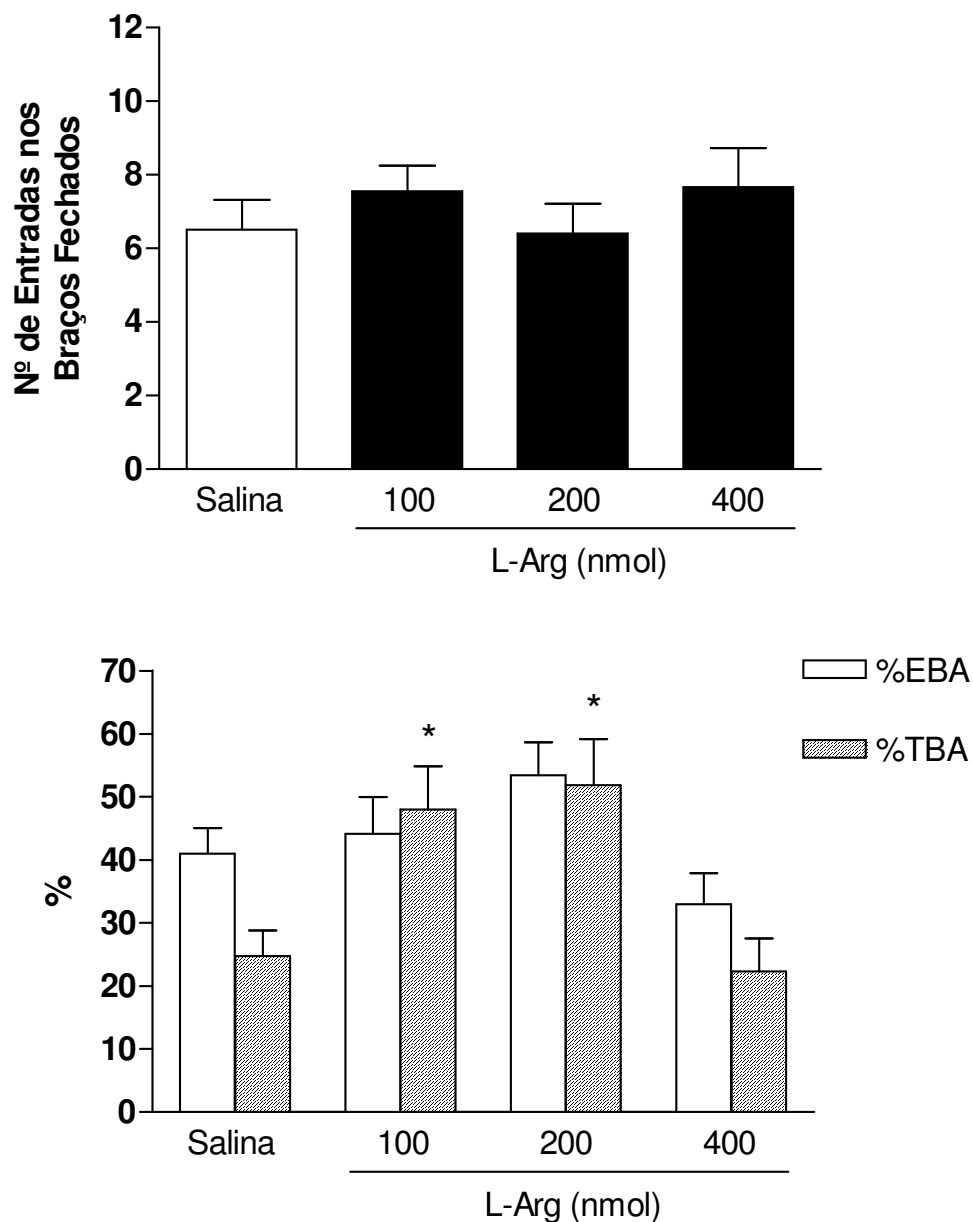


Figura 03: Efeito da administração de L-Arginina (L-Arg, 100, 200 e 400 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 9 – 10). %EBA= percentagens de entradas nos braços abertos. %TBA= percentagem de tempo nos braços abertos.
* p<0,05 comparados com o grupo controle.

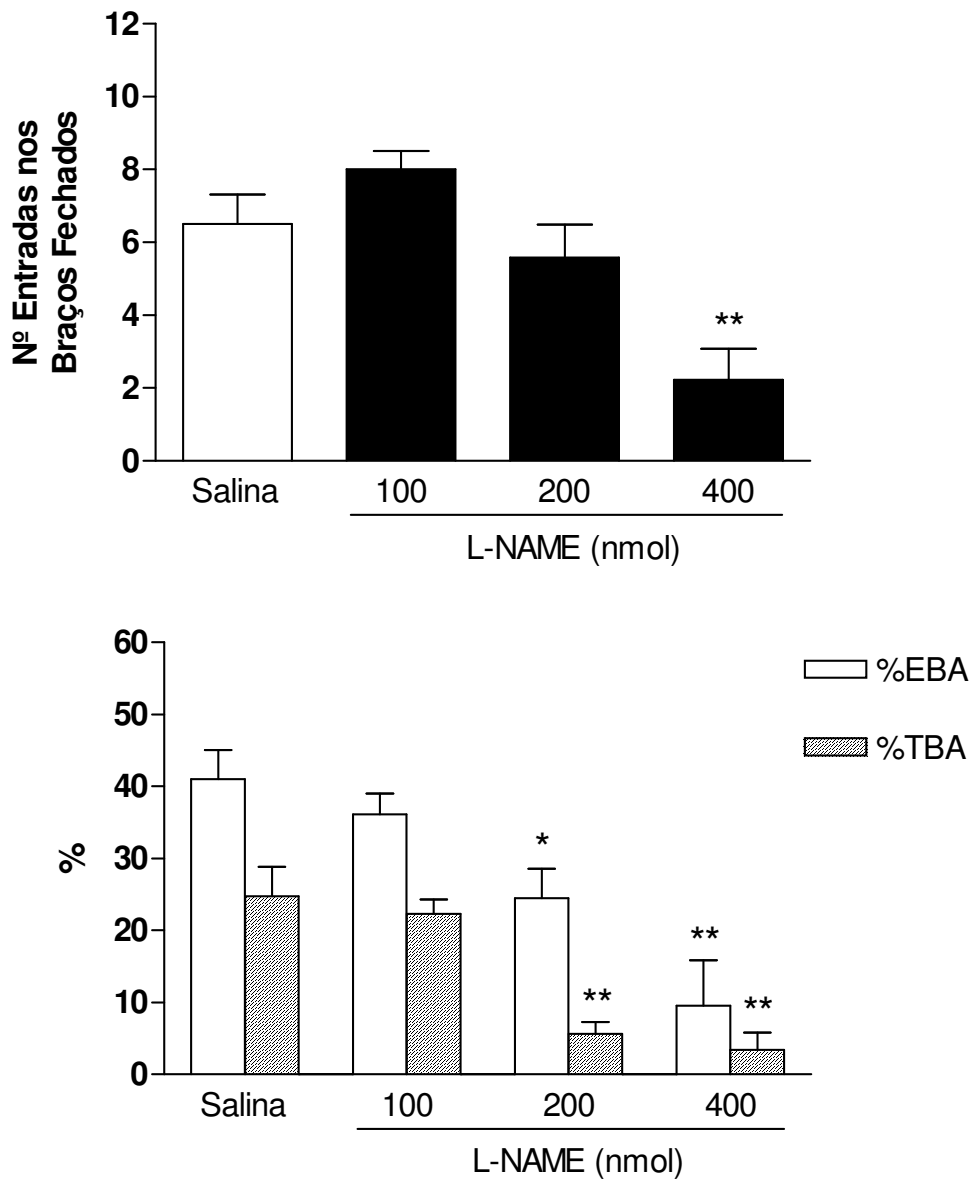


Figura 04: Efeito da administração de nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 100, 200 e 400 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 9 – 12). %EBA= percentagens de entradas nos braços abertos. %TBA= percentagem de tempo nos braços abertos. * p<0,05 e ** p<0,001 comparados com o grupo controle.

