

Moacir Serralvo Faria

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO EM UM MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida, pelo(a) candidato(a)
moacir Serralvo
Faria
e aprovada pela Comissão Julgadora.

23/04/98 *[assinatura]*

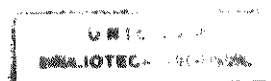
Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade de Campinas -
UNICAMP, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas. Área de
Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas

1998

9822617



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	71011111
	F225p
V.	Ex
TOMBO BC	35687
PROC	395/98
C	D ☒
PREC	R\$ 11,00
DATA	04/11/98
N.º CPO	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-0011B176-7

F225p

Faria, Moacir Serralvo

Papel do óxido nítrico em um modelo animal
de ansiedade / Moacir Serralvo Faria -- Campinas,
SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Gilberto de Nucci.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual
de Campinas, Instituto de Biologia..

1. Óxido nítrico. 2. Ansiedade. 3. Medo. 4. Cérebro.
5. Hipertensão. 6. Rato como animal de laboratório.
I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 23 Abril de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES

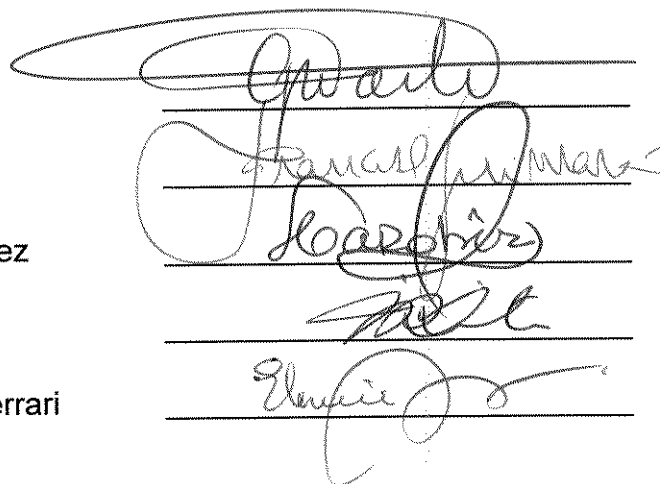
Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Francisco Guimarães

Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Prof. Dr. José Roberto Leite

Prfa. Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari



The block contains five handwritten signatures, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures are: 1. A large, stylized signature that appears to be 'Gilberto'. 2. A signature that appears to be 'Francisco Guimarães'. 3. A signature that appears to be 'Antônio de Pádua Carobrez'. 4. A signature that appears to be 'José Roberto Leite'. 5. A signature that appears to be 'Elenice A. de Moraes Ferrari'.

SUPLENTES:

Profa. Dra. Alba Regina M. Souza Brito

Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero



Two horizontal lines, one for the signature of Profa. Dra. Alba Regina M. Souza Brito and one for the signature of Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero.

Dedico este trabalho:

À minha esposa Magaly, pelo carinho, renúncia, paciência e confiança em mim depositada, sobretudo nos momentos mais difíceis. Um grande beijo e muito obrigado. Amo você.

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci e ao Prof. Dr. Frederico G. Graeff pela orientação e pela participação em minha formação profissional.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica por proporcionar a oportunidade de realização dessa Tese de doutoramento.

Ao Departamento de Farmacologia - FCM/UNICAMP por permitir o uso de suas dependências e equipamentos.

A todos os funcionários, professores e colegas de pós-graduação que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Miguel Borges da Silva pela dedicação e espírito de colaboração no manuseio dos animais no biotério.

Ao Dr. Marcelo Nicolás Muscará, Simone A. Teixeira e Heidi B. Dias pelas dosagens bioquímicas.

Aos meus pais, pelos princípios, caráter e exemplo...

Aos meus irmãos, pelo apoio

Aos amigos Sócrates Calvoso Penna, Luciana Nathan, Elen Teizen e Marcelo Nicolás Muscará... Vocês foram parte integrante nessa etapa de minha vida. Muito obrigado e fiquem com Deus ...

