

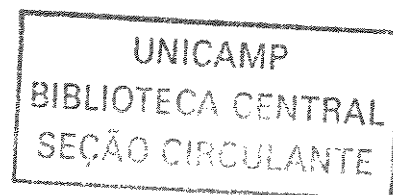
JAQUELINE ROCHA BORGES DOS SANTOS

**INIBIÇÃO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS A MODELOS
COMPORTAMENTAIS**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Jaqueline Rocha Borges dos Santos.

Campinas, 16 de agosto de 2002.

Nancy Airolde Teixeira
Profa. Dra. Nancy Airolde Teixeira
- Orientadora -



JAQUELINE ROCHA BORGES DOS SANTOS

**INIBIÇÃO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS A MODELOS
COMPORTAMENTAIS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

CAMPINAS

2002

iii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE RQ
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Sa 59i
V EX
TOMBO BCI 51500
PROC 16.837100
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/11/02
Nº CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00176431-2

BIB ID 267028

Sa59i

Santos, Jaqueline Rocha Borges dos

Inibição da síntese do óxido nítrico em ratos adultos submetidos a modelos comportamentais / Jaqueline Rocha Borges dos Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Nancy Airoidi Teixeira, Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Comportamento. 2. Stress. 3. Psicofarmacologia. I. Nancy Airoidi Teixeira. II. Edson Antunes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof^a. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

Membros:

Prof^a. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

Prof. Dr. Francesco Langone

Prof^a. Dra. Marilda Emanuel Novaes Lipp

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 16/08/02

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho com amor e carinho à
minha querida mãe Regina, minha irmã
Juliana e meu amado avô Romão, pela
sabedoria e amor incondicional.*

*“O homem que se entrega à ciência do
materialismo utiliza as forças da natureza a
fim de tornar melhor e mais confortável o
ambiente do homem. O homem que se entrega
à ciência do espírito utiliza o poder da mente
para iluminar a alma.”*

Paramhansa Yogananda

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram à realização deste trabalho, em especial:

À professora Dr^a Nancy Airoidi Teixeira, pela paciente orientação, incentivo em minha vida acadêmica, pelo convívio e especialmente pela carinhosa amizade;

Ao professor Dr. Édson Antunes, pela disponibilidade de colaboração na co-orientação do trabalho;

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo e grandiosa colaboração: Ana Augusta Varriano, Cristian César Carrari, Fernanda Datti, Marcelo Datti, Márcia Cristina Guimarães Guilherme, Marcos Augusto Varriano;

À Maria Lúcia Martins e Simone Teixeira, pela colaboração e respeitosa atenção;

Ao Sr. Miguel pelo enorme cuidado e disciplina no trato com os animais;

Aos secretários: Wanderlei e Eduardo pela atenção e por todas as informações prestadas;

Às professoras Dr^a Mary Luci Queiroz, coordenadora da sub-comissão de pós-graduação, e Íscia Lopes, pelas valiosas sugestões e críticas construtivas na qualificação;

Aos colegas de outros laboratórios: Alessandra Stroka, Carla, Deise, Enilton, Ivani, Laurinha, Silvinha, Yoko, pela convivência e apoio;

Ao amigo Neucy Xavier, pelos inúmeros auxílios em informática;

Aos secretários do Departamento de Farmacologia, especialmente Gislaine;

Aos animais de laboratório, pela imensurável doação e contribuição;

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*“Viver, é aceitar cada minuto como um
milagre que não poderá ser repetido.”*

(autor desconhecido)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	xix
Lista de Materiais.....	xxiii
Lista de Figuras e Tabelas.....	xxv
Resumo.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1. Considerações Gerais.....	33
1.2. Óxido Nítrico e Comportamento.....	34
1.3. Óxido Nítrico e Sistema de Estresse.....	38
1.4. Objetivo.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1. Animais.....	41
2.2. Procedimento Experimental.....	42
2.3. Modelo Desamparo Aprendido.....	42
2.4. Labirinto em Cruz Elevado.....	44
2.5. Campo Aberto.....	45
2.6. Teste de Retração da Cauda.....	46
2.7. Esquiva Ativa Sinalizada.....	47
2.8. Esquiva Passiva.....	48
2.9. Análise Estatística.....	50

3. RESULTADOS	51
3.1. Desamparo Aprendido.....	51
3.2. Labirinto em Cruz Elevado.....	54
3.3. Campo Aberto.....	55
3.4. Retração da Cauda.....	56
3.5. Esquiva Ativa Sinalizada.....	57
3.6. Esquiva Passiva.....	59
 4. DISCUSSÃO	 60
 5. CONCLUSÕES	 65
 6. ABSTRACT	 66
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 68

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH:	hormônio adrenocorticotrófico
CA:	campo aberto
CS:	estímulo condicionado
CaM:	calmodulina
CGRP:	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CRH:	hormônio liberador de corticotrofina
EAS:	esquiva ativa sinalizada
EDRF:	fator relaxante derivado do endotélio
GC:	guanilato ciclase
GMPC:	3',5'- monofostato cíclico de guanosina
H₄B:	tetrahydro biopterina
HPA:	hipotalâmico-pituitário-adrenal
i.p.:	intraperitoneal
L-arginina:	L-arginina
L-citrulina:	L-citrulina
LC:	locus coeruleus
LCE:	labirinto em cruz elevado
LTD:	depressão a longo prazo
LTP:	potenciação a longo prazo
NAME:	N-arginina-metil-éster

NMDA:	N-metil-D-aspartato
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintase
cNOS:	óxido nítrico sintase constitutiva
eNOS:	óxido nítrico sintase endotelial
iNOS:	óxido nítrico sintase induzível
nNOS:	óxido nítrico sintase neuronal
PI:	fosfatidil inositol
PVN:	núcleo paraventricular
SON:	núcleo supraóptico
TRC:	teste de retração da cauda
US:	estímulo incondicionado
5-HT:	serotonina

LISTA DE MATERIAIS

Halotano

Halocarbon (New Jersey, EUA)

L-NAME

Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)

NaCl 0,9% Estéril

Fresenius (SP, Brasil)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1:	Representação dos grupos salina e tratados (10mg/kg e 100mg/kg) não-estressados(NE) e estressados (E) no desamparo aprendido.....	51
Figura 1:	Sistema de ativação e liberação do hormônio CRH.....	40
Figura 2:	Tempo de latência de fuga ao choque de ratos não-estressados não-tratados (NE/NT) e estressados não-tratados.....	51
Figura 3:	Tempo de latência de fuga ao choque de ratos não estressados tratados com solução salina (NE/Salina) e estressados tratados com solução salina (E/Salina).....	51
Figura 4:	Tempo de latência de fuga ao choque de ratos não-estressados tratados com L-NAME 10mg/kg e estressados tratados com L-NAME 10mg/kg.....	52
Figura 5:	Tempo de latência de fuga ao choque de ratos não estressados tratados com L-NAME 100mg/kg e estressados tratados com L-NAME 100mg/kg.....	53
Figura 6:	Tempo e frequência de entrada nos braços abertos em LCE dos grupos tratados com: solução salina e L-NAME 100mg/kg.....	54
Figura 7:	Número de entrada nos braços fechados em LCE dos grupos tratados com: solução salina e L-NAME 100mg/kg.....	54
Figura 8:	Tempo de centro em CA dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg.....	55

Figura 9:	Levantar-se (ou <i>rearing</i>) em CA dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg.....	55
Figura 10:	Ambulação em CA dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg.....	55
Figura 11:	Quantidade de bolos fecais em CA dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg.....	56
Figura 12:	Medida de analgesia no TRC dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg.....	56
Figura 13:	Tempo de latência de fuga ao choque em EAS no dia do treino e teste do grupo tratado com solução salina.....	57
Figura 14:	Tempo de latência de fuga ao choque em EAS no dia do treino e teste do grupo tratado com L-NAME 100mg/kg.....	57
Figura 15:	Tempo de latência de fuga ao choque em EAS no dia do treino dos grupos tratados com: solução salina e L-NAME 100mg/kg.....	58
Figura 16:	Tempo de latência no compartimento claro no dia do treino e teste dos grupos: C-C; C-D; D-C; D-D na esQUIVA passiva.....	59
Figura 17:	Porcentagem de aprendizagem dos grupos C-C; C-D; D-C; D-D na esQUIVA passiva.....	59

RESUMO

Neste estudo, investigamos as alterações comportamentais produzidas pela inibição aguda da síntese do óxido nítrico em ratas fêmeas adultas no labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste de retração da cauda, esquiva ativa sinalizada, esquiva passiva e desamparo aprendido.

Os animais receberam L-NAME por via i.p. na dosagem 100mg/kg (grupo tratado, N=10) e solução salina 0,9% (grupo controle, N=10) 30 minutos antes do teste no labirinto em cruz elevado, campo aberto e teste de retração da cauda. No desamparo aprendido, os animais receberam solução salina 0,9%, ou L-NAME 10 e 100mg/kg, 30 minutos antes do confinamento ou choques inescapáveis; 24 horas após, foram submetidos a choques escapáveis. No labirinto em cruz elevado, diferenças estatisticamente significantes foram observadas no tempo e na frequência de entradas nos braços abertos do grupo tratado em relação ao controle. No campo aberto, diferenças estatísticas foram observadas no tempo de centro e levantar-se (*rearing*), no grupo tratado em relação ao controle. No teste de retração da cauda, houve diferença estatisticamente significativa no tempo de latência de retração da cauda do grupo tratado em relação ao controle. Na esquiva passiva, os animais receberam por via i.p. solução salina 0,9% ou L-NAME 100mg/kg 30 minutos antes do treino e teste, consistindo os seguintes grupos: grupo C-C (os animais receberam solução salina 0,9% no dia do treino e teste); C-D (os animais receberam solução salina 0,9% no dia do treino e L-NAME 100mg/kg no dia do teste); D-C (os animais receberam L-NAME 100mg/kg no dia do treino e solução salina 0,9% no dia do teste); D-D (os animais receberam L-NAME 100mg/kg no dia do treino e teste). Não foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de aprendizagem nos grupos.

Na esquiiva ativa sinalizada, diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos salina e tratado, no dia do treino, causando um déficit no escape, mas não os impediu de aprender a tarefa. Desta forma, a inibição da síntese do óxido nítrico alterou parcialmente o comportamento exploratório e emocional, reduziu a ansiedade, produziu analgesia, não prejudicou a aprendizagem e memória, apresentou efeito antidepressivo na dosagem 100mg/kg de L-NAME.

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Considerações Gerais

O óxido nítrico (NO) é um gás endógeno que têm propriedades bioquímicas de um radical livre; muito lábil, com uma meia-vida de cinco segundos (RANDALL *et al.*, 1991; NELSON *et al.*, 1997). A primeira função biológica do óxido nítrico (NO) foi descoberta no sistema circulatório. Foram descobertas no século dezenove, habilidades de nitroglicerina e outros nitratos orgânicos para aliviar a dor e angina pectoris. O relaxamento dos vasos sanguíneos em resposta a acetilcolina requeria que o endotélio secretasse uma substância denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Após anos de estudos, constatou-se que o NO é EDRF (PALMER *et al.*, 1987). Por esta razão, os estudos manipulam o NO indiretamente afetando sua enzima sintética denominada óxido nítrico sintase (NOS). O NO é produzido enzimaticamente por diversos tipos de tecidos. As enzimas responsáveis por esta produção são chamadas de óxido nítrico sintases (NOS), conhecidas por distintas isoformas: em vasos sanguíneos do tecido endotelial (eNOS) e no tecido neuronal (nNOS), consideradas a forma constitutiva da NOS (cNOS); e a forma induzível atuando de macrófagos (iNOS) (NELSON *et al.*, 1997).