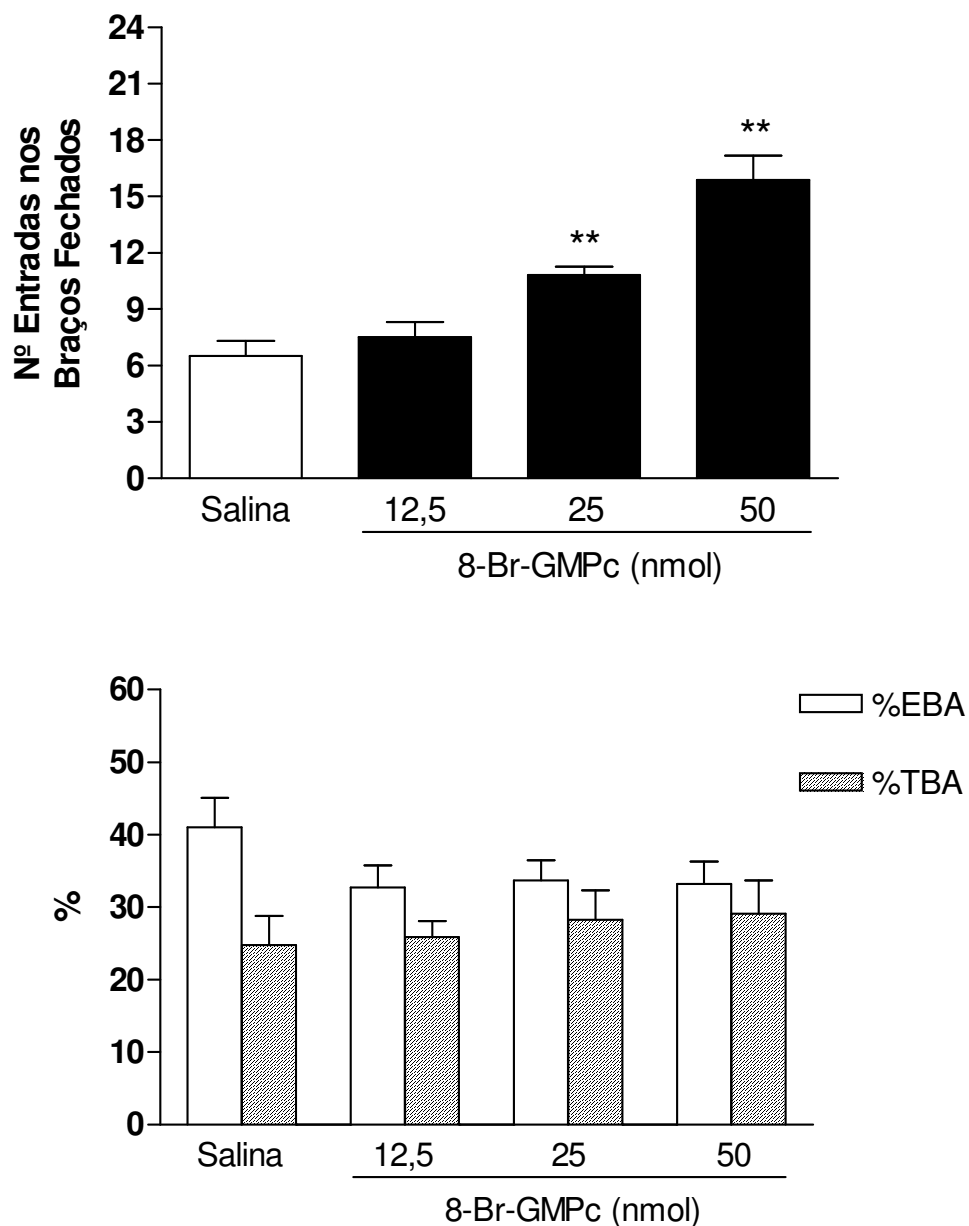


Figura 05: Efeito da administração de 8-Bromoguanosina 3':5`-monofosfato cíclica (8-Br-GMPc, 12,5, 25 e 50 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 9 – 10). %EBA= percentagens de entradas nos braços abertos. %TBA= percentagem de tempo nos braços abertos. ** p<0,001 comparados com o grupo controle.

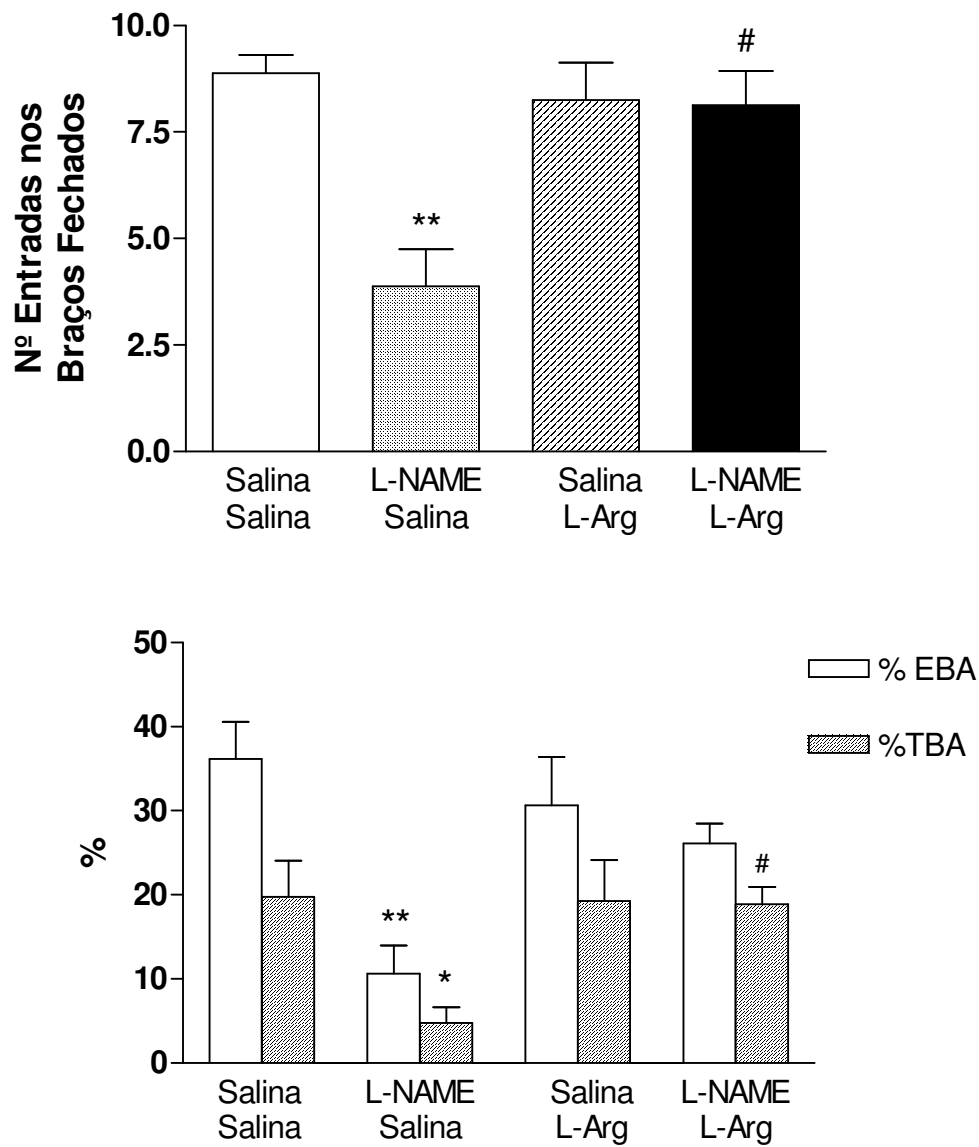


Figura 06: Efeito da administração combinada de nitro-L-arginina metil ester (L-NAME 200 nmoles) e L-Arginina (L-Arg 100 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 8). %EBA= percentagens de entradas nos braços abertos. %TBA= percentagem de tempo nos braços abertos.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ comparados com o grupo controle.