Aos animais, cujos comportamentos me serviram de livro.

" Pouca ciência torna os homens orgulhosos... muita ciência torna os homens humildes. Assim, as espigas vazias elevam a cabeça soberba, enquanto as cheias inclinam-se humildemente para a terra"

Autor desconhecido

SUMÁRIO

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Óxido Nítrico.....	1
1.2. Óxido Nítrico Sintase (NOS).....	4
1.3. Óxido Nítrico e o Sistema Vascular.....	6
1.4. Óxido Nítrico e o Sistema Nervoso Central.....	8
1.5. Medo e Ansiedade.....	11
1.6. Avaliação Experimental da Ansiedade em ratos.....	18
1.7. Óxido Nítrico e Ansiedade.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Animais.....	26
3.2. Drogas.....	26
3.3. Labirinto Cruz.....	27
3.3.1. Tratamento com drogas.....	27
3.3.2. Procedimento.....	28
3.4. Mensuração da pressão arterial.....	29
3.4.1. Tratamento com drogas.....	29
3.4.2. Procedimento.....	29
3.5. Mensuração da atividade da NOS encefálica.....	30

3.5.1. Tratamento com drogas.....	30
3.5.2. Procedimento.....	31
3.6. Dosagem sérica de nitratos e nitritos.....	32
3.6.1. Tratamento com drogas.....	32
3.6.2. Procedimento.....	33
3.7. Hipertensão “de dois rins” de Goldblatt (2K1C).....	34
3.8. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Pressão arterial de ratos submetidos a tratamento agudo e crônico com L-NAME.	35
4.2. Atividade da NOS em ratos submetidos a tratamento agudo e crônico com L-NAME.	35
4.3. Níveis séricos de nitratos e nitritos em ratos submetidos a tratamento crônico com L-NAME.	36
4.4. Efeito dos tratamentos agudos e crônicos com L-NAME sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz.	36
4.5. Efeito da hipertensão “de dois rins” de Goldblatt (2K1C) sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz.	38
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8. SUMMARY	78

RESUMO

Este estudo investigou a participação do óxido nítrico (NO) na modulação da ansiedade em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. A administração aguda e sistêmica de N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10 e 60 mg.kg⁻¹), um inibidor da NO sintase, induziu um efeito ansiolítico, caracterizado pela elevação do tempo de permanência dos animais nos braços abertos. Essa variável não foi alterada após o tratamento crônico com a mesma droga. Ambos os tratamentos, agudo e crônico, com L-NAME promoveram inibição da NO-sintase no endotélio e no sistema nervoso central, visto que os animais manifestaram elevada pressão arterial e diminuída atividade da NO sintase em tecido encefálico. O tratamento crônico com L-NAME também reduziu os níveis séricos de nitratos. É improvável que o efeito ansiolítico induzido pelo tratamento agudo com L-NAME seja decorrente da hipertensão induzida pela droga, visto que outro estado hipertensivo não relacionado com inibição da síntese de NO (hipertensão “de dois rins” de Goldblatt ou 2K1C) não alterou o comportamento exploratório dos animais no labirinto em cruz elevado. Esses resultados indicam que a inibição aguda da síntese de NO diminui o nível de ansiedade em ratos e reforçam o papel do NO como um novo neurotransmissor/neuromodulador no sistema nervoso central.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido Nítrico

Óxido nítrico (NO) é um radical livre sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, através de uma via biosintética denominada via L-arginina/óxido nítrico. Essa via metabólica é catalisada por um grupo de enzimas, conhecidas coletivamente por óxido nítrico sintase (NOS). NOS catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina, produzindo NO como co-produto (Garthwaite, 1991; Bush et al, 1992).