Estas izoenzimas foram caracterizadas e purificadas de diferentes tipos de células e tecidos e possuem características bioquímicas, funcionais e mecanismos de regulação que as diferenciam.

O substrato fisiológico das NOS é o aminoácido L-arginina (PALMER *et al.*, 1988) e a reação consiste na oxidação por oxigênio molecular (O₂) de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal para NO.

A reação é acelerada por tetrahydro biopterina (H₄B) e requer calmodulina (CaM; STUHER *et al.*, 1991; WHITE & MARLETTA, 1992; KLATT *et al.*, 1993).

As primeiras evidências de que o mecanismo de ação dos nitratos estaria mediado por um sistema de segundo mensageiro celular envolvendo o 3', 5' – monofosfato cíclico de guanosina (ou GMP cíclico, GMPc) foram relatadas em 1977. Estudos demonstraram (KATSUKI *et al.*, 1977; GARTHWAITE, 1991) que não só os nitratos e nitritos orgânicos, assim como outros compostos contendo nitrogênio e de natureza química diversa (entre os quais encontrava-se o óxido nítrico, NO) possuíam a propriedade de elevar os níveis intracelulares de GMPc por ativação da enzima guanilato ciclase solúvel em diferentes tecidos.

1.2. Óxido Nítrico e Comportamento

A mediação do NO na transdução do sinal dos aminoácidos excitatórios motivou o interesse pelo estudo da isoforma nNOS. Garthwaite e colaboradores (1988) demonstraram pela primeira vez a existência do NO no sistema nervoso central (SNC), observando que células de cerebelo em cultura, estimuladas com aminoácidos excitatórios, liberavam uma substância com as características do NO. A partir de demonstrações experimentais, foi confirmada a existência de NO, onde análogos estruturais da L-arginina com substituintes no grupo guanidino aboliam o aumento de GMPc causado pela estimulação do glutamato via receptores do sub-tipo NMDA (N-metil D-aspartato) em cortes de cérebro (BREDT & SNYDER, 1989; GARTHWAITE *et al.*, 1989).

Gorsky e colaboradores (1989) constataram que a NOS presente em uma linha celular derivada de neuroblastoma era de localização citossólica, utilizava L-arginina como

substrato, requeria NADPH como co-fator, era regulada pelas concentrações fisiológicas intracelulares de Ca^{2+} e era dependente de CaM. Förstermann e colaboradores (1990) confirmaram que a NOS presente em homogenatos de cérebro total também era citossólica e tinha os mesmos requerimentos que a enzima de neuroblastoma, sendo o cerebelo a área de maior atividade.

Os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (agindo em receptores NMDA), provocam o aumento da Ca^{2+} intracelular, atuando sobre o *turn-over* de fosfatidil inositol (PI) no cerebelo (SMITH & LI, 1993) ou pela ativação de uma proteína cinase C em neurônios da região estriada (MARIN *et al.*, 1992). O aumento de Ca^{2+} intracelular induz a união da CaM no sítio específico de reconhecimento da NOS ativando-a. O NO liberado media o aumento de GMPc produzido pela ativação da guanilato ciclase solúvel.

A característica protetora de NO sobre os efeitos depressivos causados pela interleucina-1 em camundongos foi atribuída por Bluthé e colaboradores (1992). Moore e colaboradores (1993) observaram que o 7-nitroindazol (inibidor da cNOS com poucos efeitos periféricos e não derivado da L-arginina) possui efeitos antinociceptivos em modelos experimentais de algesia, e que esta atividade correlaciona com o grau de inibição da cNOS. O desenvolvimento da memória olfativa em camundongos e a participação do NO também foram estudados (BRENNAN & KISHIMOTO, 1993).

Prast & Philippu (2001) têm demonstrado *in vivo* e *in vitro* que em todas as estruturas cerebrais investigadas, NO endógeno modula a liberação de vários neurotransmissores, como: acetilcolina, catecolaminas, aminoácidos inibitórios e excitatórios, serotonina, histamina e adenosina.

O NO pode afetar os processos neuroendócrinos e comportamentais, indiretamente através da mediação em eNOS de vasos sanguíneos, com efeito nas taxas de secreção

neuroendócrinas, ou diretamente como resultado dos efeitos da nNOS no funcionamento neuronal (NELSON *et al.*, 1997).

O NO também pode estar envolvido na potenciação a longo prazo (LTP) no hipocampo, e depressão a longo prazo (LTD) no cerebelo. A liberação de neurotransmissor é influenciada por NO através da ativação do GMPc que ativa proteína cinase, promovendo a fosforilação de proteínas em vesículas sinápticas associado com a liberação de neurotransmissor (MONTAGUE *et al.*, 1994; NELSON *et al.*, 1997). LTP e LTD são formas de plasticidade sináptica envolvidas com aprendizagem e memória (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; LINDEN & CONNOR, 1995). Influxo de cálcio através dos canais pós-sinápticos acoplados aos receptores NMDA e aumento da liberação de glutamato são requeridos pela indução de LTP na região CA1 do hipocampo; tem sido hipotetizado que LTP requer liberação de um mensageiro retrógrado das células piramidais CA1 pós-sinápticas. O NO pode atuar como um mensageiro retrógrado por produzir um aumento na frequência de potenciais excitatórios pós-sinápticos. LTP é bloqueado por inibidores da NOS. Evidencia-se que NO atua diretamente no neurônio pós-sináptico produzindo LTP. Similares evidências existem para o papel de NO em LTD (SHIBUKI *et al.*, 1991; DANIEL *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997).

Pode-se esperar que opióides são capazes de impedir a ativação de receptores NMDA e a subsequente síntese de NO pela redução da liberação pré-sináptica de glutamato. Além disso, opióides são capazes de impedir a liberação de Ca^{2+} do armazenamento intracelular (mediado por trifosfato de inositol) por redução da liberação de substância P (MACHELSKA, 1999). Alternativamente, também é possível que a potenciação da antinociceção opióide por inibição da NOS pode resultar na atividade reduzida da sinalização intracelular em ambos caminhos: GMPc e AMPc (MELLER &

GEBHART, 1993; XU & TSENG, 1995). Os aspectos mais importantes da antinocicepção mediada por opióide na medula espinhal são reduções pré-sinápticas de transmissão liberada das fibras C, e um aumento na condutância de potássio (K^+) na membrana ou uma diminuição na condutância de cálcio (Ca^{2+}), principalmente após ativação de receptor NMDA (GARTHWAITE, 1991).

Conforme mencionado anteriormente, o NO participa de importantes processos neuronais, muito válidos para elucidação de mecanismos cerebrais responsáveis por alterações comportamentais. Neste trabalho, investigaremos as alterações cognitivas e comportamentais em ratas fêmeas, por inibição da atividade da enzima NOS. Será utilizado L-N-arginina-metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima, portanto, a inibição ocorrerá nas diferentes isoformas de NOS. Desta maneira, deve-se considerar a atuação no sistema periférico, por mediação nas isoformas iNOS e eNOS.

A proposta de verificação das alterações comportamentais e cognitivas por inibição das isoformas de NOS, tem como referência trabalho desenvolvido por Faria e colaboradores (1997), demonstrando efeito ansiolítico em modelo comportamental de ansiedade utilizando L-NAME. Pretendemos, a partir destes resultados, proceder a realização de *screening* comportamental. Este *screening* comportamental consistirá na avaliação da resposta ao estresse, assim como depressão comportamental, emocionalidade, alterações cognitivas de aprendizagem e memória, produção de analgesia e também ansiedade.

1.3. Óxido Nítrico e Sistema de Estresse

O estresse psicológico é definido como uma condição complexa e dinâmica na qual a homeostase normal, é perturbada ou ameaçada. O estado de perturbação pode ser induzido por inúmeros estressores físicos e psicológicos. Os estressores físicos e psicológicos demonstram um grupo coordenado de respostas adaptativas físicas, mentais e comportamentais que agem contra e negam o efeito do agente estressor (CHROUSOS & GOLD, 1992).

O aumento dos processos do sistema nervoso central é proporcionado pelos componentes mentais e comportamentais da resposta ao estresse, que controlam a estimulação, o alerta, o humor, a vigilância, a atenção focada e a aquisição de conhecimentos, bem como a inibição dos sistemas que controlam as funções vegetativas, alimentação e reprodução. Estes conceitos intrínsecos do estresse e da resposta ao estresse são exigidos para que a intensidade e a qualidade de cada componente da resposta ao estresse seja apropriada para a ameaça, visto que está claro que uma hiper-reação ou hiporeação ao estresse pode por si só contribuir para uma patologia. Desta forma, cada elemento de um organismo adaptado a resposta do estresse, incluindo mecanismos imunes e inflamatórios, devem responder apropriadamente com mecanismos estimulatórios ou inibitórios. Uma desenfreada ou inadequada repressão dos processos imunes ou inflamatórios pode produzir doenças ou danos a tecidos do organismo, bem como os mecanismos neuroendócrinos que ao inibirem demasiadamente os processos imune e inflamatório produzem imunossupressão e suas conseqüências (WILDER, 1995; KIM & RIVIER, 2000).

Os elementos mediadores do sistema de resposta ao estresse incluem o desempenho da função essencial, sendo caracterizada pela inter-relação existente entre hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o eixo hipotalâmico pituitário adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo simpático. O CRH hipotalâmico modula o nível de excitação, controlando o humor e integrando o sistema de resposta ao estresse (MENZAGUI *et al.*, 1993), ativando o eixo pituitário-adrenal, principalmente a secreção pituitária de adrenocorticotrofina (ACTH) e corticosteróides adrenais. CRH ativa diretamente o sistema nervoso simpático, tendo como consequência o aumento da glicose sangüínea, do débito cardíaco e da pressão sangüínea, e inibição dos sistemas imune e inflamatório.

A ativação do sistema nervoso simpático pelo CRH hipotalâmico é mediada pela inervação direta no tronco cerebral, que espalha a liberação da norepinefrina para todo o cérebro e tecidos periféricos. Esta ativação também estimula a liberação de CRH pelos neurônios hipotalâmicos paraventriculares e a ativação da liberação hipotalâmica de CRH torna-se facilitada pela projeção neuronal direta para o hipotálamo. Deste modo, o sistema de resposta ao estresse apresenta como função um feedback positivo bidirecional. Os sinais para os componentes do sistema de estresse são ativados, e ativam outros centros em todo o cérebro; onde os corticosteróides (maior produto do sistema de estresse ativado) são inibitórios nos componentes dos sistemas de resposta ao estresse, bem como para o sistema imune e inflamatório (CHROUSOS & GOLD, 1992; WILDER, 1995; GILMAN, 1998).

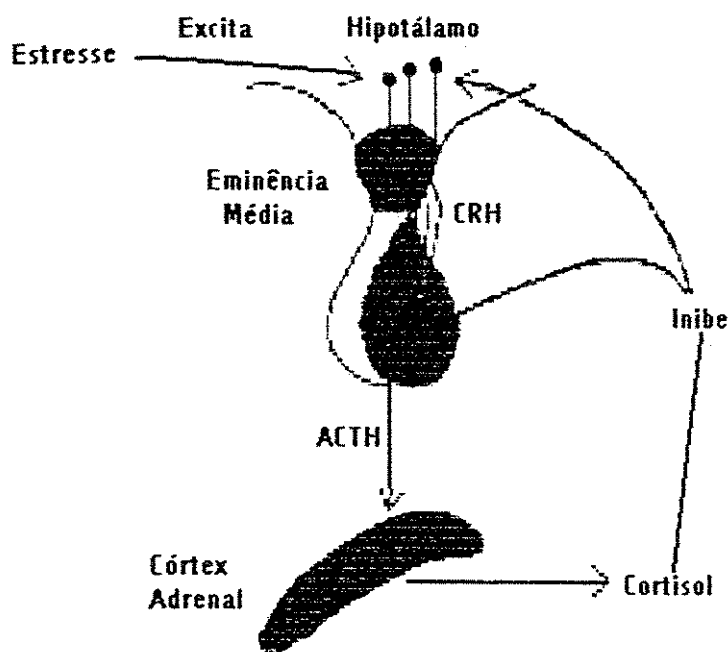


Figura 1. Sistema de ativação e liberação do hormônio CRH induzido por estresse. Adaptado de Guyton, 1998.