$p < 0,05$ comparado com o grupo salina-LNAME.

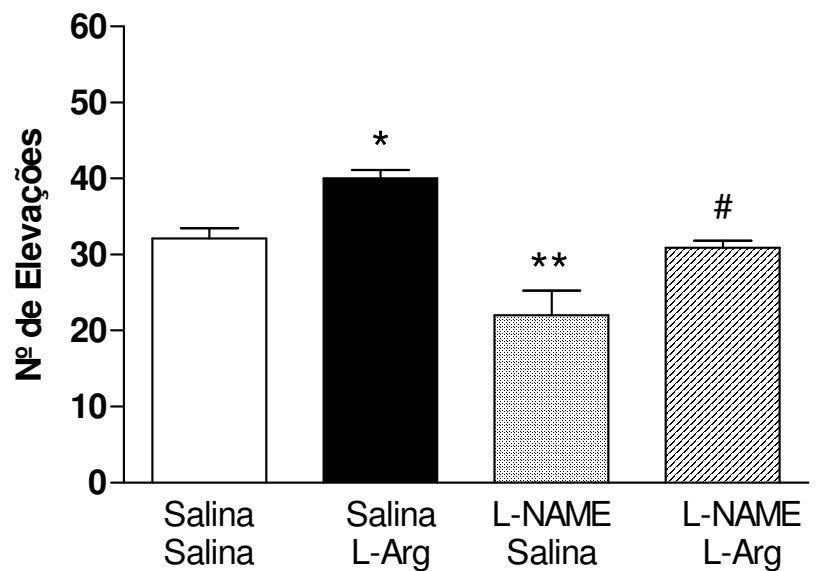
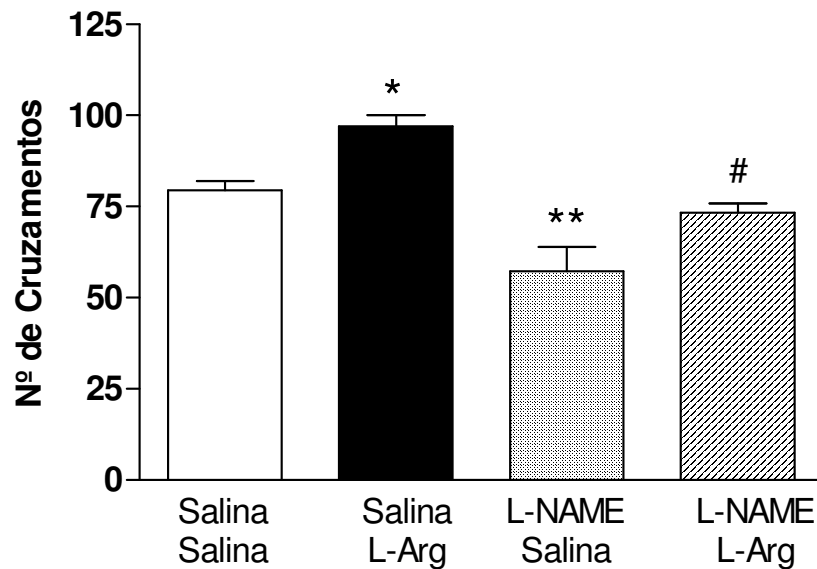


Figura 07: Efeito da administração combinada de nitro-L-arginina metil ester (L-NAME 200 nmoles) e L-Arginina (L-Arg 100 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao teste do campo aberto por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 8). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ comparados com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina-LNAME.

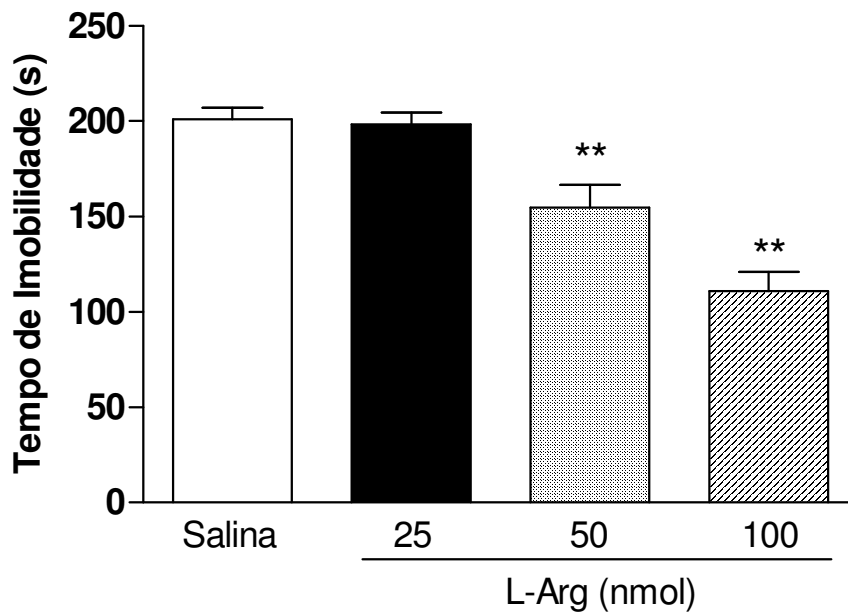
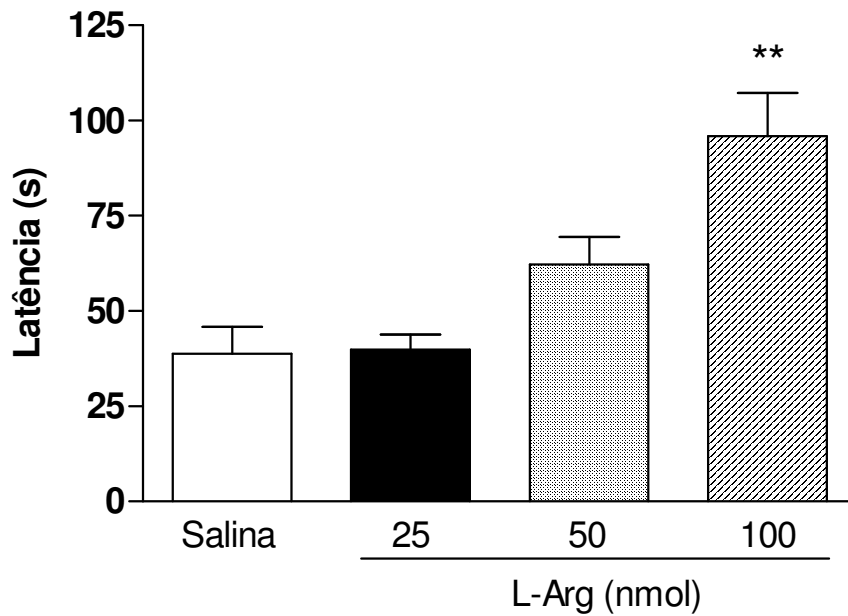


Figura 08: Efeito da administração de L-Arginina (L-Arg, 25, 50 e 100 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao teste do nado forçado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 8 -10).
 **p<0,001 comparados com o grupo controle.