A compreensão do sistema de estresse torna-se de precípua importância para investigação do NO e as possíveis alterações comportamentais. A isoforma nNOS está localizada em discretas áreas cerebrais, incluindo os núcleos: paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo (BREDT *et al.*, 1990; BREDT *et al.*, 1992; GROSSMAN *et al.*, 1994; YAMADA *et al.*, 1995). Estes núcleos têm neurônios contendo CRH. Em resposta ao estímulo pela liberação de CRH (primariamente dos neurônios do PVN), a pituitária anterior secreta hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dentro do sistema hipofisal portal. Durante a resposta ao estresse, ACTH atua sob o córtex adrenal para estimular a produção e secreção de glicocorticóides (NELSON *et al.*, 1997).

O NO participa no controle de diferentes processos neurosecretórios, especialmente no sistema neurosecretório do CRH. O sítio redox modulatório do receptor NMDA parece

ser uma estrutura importante no controle do eixo HPA (RIEDEL, 2000). Weidenfeld e colaboradores (1999) têm demonstrado que o NO pode estar envolvido na modulação de respostas do eixo HPA a estímulos, sugerindo que o NO está envolvido na modulação de respostas do eixo HPA a estímulos neuronais não dependentes de fatores imunes, assim como o efeito de NO é mediado pela inibição de secreção hipotalâmica, provavelmente mediada pela nNOS e não pela iNOS.

1.4. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi verificar as alterações cognitivas e comportamentais produzidas pela administração intraperitoneal de L-N-arginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da síntese do óxido nítrico, em ratas fêmeas adultas submetidas a um *screening* comportamental avaliando resposta ao estresse, depressão, ansiedade, aprendizagem, memória, e analgesia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. Animais

Foram utilizados ratos fêmeas Wistar, com 60 a 75 dias de idade, pesando entre 160 e 220 gramas, fornecidos pelo Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Psicofarmacologia no Departamento de Farmacologia da FCM - UNICAMP, alojados em gaiolas coletivas, com 5 (cinco) animais em cada gaiola,

em sala climatizada ($26 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e com ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acendendo às 7h00). Receberam durante todo o período, água e ração para ratos (Purina) *ad libitum*. Após uma semana, os animais foram isolados em gaiolas individuais de polipropileno medindo 30x17x13cm, por onde permaneceram durante 3 (três dias).

2.2. Procedimento Experimental

O procedimento experimental está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), recebendo aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, conforme protocolo nº 309/1, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEa-IB-UNICAMP).

2.3. Modelo de Desamparo Aprendido

O modelo desamparo aprendido é utilizado para avaliar alterações comportamentais relacionadas à depressão, assim como sistema de resposta ao estresse.

Para o protocolo do estresse, os animais foram confinados na caixa de choques e separados em dois grupos (N=10 cada grupo):

Estressados (E): um rato por sessão foi colocado na caixa de choques. Após um minuto de adaptação, os animais foram expostos a 60 choques inescapáveis de 1,0mA. O tempo de duração da sessão foi de 25 minutos.

Não Estressados (NE): animais que não receberam choque, permaneceram apenas confinados na caixa de choques durante 25 minutos.

Estes grupos foram subdivididos em:

Não estressados/ Não tratados (NE/NT): animais que não foram submetidos aos choques inescapáveis (estressados) e não foram tratados;

Estressados/Não tratados (E/NT): animais submetidos aos choques inescapáveis (estressados), não tratados;

Não estressados/Salina (NE/S): animais não submetidos aos choques inescapáveis, que receberam solução salina 0,9% 30 minutos antes do confinamento;

Estressados/Salina (E/S): animais que foram submetidos aos choques inescapáveis (estressados) e receberam solução salina 0,9% 30 minutos antes do estresse;

Não estressados/ T(10mg/kg): animais não submetidos aos choques inescapáveis, que receberam L-NAME 10mg/kg 30 minutos antes do confinamento;

Estressados/T(10mg/kg): animais submetidos aos choques inescapáveis (estressados), que receberam L-NAME 10mg/kg 30 minutos antes do estresse;

Não estressados/T(100mg/kg): animais não submetidos aos choques inescapáveis, que receberam L-NAME 100mg/kg 30 minutos antes do confinamento;

Estressados/T(100mg/kg): animais submetidos aos choques inescapáveis, que receberam L-NAME 100mg/kg 30 minutos antes do treino.

Utilizou-se o programa controlador de choques descrito por Hermini *et al.* (1994) para a execução automática dos choques, onde o programa é acessado através do microcomputador XT 2002 da Microtec, acoplado ao gerador de choques da marca Albarsch.

Os choques incontroláveis são ministrados em uma caixa de 25x25x30 cm, tendo a parte frontal de acrílico transparente e as restantes de alumínio, com tampa ao teto. O piso desta é composto de barras de cobre de 0,3 cm de diâmetro.

A caixa utilizada no teste de fuga corresponde a uma caixa de 50x25x30 cm de alumínio, com tampa e parede frontal de acrílico transparente, modelo “vai-e-vem”. A caixa é dividida em dois compartimentos iguais separados por uma parede de alumínio onde há um orifício de 7,5 cm de altura, por 6 cm de largura, localizado no centro a 8 cm acima do piso em barras. O piso é composto por barras de cobre de 0,3 cm de diâmetro, distando 1 cm entre si, através das quais os choques elétricos são ministrados, com mecanismo “scrambler”. Cada compartimento possui 2 fotocélulas, distando 6 cm entre si, as quais são sensíveis (por interrupção do feixe de luz) ao movimento do sujeito experimental entre os compartimentos; assim, registrando sua presença no compartimento em que se localizar, num dado momento do teste. É necessária a travessia de um compartimento interno para outro para ser registrada uma resposta. Foi definido como resposta de fuga a travessia de um compartimento para o outro durante a apresentação do choque. Essa resposta de fuga tem como consequência a interrupção do choque (SIPEK, 1989).

2.4. Labirinto em Cruz Elevado

Este modelo permite a verificação de medidas de alterações comportamentais relacionadas à ansiedade.

O labirinto consiste de um equipamento elevado 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50x10 cm) dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais desprovidos de teto (50x10x40 cm) formando um ângulo de 90 graus. Ao

redor dos braços abertos são acopladas lâminas acrílicas, fazendo uma borda de 1 cm de altura, com a intenção de evitar que os animais caiam do labirinto. Os animais são colocados no centro aberto do labirinto (10x10 cm) no início de cada sessão sendo que cada animal é submetido a apenas uma sessão experimental no labirinto com a duração de 3 minutos (VORHEES *et al.*, 1979). Os animais (N=10) receberam 30 minutos antes da sessão, ou L-NAME 100mg/kg (grupo tratado), ou solução salina 0,9% (grupo salina) na mesma dosagem, administrados por via i.p.

2.5. Campo Aberto

As alterações de emocionalidade determinadas por medidas do comportamento exploratório, podem ser avaliadas pelo modelo campo aberto.

O aparelho de campo aberto consiste de um círculo de madeira de 85 cm de diâmetro, totalmente cercado de um parapeito também de madeira, com altura de 32 cm.

O aparelho todo é pintado de cor bege. Há no fundo desta arena, desenhado em linhas negras, 3 círculos concêntricos interceptados por 9 segmentos de retas radiais (ficando portanto o chão do aparelho subdividido em 19 regiões de áreas iguais).

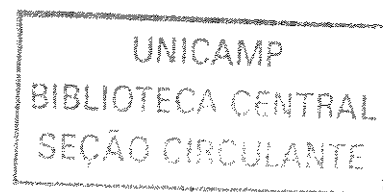
Circundando este sistema, há uma estrutura metálica à uma altura de 110 cm do piso de aparelho. Este sistema suporta duas lâmpadas de 110 watts cada e um cortinado de tule circular, de forma que o observador não possa ser visto pelo animal, no interior do Campo Aberto. Ao lado do aparelho é colocado um circulador de ar, com o intuito de produzir um ruído de fundo constante (abafador de ruídos externos à sala de teste), manter a temperatura da sala onde está o aparelho e distribuir homogeneamente qualquer odor exalado no local (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

2.7. Esquiva Ativa Sinalizada

A caixa de esquiva ativa ou também chamada de *shuttle box*, consiste em um aparelho retangular (60x30x20cm), dotado de células fotoelétricas dispostas ao longo da parede de fundo da caixa, que detectam a posição do animal em cada momento e a divide em dois compartimentos iguais. A parte frontal é construída em acrílico para permitir a visualização do animal. Na parte inferior da caixa, são conduzidos choques de 1mA, com a medida de latência e frequência das respostas de fuga através de contadores eletrônicos.

Na esquiva ativa sinalizada temos uma situação experimental na qual um animal emite uma resposta instrumental em resposta a um estímulo condicionado. Nesta condição, o estímulo condicionado (CS) é apresentado antes do estímulo incondicionado (US), com um choque nas patas, e a resposta do animal de cruzar de um lado para o outro, em uma caixa de dois compartimentos (caixa de vaivém) durante a apresentação do CS evita a liberação do choque. A resposta passa a ser chamada de fuga, ocorrendo após o início de US. Devido à associação entre estímulos (CS - US), esta situação experimental é denominada condicionamento clássico, onde o estímulo condicionado torna-se um sinal antecipatório da ocorrência do estímulo incondicionado.

O procedimento experimental consistiu na administração via i.p. 30 minutos antes do treino de L-NAME 100mg/kg (grupo tratado, N=10) ou solução salina 0,9% (grupo salina, N=10), onde verificou-se o tempo de latência de fuga ao choque em EAS. No dia seguinte (24 horas após), os animais foram novamente submetidos ao modelo EAS, todavia não receberam L-NAME ou solução salina, mas verificou-se novamente o tempo de latência de fuga ao choque.



2.8. Esquiva Passiva

O modelo comportamental denominado esquiva passiva permite a identificação de alterações de memória.

Na esquiva passiva o animal é colocado primeiramente em um ambiente iluminado (desagradável), sendo posteriormente condicionado a penetrar em um ambiente escuro (agradável) para ser reforçado. A seguir aplica-se um estímulo aversivo (choque nas patas) e o animal aprende a não ir mais ao compartimento em busca do reforço (esquiva passiva).

A *shuttle box* utilizada corresponde a uma caixa de madeira medindo 51 x 22 x 28 cm. A caixa é dividida em duas câmaras iguais por uma parede divisória com uma passagem medial (9cm de altura x 6,5 cm de largura); esta passagem é fechada por uma porta em guilhotina. A primeira câmara é revestida completamente de material impermeável branco (fórmica), aberta superiormente e com as seguintes dimensões: 30 x 24 x e 24 cm. É iluminada por uma lâmpada de 60 watts, situada aproximadamente à 40 cm de altura do piso. A outra câmara, pintada completamente de cor preta, possui uma tampa para impedir a entrada de luminosidade em seu interior. Esta caixa tem as mesmas dimensões da câmara clara. Seu piso consiste em barras de aço inoxidável de 3mm de diâmetro com um intervalo de 1,5cm entre uma barra e outra. Estas barras são ligadas a uma fonte geradora de choques com intensidade de 1,0 mA e duração de 5 segundos com intervalos de 5 segundos. O disparo e término dos choques são controlados pelo experimentador.

Os grupos foram divididos em: animais que receberam solução salina 0,9% 30 minutos antes do treino e teste (C-C); animais que receberam solução salina 0,9% 30 minutos antes do treino e L-NAME 100mg/kg 30 minutos antes do teste (C-D); animais que receberam L-NAME 100mg/kg 30 minutos antes do treino e solução salina 0,9% 30

minutos antes do teste (D-C); animais que receberam L-NAME 100mg/kg 30 minutos antes do treino e teste (D-D).

No procedimento experimental, o animal foi colocado na câmara clara, por 10 segundos, com a porta divisória que dá passagem para a câmara escura fechada. Decorrido esse tempo abriu-se a porta e cronometrou-se o tempo que o animal leva para entrar com as quatro patas na câmara escura (latência de treino).

Tão logo o animal entrasse na câmara escura, a porta foi novamente fechada e a fonte de choque acionada durante 5 segundos, liberando choques de intensidade programada de 1.0mA/seg, a intervalos de 5 seg. Repetiu-se essa sessão de choques por mais 2 vezes.

A sessão denominada teste, é realizada 24 horas após a sessão anterior (treino). O animal foi colocado novamente na câmara clara e após 10 segundos, a porta que dá passagem à câmara escura foi aberta. Acionou-se o cronômetro, medindo o tempo que o animal leva para entrar com as quatro patas na câmara escura (latência de teste). O animal era retirado do aparelho quando permanecesse até o máximo de 180 segundos em cada compartimento. Durante o teste o animal não recebe choque. Somou-se o tempo de permanência em cada compartimento para se determinar a porcentagem de aprendizagem, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ aprendizagem} = (\text{tempo na câmara clara} / \text{tempo total}) \times 100$$

2.9. Análise Estatística

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguido teste Student-Newman-Keuls realizado na área trapezoidal sob a curva e sob cada par de curvas (treino x teste), no modelo desamparo aprendido e esquiva ativa sinalizada, respectivamente.

No modelo campo aberto, os resultados são expressos em mediana (com valores mínimo e máximo), assim como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), determinados pelo teste estatístico Mann-Whitney. No labirinto em cruz elevado a análise estatística empregada foi o teste não-paramétrico Welch e Mann-Whitney.

No teste de retração da cauda, as diferenças estatisticamente significantes foram expressas com a utilização do teste t não-pareado.

Para o modelo comportamental esquiva passiva, foram utilizados os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Wilcoxon.

3. RESULTADOS:

3.1. Desamparo Aprendido

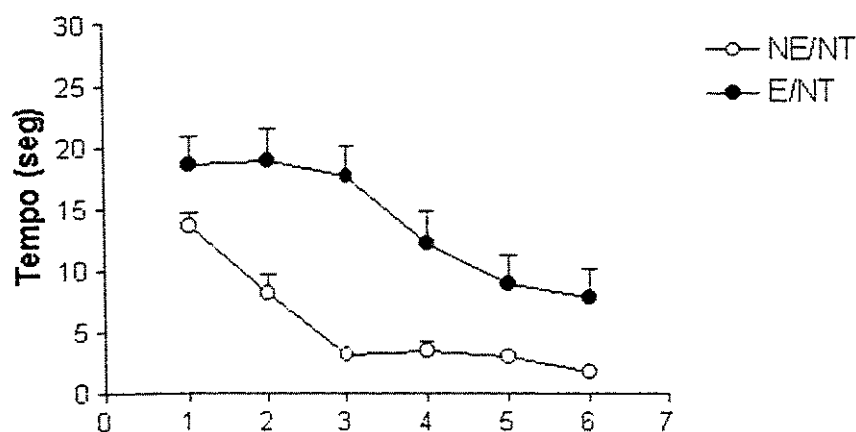


Figura 2. Este gráfico demonstra a determinação do tempo de latência (segundos) em bloco de tentativas, onde: NE/NT representa o grupo não estressado (confinado) não-tratado; e E/NT representa o grupo estressado (submetido a choques inescapáveis) não tratado. Cada bloco representa a média de cinco tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m. N=10 animais fêmeas Wistar. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls.

Diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos NE/NT e E/NT com valores $P < 0,01$.

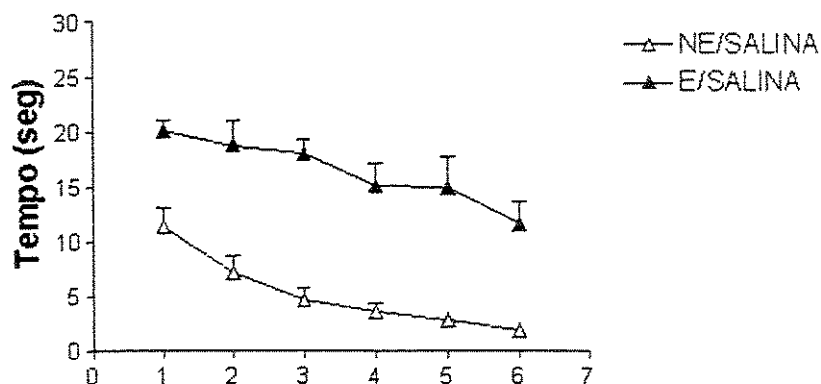


Figura 3. Este gráfico demonstra a determinação do tempo de latência (segundos) em bloco de tentativas, onde: NE/SALINA representa o grupo não estressado (confinado) que recebeu solução salina 0,9%; E/SALINA representa o grupo estressado (submetido

a choques inescapáveis) que recebeu solução salina 0,9%. Cada bloco representa a média de cinco tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m. N=10 animais fêmeas Wistar. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos NE/SALINA e E/SALINA com $P<0,001$.

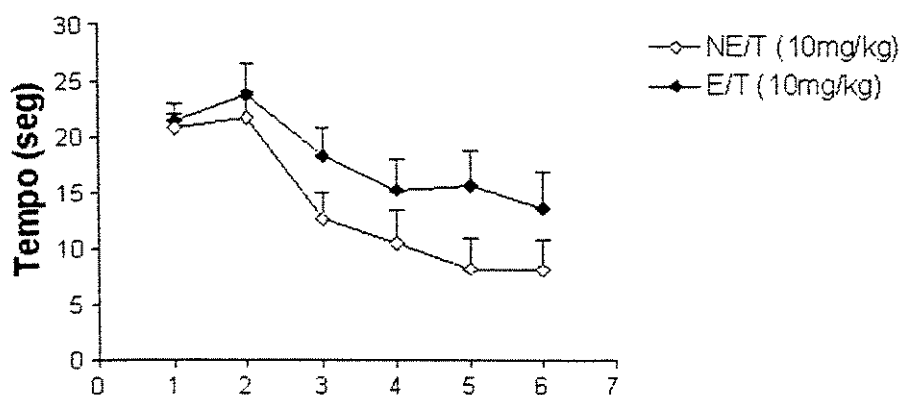


Figura 4. Este gráfico demonstra a determinação do tempo de latência (segundos) em bloco de tentativas, onde: NE/T (10mg/kg) representa o grupo não estressado (confinado) que recebeu L-NAME 10mg/kg; E/T (10mg/kg) representa o grupo estressado (submetido a choques inescapáveis) que recebeu L-NAME 10mg/kg. Cada bloco representa a média de cinco tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m. N=10 animais fêmeas Wistar. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos NE/T (10mg/kg) e E/T (10mg/kg) com valores $P<0,05$.

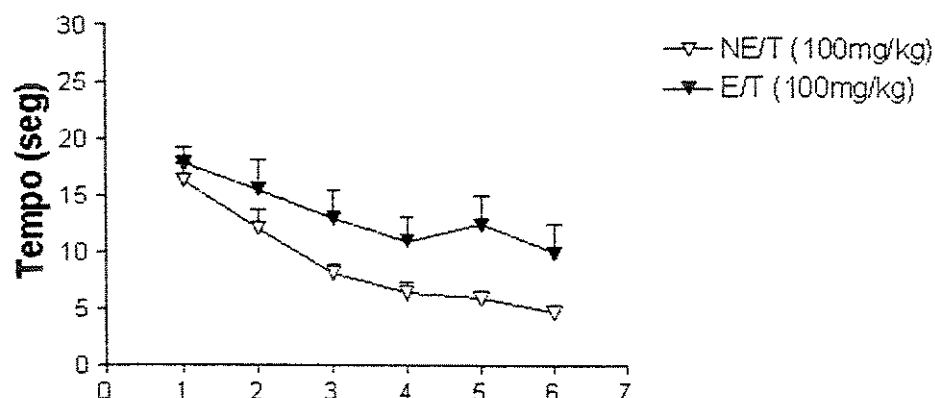


Figura 5. Este gráfico demonstra a determinação do tempo de latência (segundos) em bloco de tentativas, onde: NE/T (100mg/kg) representa o grupo não estressado (confinado) que recebeu L-NAME 100mg/kg; E/T (100mg/kg) representa o grupo estressado (submetido a choques inescapáveis) que recebeu L-NAME 100mg/kg. Cada bloco representa a média de cinco tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m. N=10 animais fêmeas Wistar. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos NE/T (100mg/kg) e E/T (100mg/kg).

Tabela 1. Representação dos grupos NE/SALINA e E/SALINA; NE/T (10mg/kg) e E/T (10mg/kg); NE/T (100mg/kg) e E/T (100mg/kg) no desamparo aprendido.

GRUPOS	SALINA	L-NAME 10mg/kg	L-NAME 100mg/kg
Não estressado (NE)	30 $\pm$ 4,5	54,7 $\pm$ 3,4	71,3 $\pm$ 10,5
Estressado (E)	99,3 $\pm$ 7,4***	78,9 $\pm$ 12,9*	111,2 $\pm$ 14,8

* P<0,05. *** P<0,001.

3.2. Labirinto em Cruz Elevado

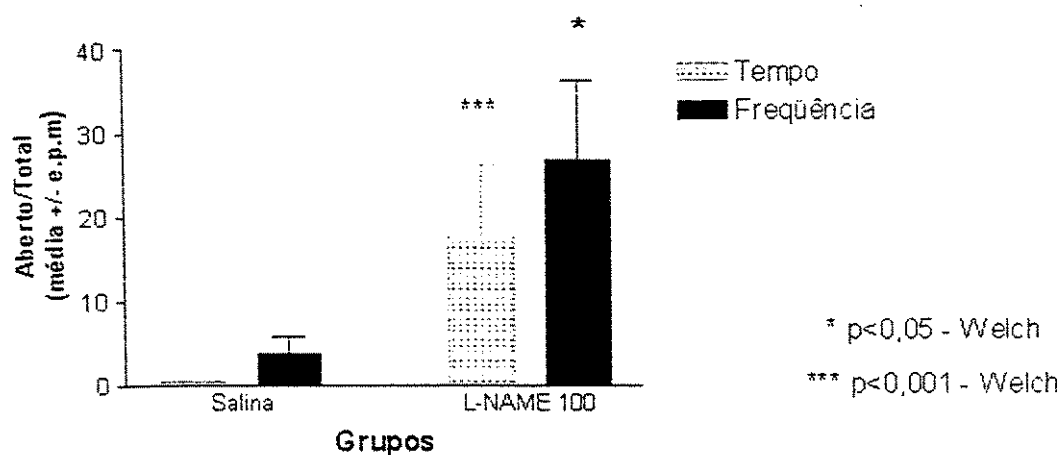


Figura 6. Neste gráfico estão demonstrados: o tempo de permanência e frequência de entrada nos braços abertos, dos grupos salina e L-NAME 100mg/kg. A análise estatística empregada foi o teste não- paramétrico Welch. N=10 (cada grupo).