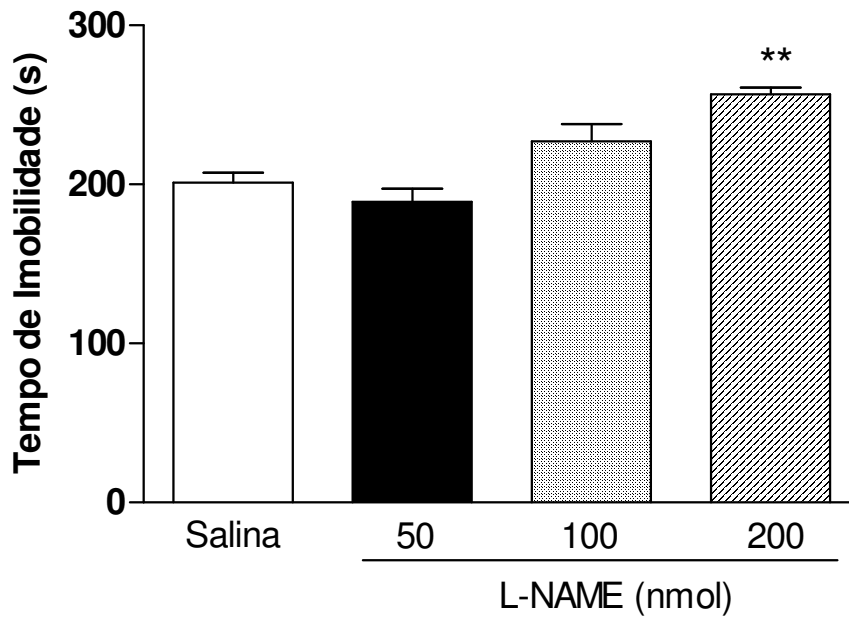
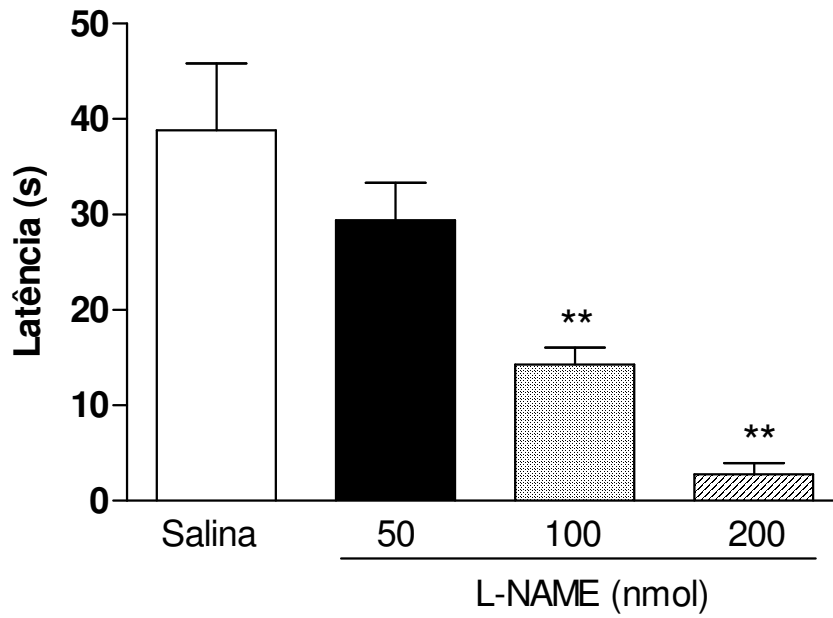


Figura 09: Efeito da administração de nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 50, 100 e 200 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao teste do nado forçado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 8 -10).
 **p<0,001 comparados com o grupo controle.

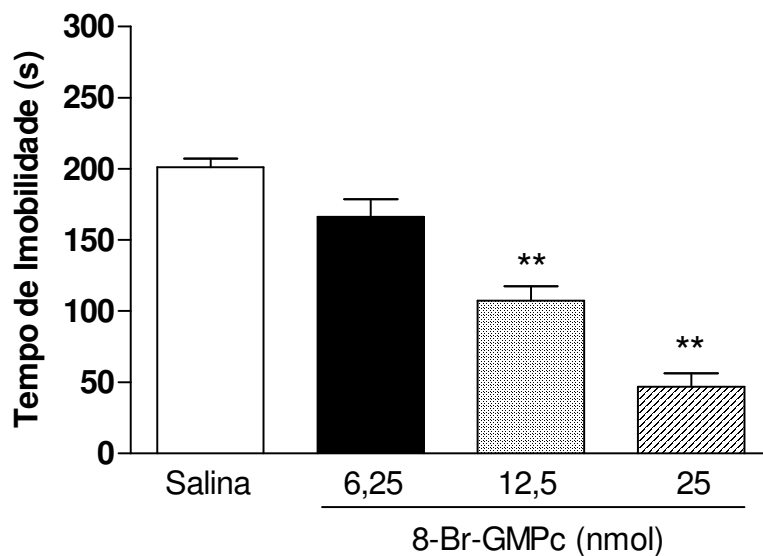
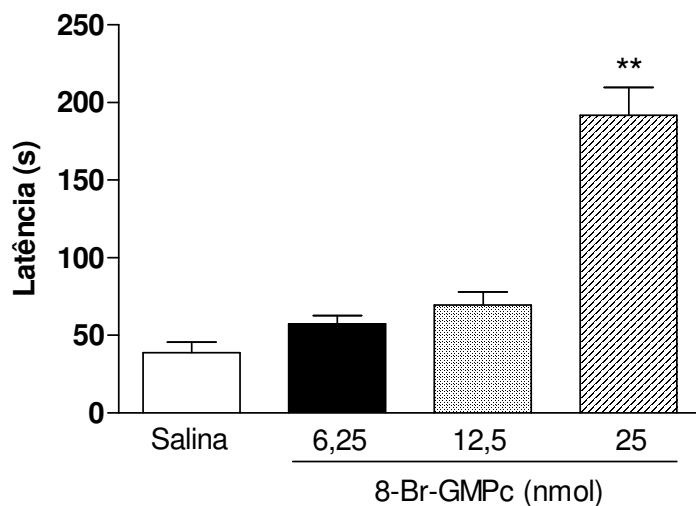


Figura 10: Efeito da administração de 8-Bromoguanosina 3':5'-monofosfato cíclica (8-Br-GMPc, 6.25 12.5 e 25 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao teste do nado forçado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 8 -10). **p<0,001 comparados com o grupo controle.

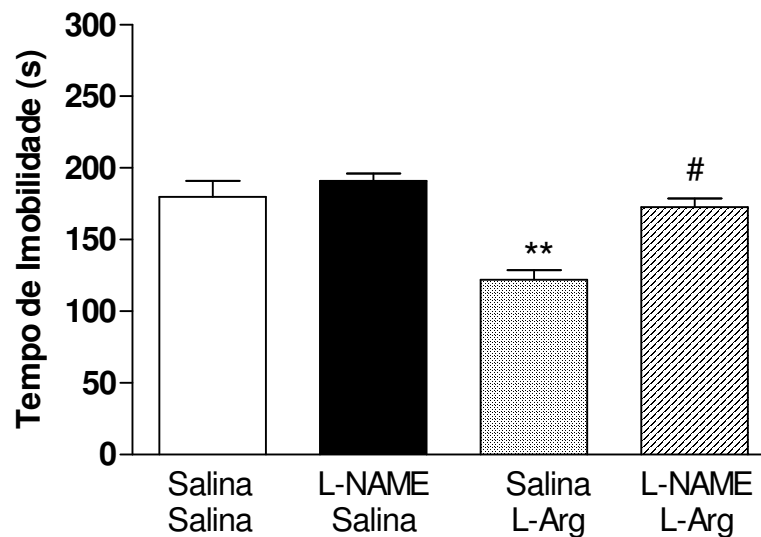
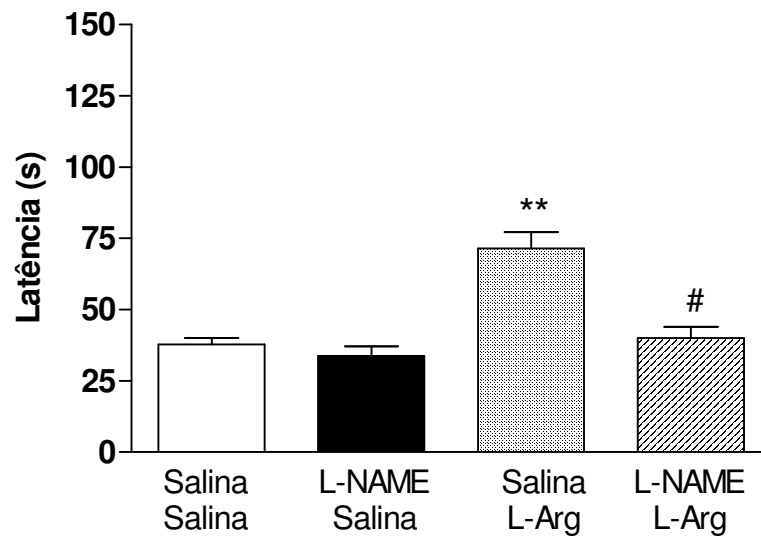


Figura 11: Efeito da administração combinada de L-Arginina (L-Arg 100 nmoles) e nitro-L-arginina metil ester (L-NAME 50 nmoles) no NDR de ratos submetidos ao teste do nado forçado por 5 minutos. As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões das médias (EPMs) dos grupos (n= 8 -10).