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas no tempo de permanência, assim como frequência de entradas nos braços abertos (grupo L-NAME 100mg/kg= $53,6 \pm 26,1$; grupo salina = $1,1 \pm 0,5$).

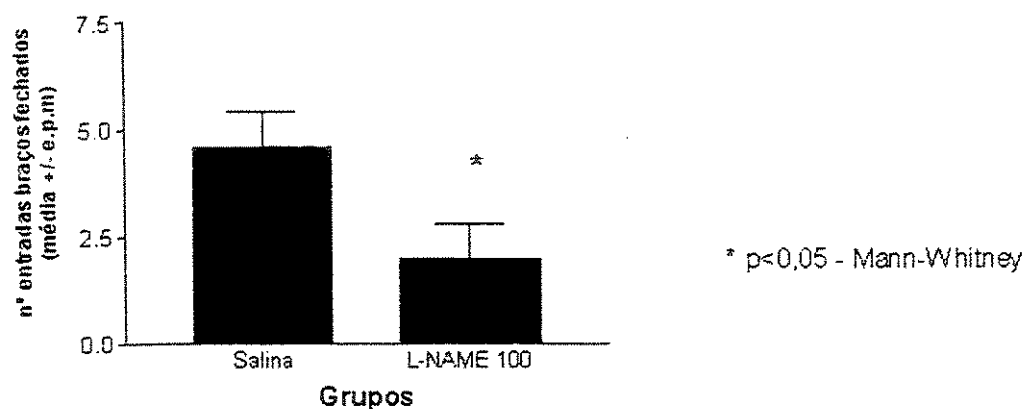


Figura 7. Neste gráfico pode-se observar o número de entradas nos braços fechados dos grupos salina e L-NAME 100mg/kg. A análise estatística utilizada foi o teste não-paramétrico Mann-Whitney. N=10 (cada grupo).

3.3. Campo Aberto

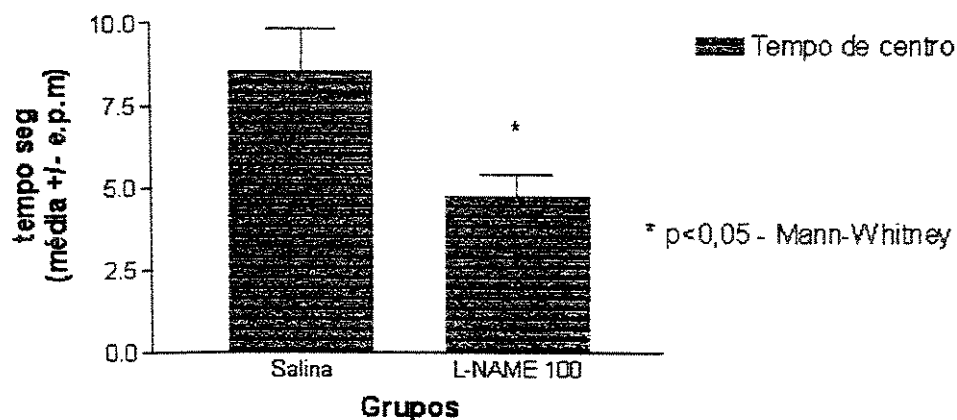


Figura 8. Esse gráfico demonstra o tempo de centro dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg. N=10 (cada grupo).

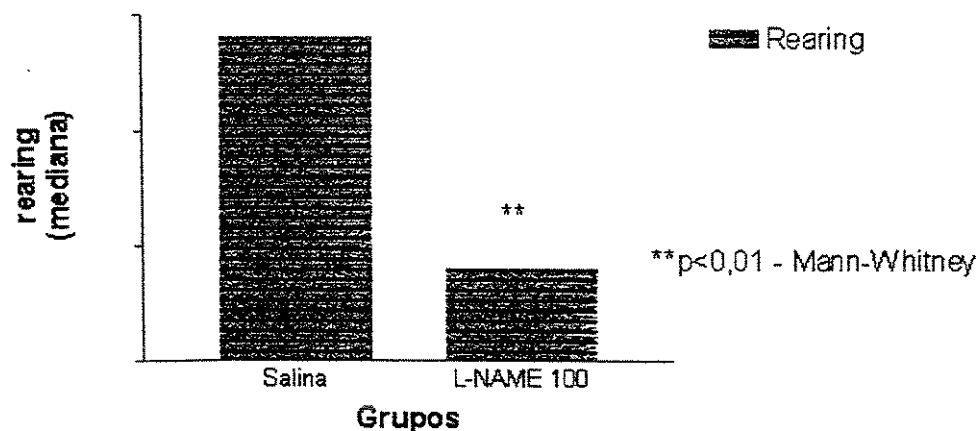


Figura 9. Este gráfico demonstra o levantar-se (ou *rearing*) dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg (cada grupo).

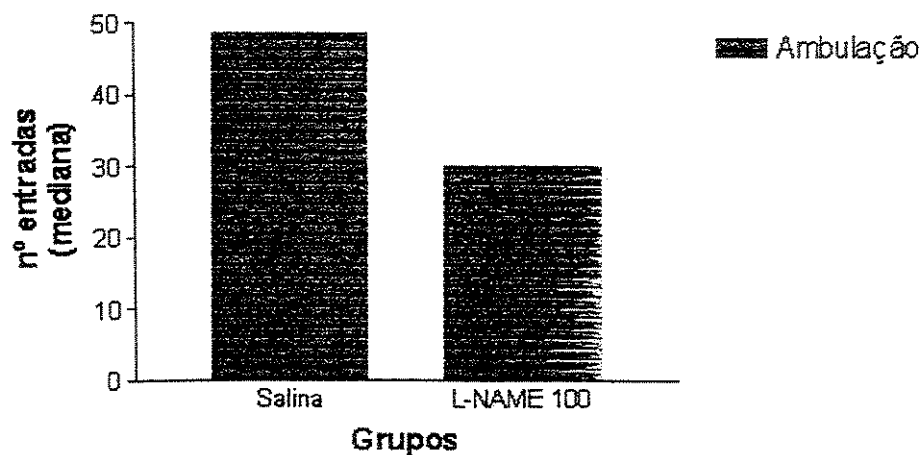


Figura 10. Este gráfico demonstra a ambulação dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg. N=10 (cada grupo).

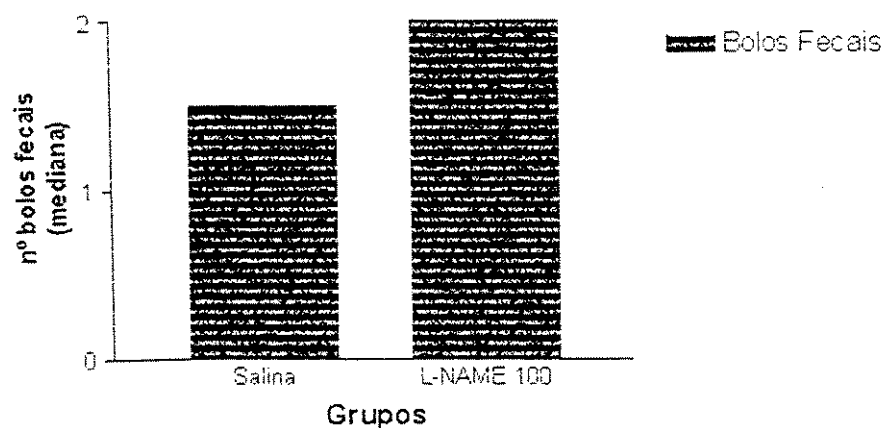


Figura 11. Neste gráfico estão demonstrados os bolos fecais dos grupos: salina e L-NAME 100mg/kg. N=10 (cada grupo).

3.4. Teste de Retração da Cauda

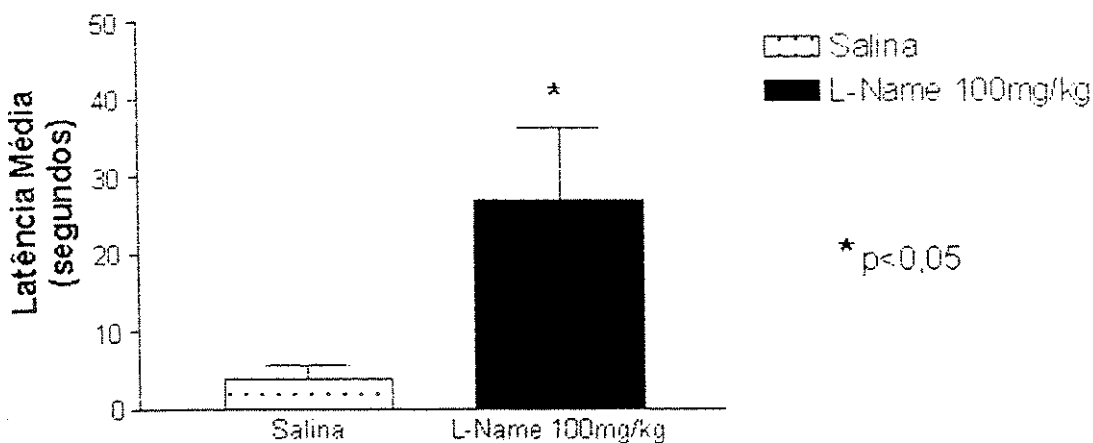


Figura 12. O gráfico acima demonstra os grupos: Salina (solução fisiológica 0,9%) e L-Name 100mg/kg (N=10 cada) no teste de retração da cauda. A análise estatística empregada foi o teste t Student (não pareado).

Diferenças estatísticas foram observadas no grupo tratado (L-NAME 100mg/kg) com relação ao controle (grupo L-NAME = 47.44 ± 6.89 ; grupo salina = 19.33 ± 3.04).

3.5. Esquiva Ativa Sinalizada

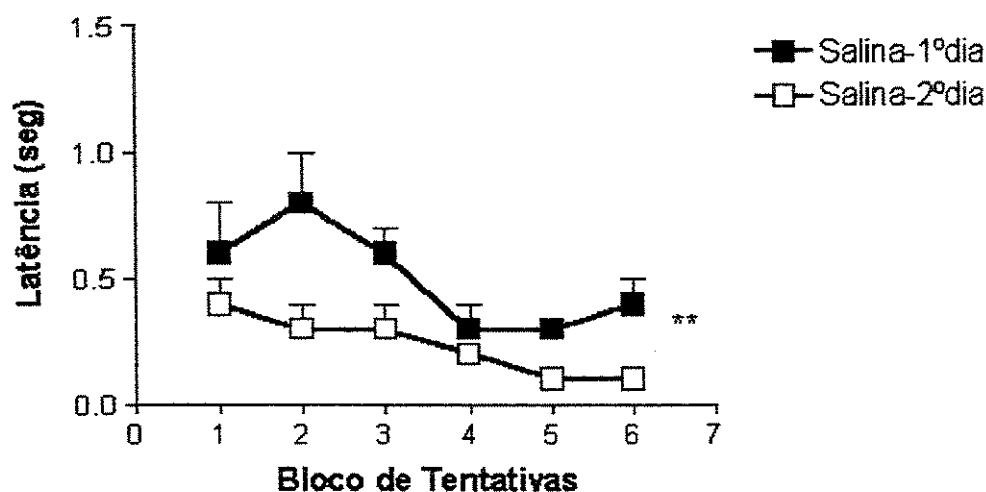


Figura 13. Determinação do tempo de latência em blocos de tentativas. Cada bloco representa a média de 5 tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m.

N = 10 animais fêmeas Wistar. A análise estatística empregada foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls. * * $p < 0,01$.