**p<0,001 comparados com o grupo controle.

p<0,001 comparados com o grupo salina – L-Arg.

5 – DISCUSSÃO

O LCE tem sido amplamente aceito como um modelo que avalia independentemente comportamentos relacionados à ansiedade (percentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos) e à atividade locomotora (número de entradas nos braços fechados) em roedores (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). No presente trabalho, a injeção de L-Arg (100 e 200 nmol) no NDR de ratos aumentou significativamente a percentagem de tempo nos braços abertos do LCE, revelando um efeito tipo ansiolítico. Entretanto, o efeito ocorreu numa estreita faixa de doses e a curva dose-resposta apresentou formato de U-invertido. Curvas dose-resposta com forma de U-invertido e comumente descritos em vários estudos que utilizam drogas que interferem com o NO no SNC. A explicação para este fenômeno é desconhecida, mas muitos fatores podem estar envolvidos. Por exemplo, a droga pode interferir com a eNOS (ESPLUGUES, 2002), o NO pode exercer um efeito bifásico sobre a liberação por interneurônios de 5-HT (excitatória) ou do ácido gama-amino-butírico (GABA, inibitório), dependendo da sua concentração local (LOVICK *et al.*, 2000; TRABACE & KENDRICK, 2000), em adição o NO por ser um radical livre pode reagir com agentes antioxidantes, podendo então, seu efeito ser dependente das concentrações locais de antioxidantes. Desta forma pequenas mudanças na concentração local de NO poderia ser o fator determinante de sua atividade biológica (CONTESTABILE, 2000). Este último fator poderia explicar ainda, o fato da L-Arg ser capaz de reverter o efeito ansiogênico do L-NAME, mas não apresentar efeito tipo-ansiolítico quando administrada após salina no tratamento combinado.

As administrações de L-NAME (200 e 400 nmol) no NDR produziu um efeito ansiogênico nos animais submetidos ao LCE.

Resultados contraditórios têm sido demonstrados para compostos que interferem com a neurotransmissão do NO no teste do LCE (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001; DEL BEL *et al.*, 2005; GUIMARAES *et al.*, 2005). Por exemplo, a administração sistêmica (FARIA *et al.*, 1997; VOLKE *et al.*, 1995) ou intra-cerebral de inibidores da NOS (GUIMARAES *et al.*, 1994; FORESTIERO *et al.*, 2006) induzem efeito tipo-ansiolítico em ratos. Por outro lado, efeitos ansiogênicos, caracterizados principalmente por uma diminuição na exploração dos braços do LCE, foram também observados após administração sistêmica dos inibidores da NOS L-NAME e L-NOARG (DE OLIVEIRA *et al.*, 1997; QUOCK & NGUYEN, 1992; VALE *et al.*, 1998).

A administração de L-NAME (400 nmol) e 8-Br-GMPc (25 e 50 nmol), afetaram a atividade locomotora dos animais, como observado por uma diminuição ou aumento do número de entradas nos braços fechados do LCE, respectivamente. Nossos resultados estão de acordo com Monzon *et al.* (2001) observaram que o L-NOARG, um potente inibidor da NOS, quando injetado na amígdala ou hipocampo de ratos, causou diminuição no número de entrada nos braços fechados do LCE, confirmando a interferência deste tratamento com a atividade exploratória dos animais. Interferência não-específica com a atividade motora e comumente descrita em vários estudos empregando inibidores da NOS (EROGLU & CAGLAYAN, 1997; GUIMARAES *et al.*, 1994; VOLKE *et al.*, 1995). De fato, inibidores da NOS reduzem a atividade locomotora espontânea (DEL BEL *et al.*, 2002; DZOLJIC *et al.*, 1997; SANDI *et al.*, 1995) e a hiperlocomoção induzida pela fenciclidina (NODA *et al.*, 1995), assim como induzem catalepsia em roedores (DEL BEL *et al.*, 2005). A diminuição da atividade locomotora produzido pelo L-NAME, pode ser uma possível explicação para o efeito ansiogênico demonstrado no LCE, pois, reduzindo a atividade locomotora, conseqüentemente reduz a atividade exploratória dos animais

no labirinto, reduzindo assim a porcentagem de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos.

O NDR envia fibras 5-HT para áreas cerebrais relacionadas com o comportamento emocional e motor como o estriado, amígdala, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, hipotálamo e córtex pré-frontal. Nestas estruturas o NDR e a 5-HT têm um importante papel modulatório (LOWRY *et al.*, 2005). Enquanto que no estriado a 5-HT modula as funções motoras (BISHOP *et al.*, 2004), na amígdala e na substância cinzenta periaquedutal dorso lateral a 5-HT apresenta um papel duplo sobre as respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade, ou seja, facilitando a esquia inibitória ou inibindo a resposta de fuga, respectivamente (GRAEFF *et al.*, 1996). Em adição, a atividade dos neurônios do NDR está sob influência de um intrincado processo regulatório determinado pelo córtex pré-frontal, envolvendo aferências excitatórias que utilizam o glutamato e 5-HT, e inibitórias que mediadas pelo GABA (CELADA *et al.*, 2001). As aferências glutamatérgicas, pelo menos em parte, são mediadas por receptores NMDA, e envolvem a formação de NO. Desta forma, o NO poderia então modular a liberação local de glutamato, GABA ou 5-HT no NDR, resultando em um complexo efeito final sobre a atividade neuronal do NDR.

A investigação dos efeitos de drogas que interagem com a 5-HT em animais testados no LCE também produz resultados conflitantes (GRIEBEL, 1995). Para explicar estes resultados contraditórios, argumenta-se que o LCE é um modelo misto de ansiedade, onde os animais exibem duas estratégias de defesa diferentes: esquia inibitória dos braços abertos e fuga dos braços abertos para os braços fechados. Um novo modelo de ansiedade, o labirinto em T elevado, foi proposto na

tentativa de diferenciar estes comportamentos, medindo no mesmo animal duas tarefas comportamentais distintas: a esquiva inibitória e a fuga (GRAEFF *et al.*, 1993). No presente trabalho a L-Arg não alterou a percentagem de entradas nos braços abertos do LCE, ao invés disto, aumentou a percentagem de tempo gasto nestes braços. Este resultado sugere que o tratamento com L-Arg poderia ter diminuindo, na verdade, a resposta de fuga. Um efeito locomotor mais intenso, produzido pelo 8-Br-GMPc, por exemplo, poderia prevenir um efeito similar induzido por esta droga.

De forma especulativa, o efeito principal do NO no NDR seria o de aumentar a atividade dos neurônios 5-HT. Corroborando esta interpretação, a estimulação direta dos neurônios do NDR com ácido kaínico, o qual aumenta os níveis extracelulares de 5-HT na amígdala e na substância cinzenta periaquedutal de ratos (VIANA *et al.*, 1997), também atenua a fuga dos braços abertos no labirinto em T elevado (GRAEFF *et al.*, 1997). Efeitos similares foram descritos após a injeção de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-(2-piridinil)ciclohexanocarboxamida (WAY-100635), um antagonista do receptor 5-HT_{1A}, no NDR de ratos (POBBE & ZANGROSSI, 2005). Embora ambos os tratamentos também facilitem a esquiva inibitória dos braços abertos, isto poderia ter sido superado por um efeito locomotor estimulante destes compostos.