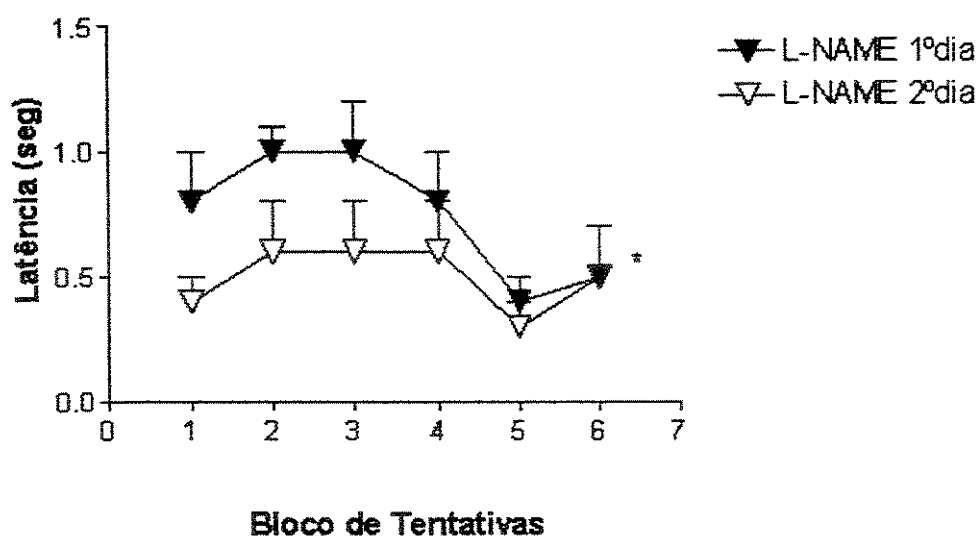


Figura 14. Determinação do tempo de latência em blocos de tentativas. Cada bloco representa a média de 5 tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m.

N = 10 animais fêmeas Wistar. A análise estatística empregada foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$.

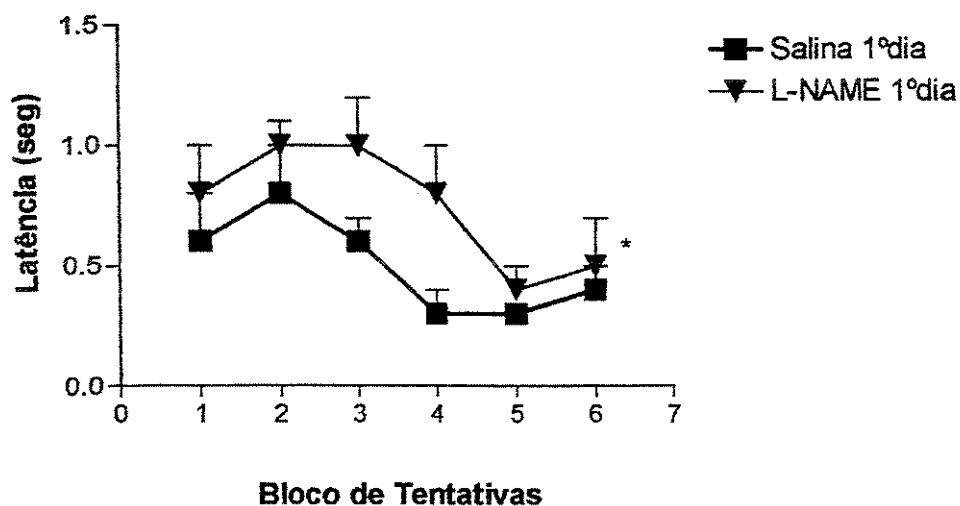


Figura 15. Determinação do tempo de latência em blocos de tentativas. Cada bloco representa a média de 5 tentativas. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m.

N = 10 animais fêmeas Wistar. Análise estatística: ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado L-NAME em relação ao Salina no dia do treino.

3.6. Esquiva Passiva

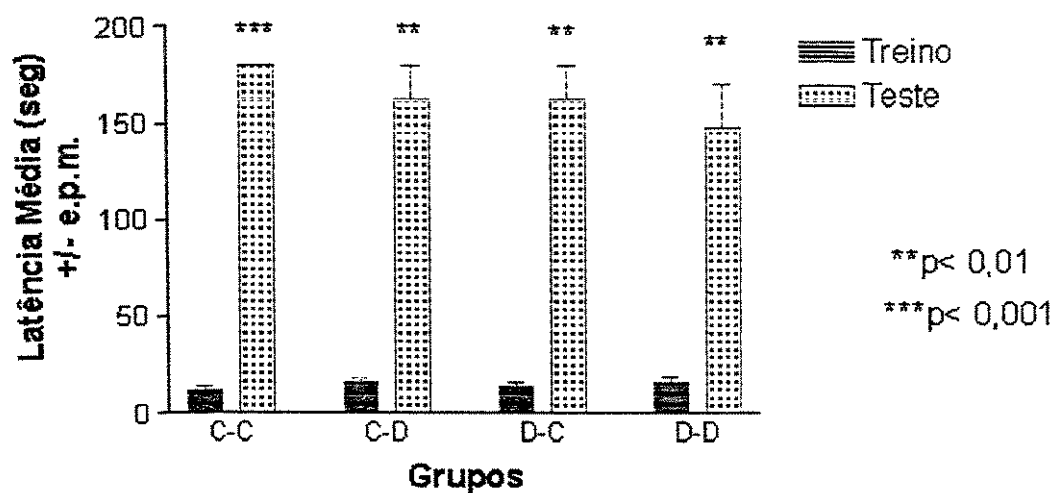


Figura 16. O gráfico demonstra a latência média (segundos) $\pm$ e.p.m. de permanência no compartimento claro nos dias do treino e teste dos grupos: C-C; C-D; D-C; D-D. A análise estatística empregada foi Wilcoxon.

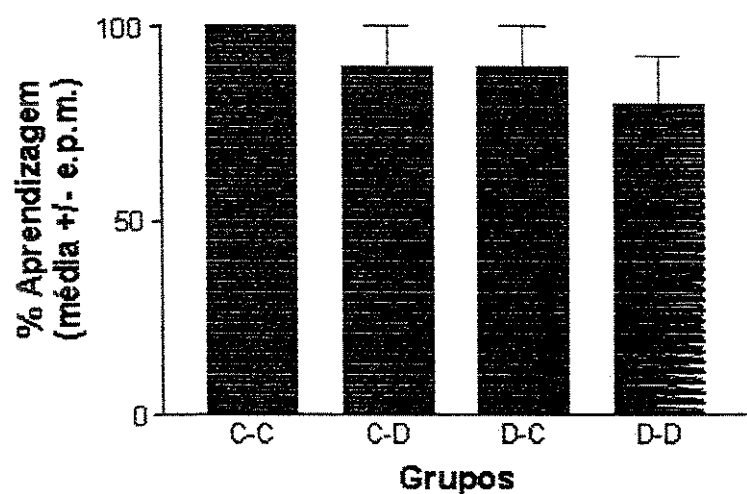


Figura 17. O gráfico demonstra a porcentagem de aprendizagem dos grupos: C-C; C-D; D-C; D-D na esquiva passiva. A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis.

Não foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de aprendizagem entre os grupos.

3. DISCUSSÃO

Os modelos comportamentais empregados neste trabalho, tiveram como objetivo elucidar as funções neuromodulatórias do NO e a sua influência no comportamento animal. O NO tem importância por participar em mecanismos cerebrais que produzem alterações comportamentais, com destaque a sua atuação como mensageiro retrógrado da neurotransmissão glutamatérgica. Logo, se inibimos a síntese do NO temos a diminuição de potencial excitatório pós-sináptico e conseqüentes alterações funcionais em circuitos que participam na organização do comportamento. Com isto, pode-se acrescentar a demonstração experimental que resultou no efeito ansiolítico produzido por L-NAME na dosagem 100mg.kg^{-1} . Faria e colaboradores (1997) verificaram que a inibição aguda de NOS teve um efeito ansiolítico em ratos no LCE. Guimarães e colaboradores (1994) relataram que a microinjeção de L-NAME na substância cinzenta periaquedutal de ratos teve um efeito ansiolítico no LCE. Volke e colaboradores (1995) relataram que em baixas dosagens (p.e. 1mg.kg^{-1}) a administração aguda de L-NAME não ocasionou ansiólise.

Por outro lado, Paul e colaboradores (2000) apontaram que L-NAME (i.p., 50mg.kg^{-1}) aumentou a atividade de GABA transaminase, portanto reduzindo a concentração de GABA. O referido trabalho sugere que o NO desempenha um papel inibitório da GABA transaminase no cérebro.

Neste trabalho, os resultados apresentados no modelo desamparo aprendido demonstraram que L-NAME na dosagem 100mg.kg^{-1} teve efeito semelhante tanto em animais NE e E. Justifica-se este efeito por hipóteses, onde os mecanismos de ação ainda não estão bem elucidados: (1) no PVN e SON do hipotálamo tem-se a localização de NOS e CRH, onde na resposta ao estresse a secreção aumentada de CRH é reduzida por

L-NAME (NELSON *et al.*, 1997); (2) a inibição da atividade de NOS no hipocampo aumenta a liberação de 5-HT; (3) mesmo ocorrendo produção de analgesia por aumento de antinocicepção opióide, impedindo a ativação de receptores NMDA, não ocorreram diferenças significativas entre os grupos NE e E. Acrescenta-se ainda o possível desempenho de NO na antinocicepção colinérgica mediada por estimulação de receptor 5HT-1A. Os inibidores de NOS aumentam metabolismo de serotonina no cérebro, sugerindo que NO pode atuar através de mecanismos serotoninérgicos centrais (SQUADRITO *et al.*, 1994; NELSON *et al.*, 1997). Jain & Kulkarni (1999) observaram que a bupiriona teve seu efeito potencializado por L-NAME 20mg.kg⁻¹. Desta forma, a inibição da atividade de NOS pode produzir um efeito antidepressivo na dosagem 100mg.kg⁻¹ de L-NAME, possivelmente atuando como modulador de receptor 5HT-1A.

Prosseguindo a avaliação dos resultados no modelo do desamparo aprendido, pode-se relacionar o envolvimento da resposta ao estresse e serotonina (5-HT), onde mecanismos serotoninérgicos no *locus coeruleus* (LC) são considerados por várias importantes funções incluindo a resposta ao estresse (SINNER *et al.*, 2001). O aumento de CRH é atenuado pelo tratamento com L-NAME, indicando um papel modulatório de NO na liberação de CRH (RIVIER & SHEN, 1994). O NO atua indiretamente no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) por aumento neuromodulatório atuando no hipotálamo ou na glândula pituitária (RIVIER, 1995; NELSON *et al.*, 1997). Estudos realizados por Rivier & Shen (1994) sugerem que o NO está intimamente envolvido na regulação do eixo HPA.

Segieth e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação de receptor NMDA diminui a liberação de 5-HT no hipocampo em ratos, evidenciando a associação entre função de receptor NMDA e a produção de NO com a regulação da liberação de 5-HT

em outras regiões cerebrais. Outras investigações demonstraram que a infusão de NMDA (100 micro M) diminuiu a liberação hipocampal de 5-HT por aproximadamente 70%, sustentando evidência do desempenho de NO na modulação basal da transmissão glutamatérgica, evocando mudanças na liberação de 5-HT no hipocampo. Por outro lado, um estudo investigou o possível papel de NO como mensageiro intermediário na regulação de neurotransmissão de 5-HT no LC. O inibidor da NOS, L-NAME, não alterou significativamente a liberação de 5-HT no LC (SINNER *et al.*, 2001). Os resultados deste estudo sugerem que a liberação de 5-HT no hipocampo é modulada por NO.