Assim o aumento e a diminuição da atividade locomotora induzida pelo 8-Br-GMPc e L-NAME, respectivamente, poderiam também ser explicados por um aumento ou diminuição da 5-HT estriatal. Neste sentido, os níveis de 5-HT estão aumentados no estriado após estímulo de pinçamento da cauda (MENDLIN *et al.*, 1999) e, de forma

similar, a estimulação elétrica do NDR aumenta a liberação de dopamina no núcleo acumbens (DE *et al.*, 1998).

No TNF, as injeções no NDR de L-Arg (50 nmol) ou 8-Br-GMPc (12,5 e 25 nmol) resultaram em um efeito tipo antidepressivo caracterizado pela redução no tempo de imobilidade e um aumento na latência para o primeiro episódio de imobilidade. Um efeito oposto foi observado com L-NAME (100 e 200 nmol), o qual foi revertido pela injeção de L-Arg, evidenciando a participação do NO neste processo. Estes resultados são contraditórios com efeitos tipo-antidepressivo observados após a administração sistêmica ou intra-hipocampal de vários inibidores da NOS (DA SILVA *et al.*, 2000; HARKIN *et al.*, 1999; YILDIZ *et al.*, 2000) ou da GCs (EROGLU & CAGLAYAN, 1997; HEIBERG *et al.*, 2002; JOCA & GUIMARÃES, 2006). Em outros estudos, L-Arg mostrou-se inefetiva (HARKIN *et al.*, 1999) ou produziu um efeito bifásico no TNF (DA SILVA *et al.*, 2000). Somente um trabalho relata o efeito da injeção direta do L-NAME no NDR usando um modelo de depressão, o desamparo aprendido (Grahn *et al.*, 2000). Também em contraste com os presentes resultados, Grahn *et al.* (2000) mostraram que o L-NAME foi capaz de reverter os efeitos sobre a fuga induzida por exposições prévias a choques inescapáveis na cauda de ratos.

Alguns fatores poderiam explicar estes resultados contraditórios relativos aos inibidores da NOS e a atividade tipo-antidepressiva no desamparo aprendido e no TNF. Embora a validação teórica do TNF seja baseada na semelhança com o teste do desamparo aprendido, a relação entre estes dois modelos não é clara. De fato, a exposição prévia ao nado forçado, não altera o desempenho de fuga dos animais em um teste de esquiva utilizando choques, o que sugere que os modelos não compartilham das mesmas propriedades (WILLNER, 1990). Possivelmente,

diferentes modulações da neurotransmissão nitrérgica ocorreriam nas situações de estresse inescapável nos dois modelos, o que justificaria as diferenças observadas. Além disto, a dose utilizada por Grahn's (18 nmol) foi menor do que a dose efetiva no presente estudo (100 nmol). Finalmente, resultados falso-positivos foram encontrados no TNF com drogas psicostimulantes (WILLNER, 1990). Uma vez que L-Arg, 8-Br-GMPc e L-NAME interferem com a atividade locomotora no LCE e no campo aberto, não é possível rejeitar a hipótese de que o efeito observado no TNF estaria refletindo um efeito motor não-específico destas drogas. Assim, estudos adicionais empregando outros modelos de depressão seriam necessários para avaliar esta possibilidade.

CONCLUSÃO

6 – CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que a neurotransmissão mediada pelo NO no NDR pode influenciar comportamentos de ansiedade e modificar a atividade locomotora dos animais. Estudos futuros serão necessários para esclarecer quais os mecanismos envolvidos nestes efeitos e se a possível atividade antidepressiva pode ocorrer de forma independente dos efeitos motores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEKAWA, T.; OHMORI, T. & KOYAMA, T. Effect of NO synthase inhibition on behavioral changes induced by a single administration of methamphetamine. *Brain Res.*, v.666, n.1, p. 147-150, 1994.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, v.357, n.Pt 3, p. 593-615, 2001.
- ARAKI, T.; MIZUTANI, H.; MATSUBARA, M.; IMAI, Y.; MIZUGAKI, M. & ITOYAMA, Y. Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v.11, n.2, p. 125-133, 2001.
- BEIJAMINI, V. & GUIMARAES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Res Bull.*, v.69, n.4, p. 347-355, 2006a.
- BEIJAMINI, V. & GUIMARAES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res*, v.170, n.1, p. 52-61, 2006b.
- BISHOP, C.; TESSMER, J. L.; ULLRICH, T.; RICE, K. C. & WALKER, P. D. Serotonin 5-HT_{2A} receptors underlie increased motor behaviors induced in dopamine-depleted rats by intrastriatal 5-HT_{2A/2C} agonism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.310, n.2, p. 687-694, 2004.
- BREDDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R. & SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, v.351, n.6329, p. 714-718, 1991.
- BREDDT, D. S.; HWANG, P. M. & SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v.347, n.6295, p. 768-770, 1990.
- BREDDT, D. S. & SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.87, n.2, p. 682-685, 1990.
- BREDDT, D. S. & SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, v.63, 175-195, 1994.
- BUISSON, A.; MARGAILL, I.; CALLEBERT, J.; PLOTKINE, M. & BOULU, R. G. Mechanisms involved in the neuroprotective activity of a nitric oxide synthase inhibitor during focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, v.61, n.2, p. 690-696, 1993.
- CAROBREZ, A. P. & BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.29, n.8, p. 1193-1205, 2005.
- CELADA, P.; PUIG, M. V.; CASANOVAS, J. M.; GUILLAZO, G. & ARTIGAS, F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J. Neurosci.*, v.21, n.24, p. 9917-9929, 2001.

CLEMENT, P.; SARDA, N.; CESPUGLIO, R. & GHARIB, A. Potential role of inducible nitric oxide synthase in the sleep-wake states occurrence in old rats. *Neuroscience*, v.135, n.2, p. 347-355, 2005.

CODERRE, T. J. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol. Neurobiol.*, v.7, n.3-4, p. 229-246, 1993.

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

DA SILVA, G. D.; MATTEUSSI, A. S.; DOS SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. & RODRIGUES, A. L. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport*, v.11, n.17, p. 3699-3702, 2000.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; LONDON, E. D.; BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.88, n.14, p. 6368-6371, 1991.

DE OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A. & GUIMARAES, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.56, n.1, p. 55-59, 1997.

DE-OLIVEIRA, R. W. & GUIMARAES, F. S. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.12, p. 1529-1532, 1999.

DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A. & GUIMARAES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.*, v.51, n.6, p. 457-464, 2000.

DE OLIVEIRA, R. M.; DEL BEL, E. A. & GUIMARAES, F. S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.25, n.7-8, p. 679-685, 2001.

DE SILVA, D. J.; FRENCH, S. J.; CHEUNG, N. Y.; SWINSON, A. K.; BENDOTTI, C. & RATTRAY, M. Rat brain serotonin neurones that express neuronal nitric oxide synthase have increased sensitivity to the substituted amphetamine serotonin toxins 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine. *Neuroscience*, v.134, n.4, p. 1363-1375, 2005.

DE, D. P.; STINUS, L. & SPAMPINATO, U. Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors. *J. Neurosci.*, v.18, n.16, p. 6528-6538, 1998.

DEAKIN, J. F. & GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. *Psychopharmacology (Berl)*, v.5,305-315, 1991.

DEL BEL, E. A.; DA SILVA, C. A. & GUIMARAES, F. S. Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors. *Gen. Pharmacol.*, v.30, n.2, p. 245-248, 1998.

DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S.; BERMUDEZ-ECHEVERRY, M.; GOMES, M. Z.; SCHIAVETO-DE-SOUZA, A.; PADOVAN-NETO, F. E.; TUMAS, V.; BARION-CAVALCANTI, A. P.; LAZZARINI, M.; NUCCI-DA-SILVA, L. P. & DE PAULA-SOUZA, D. Role of nitric oxide on motor behavior. *Cell Mol. Neurobiol.*, v.25, n.2, p. 371-392, 2005.

DEL BEL, E. A.; SOUZA, A. S.; GUIMARAES, F. S.; DA-SILVA, C. A. & NUCCI-DA-SILVA, L. P. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v.161, n.1, p. 32-37, 2002.

DEL-BEL, E. A.; OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, J. A.; MISHRA, P. K.; JOBE, P. C. & GARCIA-CAIRASCO, N. Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.30, n.8, p. 971-979, 1997.

DUN, N. J.; DUN, S. L.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthase immunoreactivity in at pontine medullary neurons. *Neuroscience*, v.59, p. 429-45, 1994.

DZOLJIC, E.; DE, V. R. & DZOLJIC, M. R. New and potent inhibitors of nitric oxide synthase reduce motor activity in mice. *Behav. Brain Res.*, v.87, n.2, p. 209-212, 1997.

EROGLU, L. & CAGLAYAN, B. Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol. Res.*, v.36, n.5, p. 381-385, 1997.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.*, v.135, n.5, p. 1079-1095, 2002.

FARIA, M. S.; MUSCARA, M. N.; MORENO, J. H.; TEIXEIRA, S. A.; DIAS, H. B.; DE, O. B.; GRAEFF, F. G. & DE, N. G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, v.323, n.1, p. 37-43, 1997.

FORESTIERO, D.; MANFRIM, C. M.; GUIMARAES, F. S. & DE OLIVEIRA, R. M. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v.184, n.2, p. 166-172, 2006.

FORSTERMANN, U.; SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; SHENG, H.; MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D.; NAKANE, M. & MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.*, v.42, n.10, p. 1849-1857, 1991.

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

FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, n.5789, p. 373-376, 1980.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L. & CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, v.336, n.6197, p. 385-388, 1988.

GETTING, S. J.; SEGIETH, J.; AHMAD, S.; BIGGS, C. S. & WHITTON, P. S. Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Res.*, v.717, n.1-2, p. 196-199, 1996.

GHOSH, D. K. & STUEHR, D. J. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry*, v.34, n.3, p. 801-807, 1995.

GRAEFF, F. G.; GUIMARAES, F. S.; DE ANDRADE, T. G. & DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.54, n.1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B. & MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.21, n.6, p. 791-799, 1997.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B. & TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.26, n.1, p. 67-70, 1993.

GRAHN, R. E.; WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. Impaired escape performance and enhanced conditioned fear in rats following exposure to an uncontrollable stressor are mediated by glutamate and nitric oxide in the dorsal raphe nucleus. *Behav. Brain Res.*, v.112, n.1-2, p. 33-41, 2000.

GREEN, L. C.; RUIZ DE, L. K.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R. & TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.78, n.12, p. 7764-7768, 1981.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol. Ther.*, v.65, n.3, p. 319-395, 1995.

GUIMARAES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C. & DE LUCCA, A. C. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.29, n.8, p. 1313-1322, 2005.

GUIMARAES, F. S.; DE AGUIAR, J. C.; DEL BEL, E. A. & BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport*, v.5, n.15, p. 1929-1932, 1994.

HARKIN, A.; CONNOR, T. J.; BURNS, M. P. & KELLY, J. P. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v.14, n.4, p. 274-281, 2004.

HARKIN, A.; CONNOR, T. J.; WALSH, M.; ST, J. N. & KELLY, J. P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology*, v.44, n.5, p. 616-623, 2003.

HARKIN, A. J.; BRUCE, K. H.; CRAFT, B. & PAUL, I. A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur. J. Pharmacol.*, v.372, n.3, p. 207-213, 1999.

HECKER, M.; MITCHELL, J. A.; HARRIS, H. J.; KATSURA, M.; THIEMERMANN, C. & VANE, J. R. Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.167, n.3, p. 1037-1043, 1990.

HEIBERG, I. L.; WEGENER, G. & ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav. Brain Res.*, v.134, n.1-2, p. 479-484, 2002.

HENSLER, J. G. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.30, n.2, p. 203-214, 2006.

HILLEGART, V. Effects of local application of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on motor activity in the rat. *Physiol Behav.*, v.48, n.1, p. 143-148, 1990.

HORNUNG, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.*, v.26, n.4, p. 331-343, 2003.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. & CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.84, n.24, p. 9265-9269, 1987.

JACOBS, B. L. & AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.*, v.72, n.1, p. 165-229, 1992.

JACOBS, B. L. & FORNAL, C. A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*, v.21, n.2 Suppl, p. 9S-15S, 1999.

JEFFERYS, D. & FUNDER, J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v.295, n.2-3, p. 131-135, 1996.

JOCA, S. R.; GUIMARAES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology*, v. 185, p. 298-305, 2006.

KAEHLER, S. T.; SINGEWALD, N.; SINNER, C. & PHILIPPU, A. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, v.835, n.2, p. 346-349, 1999.

KAMERMAN, P.; MITCHELL, D. & LABURN, H. Circadian variation in the effects of nitric oxide synthase inhibitors on body temperature, feeding and activity in rats. *Pflugers Arch.*, v.443, n.4, p. 609-616, 2002.

KASTER, M. P.; FERREIRA, P. K.; SANTOS, A. R. & RODRIGUES, A. L. Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: possible involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway. *Behav. Brain Res.*, v.165, n.2, p. 204-209, 2005.

KAWABATA, A.; UMEDA, N. & TAKAGI, H. L-arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-Met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.*, v.109, n.1, p. 73-79, 1993.

- KNOWLES, R. G. & MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, v.298 (Pt 2),249-258, 1994.
- KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A. & MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res. Bull.*, v.62, n.6, p. 505-515, 2004.
- KURT, M.; BILGE, S. S.; AKSOZ, E.; KUKULA, O.; CELIK, S. & KESIM, Y. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice. *Pol. J. Pharmacol.*, v.56, n.3, p. 353-357, 2004.
- LEDO, A.; FRADE, J.; BARBOSA, R. M. & LARANJINHA, J. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol. Aspects Med.*, v.25, n.1-2, p. 75-89, 2004.
- LI, G. & WIERASZKO, A. Dual effect of sodium nitroprusside on potentials recorded from mouse hippocampal slices. *Brain Res.*, v.667, n.1, p. 33-38, 1994.
- LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; LEI, S. Z.; CHEN, H. S.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J. & STAMLER, J. S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, v.364, n.6438, p. 626-632, 1993.
- LOVICK, T. A.; PARRY, D. M.; STEZHKA, V. V. & LUMB, B. M. Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience*, v.95, n.3, p. 763-772, 2000.
- LOWENSTEIN, C. J.; GLATT, C. S.; BREDET, D. S. & SNYDER, S. H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.89, n.15, p. 6711-6715, 1992.
- LOWRY, C. A.; JOHNSON, P. L.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J. & SHEKHAR, A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress.*, v.8, n.4, p. 233-246, 2005.
- MARRAS, R. A.; MARTINS, A. P.; DEL BEL, E. A. & GUIMARAES, F. S. L-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice. *Neuroreport*, v.7, n.1, p. 158-160, 1995.
- MAYER, B.; JOHN, M.; HEINZEL, B.; WERNER, E. R.; WACHTER, H.; SCHULTZ, G. & BOHME, E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.*, v.288, n.1-2, p. 187-191, 1991.
- MCMILLAN, K. & MASTERS, B. S. Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry*, v.34, n.11, p. 3686-3693, 1995.
- MENDLIN, A.; MARTIN, F. J. & JACOBS, B. L. Dopaminergic input is required for increases in serotonin output produced by behavioral activation: an in vivo microdialysis study in rat forebrain. *Neuroscience*, v.93, n.3, p. 897-905, 1999.

MOLLACE, V.; BAGETTA, G. & NISTICO, G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport*, v.2, n.5, p. 269-272, 1991.

MOLLIVER, M. E. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J. Clin. Psychopharmacol.*, v.7, n.6 Suppl, p. 3S-23S, 1987.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. & HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, n.2, p. 109-142, 1991.

MONZON, M. E.; VARAS, M. M. & DE, B., SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*, v.22, n.7, p. 1043-1047, 2001.

NAKAMURA, T. & GOLD, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, v.325, n.6103, p. 442-444, 1987.