Com relação aos resultados apresentados pelos modelos comportamentais de aprendizagem e memória, sabemos que LTP está diretamente relacionado ao NO, porque: (1) o NO atua no hipocampo como mensageiro retrógrado, aumentando a amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos da neurotransmissão glutamatérgica; (2) LTP requer liberação de mensageiro retrógrado (NO) para consolidação; (3) *in vitro* LTP consolida aprendizagem e memória. Os resultados determinados respectivamente em EAS e EP demonstraram que, embora ocorrendo déficit de fuga ao choque no dia do treino do grupo L-NAME em EAS, não ocorreram diferenças significativas. Em EP, também não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos dissociados; todavia, pode-se observar que o grupo D-D possui menor latência média no dia do teste. Isto significa que os animais memorizaram, mas apresentaram um pequeno déficit no dia do teste, uma vez que não permaneceram por 180seg no compartimento claro e também entraram no compartimento escuro. Com isto, pode-se sugerir que o NO têm participação na consolidação da aprendizagem e memória. Porém, deve-se considerar que há limites na utilização de L-NAME – inibindo

não seletivamente a isoforma nNOS, além disto L-NAME foi administrado agudamente via i.p. . Deste modo, possivelmente o tratamento crônico e a utilização de um inibidor mais seletivo de NOS, demonstrariam diferenças relevantes no prejuízo da aprendizagem e memória, especialmente impedindo LTP.

Os resultados no teste comportamental campo aberto, demonstraram que o grupo tratado com L-NAME 100mg.kg⁻¹ permaneceu por menos tempo no centro da arena, caracterizando produção de ansiólise. Todavia, esta constatação não é corroborada pela análise da medida do *rearing* (ou levantar-se), pois o grupo tratado com L-NAME, de acordo com esta medida, explorou menos o ambiente. Jachimowicz e colaboradores (1998) demonstraram que o L-NAME diminuiu a atividade dos animais no teste campo aberto, administrada na dosagem 10mg/kg, após a administração de l-arginina na dosagem 10mg/kg. Somente a administração de L-NAME na dosagem 10mg/kg não afetou a atividade locomotora de ratos no campo aberto (VOLKE *et al.*, 1995). Neste trabalho, os animais demonstraram uma menor atividade exploratória devido à atividade locomotora afetada, uma vez que receberam L-NAME 100mg.kg⁻¹ via i.p. 30 minutos antes do teste no campo aberto.

Após avaliação no campo aberto, foram realizadas medidas de analgesia (conforme descrição na metodologia), e o grupo tratado com L-NAME demonstrou efeito analgésico. Atribui-se este efeito à inibição de NOS, que diminui eficácia sináptica mediada por receptor NMDA, tendo como consequência o aumento de antinocicepção opióide. Além disto, substâncias opióides impedem a ativação de receptores NMDA e a subsequente síntese de NO pela redução da liberação pré-sináptica de glutamato (MACHELSKA, 1999). A inibição da NOS na medula espinhal leva à antinocicepção (MELLER & GEBHART 1993; PRZEWLOCKI *et al.*, 1993; MELLER

et al., 1996). Estes dados comportamentais são evidenciados por resultados de estudos bioquímicos mostrando que na medula espinhal o doador de NO aumenta a liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Ambos neuropeptídeos estão principalmente envolvidos na transmissão nociceptiva (GARRY *et al.*, 1994). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a inibição de NOS produziu um aumento da antinocicepção opióide devido à diminuição da amplitude de potenciais excitatórios pós-sinápticos mediada por receptor NMDA.

Deve-se considerar neste trabalho, algumas limitações e especialmente possíveis efeitos adversos relacionados ao L-NAME, uma vez que a referida droga não inibe seletivamente a NOS, portanto atuando também no sistema periférico. O principal efeito adverso considerado é a elevação da pressão arterial, que neste estudo não foi medida; mas verificou-se que L-NAME 100mg.kg⁻¹ nos grupos estressados não ocasionou a morte dos animais.

A importância de realização de um *screening* comportamental, suporta evidências de que o sistema nervoso e endócrino estão anatomicamente e funcionalmente interconectados. Estes sistemas suprem a base molecular para uma integração bidirecional, respondendo e expressando a um grande número de moléculas regulatórias em comum (esteróides, citocinas, neuropeptídeos etc.). A implicação de anormalidades do sistema neuroendócrino, evidencia de maneira crescente que uma variedade de mecanismos como idade, gênero e outros fatores geneticamente determinados regulam a resposta neuroendócrinoimune.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a inibição aguda da síntese de óxido nítrico:

1. alterou parcialmente comportamento exploratório e emocional por afetar a atividade locomotora e produzir ansiólise no campo aberto;
2. reduziu ansiedade no labirinto em cruz elevado;
3. produziu analgesia no teste de retração da cauda;
4. não prejudicou aprendizagem e memória na esquiva passiva;
5. prejudicou o desempenho de fuga no dia do treino na esquiva ativa sinalizada;
6. produziu efeito antidepressivo, possivelmente atuando como modulador de receptor 5HT-1A.

6. ABSTRACT

In this work, we investigated behaviour altered produced for acute inhibition of nitric oxide synthesis in adults female rats in plus maze test, open field, tail flick test, active avoidance signalling, passive avoidance and learned helplessness.

The animals received L-NAME i.p. 100mg/kg (treated group, N=10) and saline solution 0,9% (control group, N=10) 30 minutes before of plus maze test, open field and tail flick test. In learned helplessness, the animals received saline solution 0,9%, or L-NAME 10 and 100mg/kg, 30 minutes before confinement or inescapable shocks; 24 hours before, were submitted at escapable shocks. In the plus maze test, significant statistical differences were observed in time and frequency of entries into open arms of treated and control groups. In the open field, statistical differences were observed in center time and rearing, in treated group relative to control group. Statistical differences were seen at tail flick test in latency time of tail flick of treated group relative to control group. In passive avoidance, the animals received i.p. saline solution 0,9% or L-NAME 100mg/kg 30 minutes before training and test, divided in four groups: group C-C (the animals received saline solution 0,9% in the training and test days); C-D (the animals received saline solution 0,9% in the day of training and L-NAME 100mg/kg in the test); D-C (the animals received L-NAME 100mg/kg in the day of training and saline solution 0,9% in the test); D-D (the animals received L-NAME 100mg/kg in the training and test days). No statistical differences were seen in percentage of learning in the groups. In active avoidance signaling, statistical differences were observed between control group and treated group, in the training day, caused an escape deficit, but did not avoided them to learn task. Thus, the acute inhibition of nitric oxide synthesis altered partially

exploratory and emotional behaviour, reduced anxiety, produced analgesy, did not injured learned and memory, presented antidepressive effect at dose of 100mg.kg^{-1} .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, **361**: 31-39, 1993.
- BLUTHE, R.M.; SPARBER, S.; DANTZER, R. Modulation of the behavioural effects of interleukin-1 in mice by nitric oxide. **Neuroreport**, **3**:207-9, 1992.
- BRANDÃO, M.L. Psicofisiologia. Ed. Atheneu. 1999.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci USA**, **86**: 9030-3, 1989.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA**, **87**: 682-85, 1990.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neural messenger. **Neuron**, **8**: 3-11, 1992.
- BRENNAN, P.A. & KISHIMOTO, J. Local inhibition of nitric oxide synthase activity in the accessory olfactory bulb does not prevent the formation of an olfactory memory in mice. **B Res**, **610**: 306-312, 1993.
- BRUHWYLER, J.; CHLEIDE, E.; LIEGEOIS, J.F.; CARREER, F. Nitric oxide: A new messenger in the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, **17**: 373-384, 1994.
- CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. **JAMA**, **267**: 1244-52, 1992.
- DANIEL, H.; HEMART, N.; JAILLARD, D.; CREPEL, F. Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3', 5'- cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. **Eur J Neurosci**, **5**: 1079-1082, 1993.
- ESPLUGUES, J.V.; BARRACHINA, M.D.; BELTRAN, B.; CALATAYUD, S.; WHITTLE, B.J.; MONCADA, S. Inhibition of gastric acid secretion by stress: a

- protective reflex mediated by cerebral nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **93**:14839-44, 1996.
- FARIA, M.S. et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur J Pharmacol**, **323**:37-43, 1997.
- FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action, in: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. eds. J.M.Elliot, D.J.Heal and C.A.Marsden (Elsevier, Amsterdam), 1992.
- FÖRSTERMANN, U.; GORSKY, L.D.; POLLOCK, J.S. SCHMIDT, H.H.H.W.; HELLER, M.; Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**, **168**: 727-32, 1990.
- GARRY, M.G.; RICHARDSON, J.D.; HARGREAVES, K.M. Sodium nitroprusside evokes the release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P from dorsal horn slices via nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent mechanisms. **J Neurosci**, **14**: 4329-37, 1994.
- GARTHWAITE, J; BOULTON, C L. Nitric oxide signalling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, **57**: 683-706, 1995.
- GARTHWAITE, J; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain. **Nature** **336**: 385-388, 1988.
- GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.J. MONCADA, S.A. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur J Pharmacol**, **172**: 413-6, 1989.

- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-signalling in the nervous system. **TINS** 14: 60-67, 1991.
- GILMAN, A.G. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 ed. Guanabara Koogan. 1998.
- GORSKY, L.D. FÖRSTERMANN, U.; ISHII, K.; MURAD, F. Production of an EDRF-like activity in the cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells. **FASEB J**, 4: 1494-500, 1989.
- GRAEFF, F.G. Brain defence systems and anxiety, in: Handbook of Anxiety. The Neurobiology of Anxiety. eds. G.D. Burrows, M. Routh and R. Noyes (Elsevier, Amsterdam) p.307, 1991.
- 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**, 112: 33-41, 2000.
- GROSSMAN, A.B.; ROSSANSMITH, W.G.; KABIGTING, E.B.; CADD, G.; CLIFTON, D.; STEINER, R.A. The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotropin-releasing hormone neurons. **J Endocrinol**, 140: R5-R8, 1994.
- GUTMARAES, 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**, 5: 1929-32, 1994.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 9 ed. Guanabara Koogan. pp. 397-403; 701-702; 871-80. 1998.

- HALCÁK, L. et al. Inhibition of NO synthase activity in nervous tissue leads to decreased motor activity in the rat. **Physiol Res**, **49**:1, 143-9, 2000.
- HALL, S; MILNE, B; JHAMANDAS, K. Excitatory action of N-methyl-D-aspartate on the rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide: an in vivo voltammetric study. **Brain Res**, **796**:176-86, 1998.
- HAMALAINEN, M.M.; LOVICK, T.A. Involvement of nitric oxide and serotonin in modulation of antinociception and pressor responses evoked by stimulation in the dorsolateral region of the periaqueductal gray matter in the rat. **Neuroscience**, **80**: 821-7, 1997.
- HAULICA, I; BUSUIOC, A; NEAMTU, C; DORNEANU, V; TITU, G; SPAC, A.
Possible involvement of L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of stress-induced analgesia. **Rom J Physiol**, **34**:19-24, 1997.
- HERMINI, A.H. TEIXEIRA, N.A.; MENDES, V.E.; PEREIRA, D.G. De of a software to control depression experiments through the "learned helplessness". **Physics in Medicine and Biology**, **39a** (part 1): 430, 1994.
- JACHIMOWICZ, A; HOLY, Z; WISNIEWSKI, K. The participation of nitric oxide in the facilitator effect of arginine vasopressin on memory. **Acta Neurobiol Exp (Warsz)**, **58**:37-45, 1998.
- JAIN, N.K. & KULKARNI, S.K. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, modulates cholinergic antinociception. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, **21**: 161-5, 1999.
- JOHANSSON, C; JACKSON, D.M.; SVENSSON, L. Nitric oxide synthase inhibition blocks phencyclidine-induced behavioural effects on prepulse inhibition and locomotor activity in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, **131**:167-73, 1997.

- KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J Cyclic Nucleotide Res**, **3**: 23-35, 1977.
- KIM, C.K. & RIVIER, C.L. Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats. **Endocrinology**, **141**: 2244-53, 2000.
- KLATT, P.; SCHMIDT, K.; URAY, G.; MAYER, B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, co-factor requirement, and the role of N-hydroxy-L-arginine as an intermediate. **J Biol Chem**, **268**: 781-7, 1993.
- KOPF, S.R. & BARATTI, C.M. Enhancement of the post-training cholinergic tone antagonizes the impairment of retention induced by a nitric oxide synthase inhibitor in mice. **Neurobiol Learn Mem**, **65**: 207-12, 1996.
- KOPONEN, S; KEINANEN, R; ROIVAINEN, R; HIRVONEN, T; NARHI, M; CHAN, PH; KOISTINAHO, J. Spreading depression induces expression of calcium-independent protein kinase C subspecies in ischaemia-sensitive cortical layers: regulation by N-methyl-D-aspartate receptors and glucocorticoids. **Neuroscience**, **93**: 985-93, 1999.
- KVETNANSKY, R; PACAK, K; TOKAREV, D; JELOKOVA, J; JEZOVA, D; RUSNAK, M. Chronic blockade of nitric oxide synthesis elevates plasma levels of catecholamines and their metabolites at rest and during stress in rats. **Neurochem Res**, **22**: 995-1001, 1997.

- LINDEN, D.J. & CONNOR, J.A. Long-term synaptic depression. **Annu Rev Neurosci**, **18**: 319-357, 1995.
- LOVICK, T.A. Role of nitric oxide in medullary raphe-evoked inhibition of neuronal activity in the periaqueductal gray matter. **Neuroscience**, **75**:1203-9, 1996.
- MACHELSKA, H; PAVONE, F; CAPONE, F; PRZEWLOCKA, B. Antinociception after both peripheral and intrathecal injection of oxotremorine is modulated by spinal nitric oxide. **Eur Neuropsychopharmacol**, **9**: 213-7, 1999 .
- MALEN, P.L. & CHAPMAN, P.F. Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. **J Neurosci**, **17**: 2645-51, 1997.
- MANCUSO, F; CALIGNANO, A; SORRENTINO, L. Endogenous nitric oxide modulates behavioural effects elicited by substance P in rat. **Eur J Pharmacol**, **271**: 329-33, 1994.
- MARIN, P.; LAFON, M.; BOCKAERT, J. A nitric oxide activity selectively stimulated by NMDA receptors depends on protein kinase C activation in mouse striatal neurons. **Eur J Neurosci**, **4**: 425-32, 1992.
- MATSUMOTO, K; YOBIMOTO, K; HUONG, N.T.; ABDEL-FATTAH, M; VAN HIEN, T; WATANABE, H. Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. **Brain Res**, **839**: 74-84, 1999.
- MELLER, S.T. & GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, **52**: 127-136, 1993.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C; GEBHART, G.F. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-

- aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. **Eur. J. Pharmacol**, **214**: 93-96, 1992.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, **71**: 327-335, 1996.
- MENZAGUI, F.; HEINRICHS, S.C.; PICH, E.M.; WEISS, F.; KOOB, G.F. The role of limbic and hypothalamic corticotropin-releasing factor in behavioral responses to stress. **Ann N Y Acad Sci**, **697**: 142-54, 1993.
- MICHEL, P.P. & AGID, Y. Death of septal cholinergic neurons produced by chronic exposure to glutamate is prevented by the noncompetitive NMDA receptor/channel antagonist, MK-801: role of nerve growth factor and nitric oxide. **J Neurosci Res**, **40**: 764-75, 1995.
- MICHEL, J.B. Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system. **Pathol Biol (Paris)**, **46**: 181-9, 1998.
- MONTAGUE, P.R.; GANCAYCO, C.D.; WINN, M.J.; MARCHASE, R.B.; FRIEDLANDER, M.J. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. **Science**, **263**: 973-7, 1994.
- NELSON, R.J.; KRIEGSFELD, L.J.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. **Front Neuroendocrinology**, **18**: 463-491, 1997.
- PALMER, R.; FERRIDGE, A.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**: 524-6, 1987.

- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun**, **153**: 1251-6, 1988.
- PARK, Y.H.; SHIN, C.Y.; LEE, T.S.; HUH, I.H.; SOHN, U.D. The role of nitric oxide and prostaglandin E2 on the hyperalgesia induced by excitatory amino acids in rats. **J Pharm Pharmacol**, **52**: 431-6, 2000.
- PAUL, V.; JAYAKUMAR, A.R. A role of nitric oxide as an inhibitor of gamma-aminobutyric acid transaminase in rat brain. **Brain Res Bull**, **51**: 1, 43-6, 2000.
- PINEDA, J.; TORRECILLA, M.; MARTIN-RUIZ, R.; UGEDO, L. Attenuation of withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurones by inhibitors of nitric oxide synthase in morphine-dependent rats. **Neuropharmacology**, **37**: 759-67, 1998.
- PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M.; GOZALEZ, D.; AGUILAR, E. The role of nitric oxide in the control of basal and LHRH-stimulated LH secretion. **J Endocrinol Invest**, **22**: 340-8, 1999.
- PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol**, **64**: 51-68, 2001.
- PRICKAERTS, J.; DE VENTE, J.; MARKERINK-VAN ITTERSUM, M.; STEINBUSCH, H.W. Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal N-nitro-L-arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats. **Neuroscience**, **87**: 181-95, 1998.

- PRZEWLOCKI, R.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. **Life Sci**, **53**: PL1-5, 1993.
- RANDALL, M.D.; GRIFFITH, T.M. Differential effects of L-arginine on the inhibition by NG-nitro-L-arginine methyl ester of basal and agonist-stimulated EDRF activity. **Br J Pharmacol**, **104**: 743-9, 1991.
- RANJAN, V.; XIAO, Z.; DIAMOND, S.L. Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. **Am J Physiol**, **269**: 550-5, 1995.
- RIEDEL, W. Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Z Rheumatol**, **59**: 36-42, 2000.
- RIVIER, C. Blockade of nitric oxide formation augments adrenocorticotropin released by blood-borne interleukin-1 β : Role of vasopressin, prostaglandins, and α 1-adrenergic receptors. **Endocrinology**, **136**: 3597-3603, 1995.
- RIVIER, C. & SHEN, G.H. In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 β , vasopressin, and oxytocin. **J Neurosci**, **14**: 1985-1993, 1994.
- RIVIER, C. Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the ACTH response to immune and nonimmune signals. **Neuroimmunomodulation**, **5**: 203-13, 1998.
- SAMAMA, B. & BOEHM, N. Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. **Neurobiol Learn Mem**, **71**: 219-31, 1999.
- SEGIETH, J. et al. Nitric oxide-mediated regulation of dopamine release in the hippocampus in vivo. **Neuropharmacology**, **39**: 4, 571-7, 2000.

- SHIBUKI, K. & OKADA, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. **Nature**, **349**: 326-8, 1991.
- SINNER, C.; KAEHLER, S.T.; PHILIPPU, A.; SINGEWALD, N. Role of nitric oxide in the stress-induced release of serotonin in the locus coeruleus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **364**:105-9, 2001.
- SIPEK, A. Lithium and Ebstein's anomaly. **Cor Vasa**, **31**:149-156, 1989.
- SMITH, S.S. & LI, J. Novel action of nitric oxide as mediator of N-methyl-D-aspartate-induced phosphatidylinositol hydrolysis in neonatal rat cerebellum. **Mol Pharmacol**, **43**: 1-5, 1993.
- SORKIN, L.S. NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. **Neuroreport**, **4**: 479-482, 1993.
- SQUADRITO, F.; CALAPAI, G.; ALATAVILLA, D.; CUCINOTTA, D.; ZINGARELLI, B.; ARCORECI, V.; CAMPO, G.M.; CAPUTI, A.P. Central serotonergic system involved in the anorexia induced by N^G-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol**, **255**: 51-5, 1994.
- STAHL, S.M. Psicofarmacologia. Bases Neurocientíficas e Aplicações Clínicas. 1998.
- STUHER, D.J.; KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; GRIFFITH, O.W.; FELDMAN, P.L.; WISEMAN, J. N-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J biol Chem**, **266**: 6259-63, 1991.
- TEIXEIRA, N.A.; LOPES, R.C.; SECOLI, S.R. Developmental toxicity of lithium treatment at prophylactic levels. **Br J Med Biol Res**, **28**:230-239, 1995.
- TENA-SEMPERE, M.; PINILLA, L.; GOZALEZ, D.; AGUILAR, E. Involvement of endogenous nitric oxide in the control of pituitary responsiveness to different

- elicitors of growth hormone release in prepubertal rats. **Neuroendocrinology**, **64**:146-52, 1996.
- THOMPSON, S.W.; BABBEDGE, R.; LEVERS, T.; DRAY, A.; URBAN, L. No evidence for contribution of nitric oxide to spinal reflex activity in the rat spinal cord in vitro. **Neurosci Lett**, **188**: 121-4, 1995.
- 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**, **12**: 268-72, 1998.
- VAUPEL, D.B.; KIMES, A.S.; LODON, E.D. Nitric oxide synthase inhibitors. Preclinical studies of potential use for treatment of opioid withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, **13**: 315-22, 1995.
- VINCENT, S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. **Prog Neurobiol**, **42**:129, 1995.
- 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**, **6**: 1413-6, 1995.
- VORHEES, C.V.; BRUNNER, R.L.; BUTCHER, R.E. Psychotropic drugs as behavioural teratogens. **Science**, **205**:1220-1225, 1979.
- WELTERS, I.D.; MENZEBACH, A.; GOUMON, Y.; CADET, P.; MENGES, T.; HUGHES, T.K.; HEMPELMANN, G.; STEFANO, G.B. Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism. **Anesthesiology**, **92**: 1677-84, 2000.

- WHITE, L.A. & MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase is a cytochrome P450 type hemoprotein. **Biochemistry**, **31**: 6627-31, 1992.
- WILDER, R.L. Neuroendocrine-Immune System Interactions and Autoimmunity, **Annu Rev Immunol**, **13**:307-38, 1995.
- 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**, **294**: 101-7, 1995.
- WEIDENFELD, J.; FELDMAN, S.; DEKEYSER, F.G.; OVADIA, H. Effect of exogenous nitric oxide and inhibitors of nitric oxide synthase on the hypothalamic pituitary adrenal axis responses to neural stimuli. **Neuroendocrinology**, **70**:153-9, 1999.
- XU, J.Y.; HILL, K.P.; BIDLACK, J.M. The nitric oxide/cyclic GMP system at the supraspinal site is involved in the development of acute morphine antinociceptive tolerance. **J Pharmacol Exp Ther**, **284**:196-201, 1998.
- XU, J.Y. & TSENG, L.F. Increase of nitric oxide by L-arginine potentiates β -endorphin- but not μ , δ -, or κ -opioid agonist-induced antinociception in the mouse. **Eur J Pharmacol**, **236**: 137-142, 1993.
- XU, J.Y. & TSENG, L.F. Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in the spinal cord differentially modulates intracerebroventricularly administered morphine- and β -endorphin-induced antinociception in the mouse. **J Pharmacol Exp Ther**, **274**: 8-16, 1995.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.;
HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory
and in monoamine metabolism in the rat brain. **Br J Pharmacol**, **115**: 852-8, 1995.

ZHANG, J.; Snyder, H. Nitric oxide in the nervous system. **Annu Rev Pharmacol
Toxicol**, **35**: 213, 1995.