NAKANE, M.; SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; FORSTERMANN, U. & MURAD, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, v.316, n.2, p. 175-180, 1993.

NATHAN, C.; CALINGASAN, N.; NEZEZON, J.; DING, A.; LUCIA, M. S.; LA, P. K.; FUORTES, M.; LIN, M.; EHRT, S.; KWON, N. S.; CHEN, J.; VODOVOTZ, Y.; KUPIANI, K. & BEAL, M. F. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, v.202, n.9, p. 1163-1169, 2005.

NELSON, R. J.; DEMAS, G. E.; HUANG, P. L.; FISHMAN, M. C.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. & SNYDER, S. H. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*, v.378, n.6555, p. 383-386, 1995.

NODA, Y.; YAMADA, K.; FURUKAWA, H. & NABESHIMA, T. Involvement of nitric oxide in phencyclidine-induced hyperlocomotion in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v.286, n.3, p. 291-297, 1995.

O'DELL, T. J.; HUANG, P. L.; DAWSON, T. M.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H.; KANDEL, E. R. & FISHMAN, M. C. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*, v.265, n.5171, p. 542-546, 1994.

OGDEN, J. E. & MOORE, P. K. Inhibition of nitric oxide synthase--potential for a novel class of therapeutic agent? *Trends Biotechnol.*, v.13, n.2, p. 70-78, 1995.

OKERE, C. O. & KABA, H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice. *Eur. J. Neurosci.*, v.12, n.12, p. 4552-4556, 2000.

PALLOTTA, M.; SEGIETH, J. & WHITTON, P. S. N-methyl-d-aspartate receptors regulate 5-HT release in the raphe nuclei and frontal cortex of freely moving rats: differential role of 5-HT_{1A} autoreceptors. *Brain Res.*, v.783, n.2, p. 173-178, 1998.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S. & MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v.333, n.6174, p. 664-666, 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v.327, n.6122, p. 524-526, 1987.

PAXINOS, G. & WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. San Diego: American Press; 1997.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. & BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, v.14, n.3, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S. & FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.24, n.3, p. 525-529, 1986.

POBBE, R. L. & ZANGROSSI, H., JR. 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)*, v.183, n.3, p. 314-321, 2005.

POLLOCK, J. S.; FORSTERMANN, U.; MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D.; SCHMIDT, H. H.; NAKANE, M. & MURAD, F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.88, n.23, p. 10480-10484, 1991.

POLLOCK, J. S.; KLINGHOFER, V.; FORSTERMANN, U. & MURAD, F. Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.*, v.309, n.3, p. 402-404, 1992.

PORSOLT, R. D.; LE, P. M. & JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v.266, n.5604, p. 730-732, 1977.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am. J. Psychiatry*, v.149, n.8, p. 999-1010, 1992.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V. F. & CUNHA, F. Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v.441, n.1-2, p. 57-65, 2002.

QUOCK, R. M. & NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.*, v.51, n.25, p. L255-L260, 1992.

RICHARDS, M. K. & MARLETTA, M. A. Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry*, v.33, n.49, p. 14723-14732, 1994.

SANDI, C.; VENERO, C. & GUAZA, C. Decreased spontaneous motor activity and startle response in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v.277, n.1, p. 89-97, 1995.

SCHMIDT, H. H.; GAGNE, G. D.; NAKANE, M.; POLLOCK, J. S.; MILLER, M. F. & MURAD, F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent colocalization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, v.40, n.10, p. 1439-1456, 1992.

SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; GORSKY, L. D.; FORSTERMANN, U. & MURAD, F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.88, n.2, p. 365-369, 1991.

SCHUMAN, E. M. & MADISON, D. V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, v.17, 153-183, 1994.

SEGIETH, J.; GETTING, S. J.; BIGGS, C. S. & WHITTON, P. S. Nitric oxide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats. *Neurosci. Lett.*, v.200, n.2, p. 101-104, 1995.

SESSA, W. C. The nitric oxide synthase family of proteins. *J. Vasc. Res.*, v.31, n.3, p. 131-143, 1994.

SHIBUKI, K. & OKADA, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, v.349, n.6307, p. 326-328, 1991.

SILVA, M. T.; ROSE, S.; HINDMARSH, J. G.; AISLAITNER, G.; GORROD, J. W.; MOORE, P. K.; JENNER, P. & MARSDEN, C. D. Increased striatal dopamine efflux in vivo following inhibition of cerebral nitric oxide synthase by the novel monosodium salt of 7-nitro indazole. *Br. J. Pharmacol.*, v.114, n.2, p. 257-258, 1995.

SILVA, M. T.; ROSE, S.; HINDMARSH, J. G. & JENNER, P. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases dopamine efflux from rat striatum. *J. Neural Transm.*, v.110, n.4, p. 353-362, 2003.

SMITH, J. C. & WHITTON, P. S. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci. Lett.*, v.291, n.1, p. 5-8, 2000.

SMITH, J. C. & WHITTON, P. S. The regulation of NMDA-evoked dopamine release by nitric oxide in the frontal cortex and raphe nuclei of the freely moving rat. *Brain Res.*, v.889, n.1-2, p. 57-62, 2001.

SOUTHAM, E. & GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology*, v.32, n.11, p. 1267-1277, 1993.

SPRINGALL, D. R.; RIVEROS-MORENO, V.; BUTTERY, L.; SUBURO, A.; BISHOP, A. E.; MERRETT, M.; MONCADA, S. & POLAK, J. M. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry*, v.98, n.4, p. 259-266, 1992.

STARR, M. S. & STARR, B. S. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? *Eur. J. Pharmacol.*, v.272, n.2-3, p. 211-217, 1995.

STUEHR, D. J.; CHO, H. J.; KWON, N. S.; WEISE, M. F. & NATHAN, C. F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.88, n.17, p. 7773-7777, 1991.

SUN, L.; ZHAO, Z. Y.; HU, J. & ZHOU, X. L. Potential association of lead exposure during early development of mice with alteration of hippocampus nitric oxide levels and learning memory. *Biomed. Environ. Sci.*, v.18, n.6, p. 375-378, 2005.

TRABACE, L. & KENDRICK, K. M. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J. Neurochem.*, v.75, n.4, p. 1664-1674, 2000.

VALE, A. L.; GREEN, S.; MONTGOMERY, A. M. & SHAFI, S. The nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME produces anxiogenic-like effects in the rat elevated plus-maze test, but not in the social interaction test. *J. Psychopharmacol.*, v.12, n.3, p. 268-272, 1998.

VIANA, M. B.; GRAEFF, F. G. & LOSCHMANN, P. A. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.58, n.1, p. 167-172, 1997.

VINCENT, S. R. & KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, v.46, n.4, p. 755-784, 1992.

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*, v.140, n.1-2, p. 141-147, 2003.

VOLKE, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J. & MANNISTO, P. T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, v.6, n.10, p. 1413-1416, 1995.

WASS, C.; ARCHER, T.; PALSSON, E.; FEJGIN, K.; KLAMER, D.; ENGEL, J. A. & SVENSSON, L. Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: nitric oxide-dependent mechanisms. *Behav. Brain Res.*, v.171, n.1, p. 147-153, 2006.

WEISSMAN, B. A.; KADAR, T.; BRANDEIS, R. & SHAPIRA, S. NG-nitro-L-arginine enhances neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.*, v.146, n.2, p. 139-142, 1992.

WILEY, J. L.; CRISTELLO, A. F. & BALSTER, R. L. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v.294, n.1, p. 101-107, 1995.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.*, v.45, n.3, p. 425-455, 1990.

WOOD, J. & GARTHWAITE, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*, v.33, n.11, p. 1235-1244, 1994.

YILDIZ, F.; ERDEN, B. F.; ULAK, G.; UTKAN, T. & GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v.149, n.1, p. 41-44, 2000.

YUI, Y.; HATTORI, R.; KOSUGA, K.; EIZAWA, H.; HIKI, K. & KAWAI, C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol. Chem.*, v.266, n.19, p. 12544-12547, 1991.