O desenvolvimento de evidências caracterizando o NO como um mensageiro biológico surgiu em meados da década de 1980, com Furchgott e Zawadzki (1980). Tais autores demonstraram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina era dependente da integridade do endotélio vascular. Além disso, o relaxamento vascular era cálcio-dependente (Griffith et al, 1986) e mediado por um aumento nos níveis de GMPc no músculo liso vascular (Rapoport et al, 1983). Estudos adicionais demonstraram que o endotélio poderia induzir relaxamento vascular através da produção de um fator lábil, capaz de se difundir para o músculo liso vascular e levar ao relaxamento. Esse fator foi então denominado *fator de relaxamento derivado do endotélio* (EDRF; Endothelium-derived relaxing factor; Furchgott e Zawadzki, 1980).

Por outro lado, o relaxamento vascular induzido por agentes nitrovasodilatadores tais como nitratos orgânicos e nitroprussiato de sódio (substâncias doadoras de óxido nítrico; NO), não requeriam a presença do endotélio para eliciar o relaxamento vascular (Ignarro et al, 1981).

Foi então proposto que EDRF e NO seriam, na realidade, a mesma substância visto que ambos apresentavam inúmeras similaridades. Tanto NO, quanto EDRF, são substâncias lábeis, com tempo de meia-vida variando entre 4 e 6 segundos. Além disso, o relaxamento vascular produzido por ambas as substâncias pode ser bloqueado por hemoglobina (uma proteína capaz de se ligar ao NO) ou por geradores de ânions superóxido (O_2^-). Por fim, ambos os efeitos de NO e EDRF são aumentados por superóxido dismutase, uma enzima capaz de eliminar O_2^- (conforme Schuman & Madison, 1994). Quase 10 anos após a descoberta do EDRF, dois grupos de pesquisadores demonstraram que o endotélio vascular é capaz de liberar NO em quantidade suficiente para contribuir com a atividade biológica do EDRF (Ignarro et al, 1987; Palmer et al, 1987).

A via L-arginina/óxido nítrico tem sido objeto de intensa manipulação farmacológica (Fukuto & Chaudhuri, 1995). Análogos da arginina, tais como N^ω-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), N^ω-nitro-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^ω- nitro L-arginina (L-NOARG) e 7-nitroindazol (7-NI), são capazes de inibir a enzima NOS através de

interação com o sítio de ligação da arginina (Moore & Handy, 1997). A inibição é estereo-específica visto que D-isômeros são ineficazes em promover inibição enzimática (Schulz et al, 1990).

No sistema nervoso central, NO tem sido considerado um novo neurotransmissor (Snyder & Bredt, 1991). Contrastando com neurotransmissores tradicionais que atuam através de receptores de membrana, NO atua diretamente sobre uma enzima intracelular, identificada em muitos tecidos e denominada guanilato ciclase solúvel (GC; Arnold et al, 1977). A enzima GC solúvel contém um grupo heme, que representa o sítio de ligação para o NO e é responsável pela ativação da enzima. Quando NO se liga ao grupo heme, a enzima sofre alteração conformacional, levando assim à sua ativação e conseqüente produção de guanosina 3':5'- monofosfato cíclico (GMPc; Wolin et al, 1982).

No cérebro, a enzima GC solúvel é encontrada primariamente em neurônios (Goridis & Morgan, 1973) mas astrócitos em cultura, quando expostos a NO, respondem com elevados níveis de GMPc (Ishizaki et al, 1991). GC solúvel também tem sido encontrada no corpo estriado, núcleo acumbens, substância *nigra* e cerebelo (Hofmann et al, 1977).

No músculo liso, elevado nível de GMPc induzido por NO é capaz de estimular quinases GMPc-dependentes, as quais são responsáveis pelo relaxamento muscular (Rapoport et al, 1983), ainda que uma diminuição no nível de cálcio intracelular, induzido por GMPc, possa

também contribuir para tal relaxamento (Rashatwar et al, 1987).

Alguns grupos de pesquisa têm focado um papel citotóxico do NO (Murphy et al, 1993). Essa citotoxicidade é fruto de uma reação do NO com O_2^- dando origem a peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual se decompõe para formar radicais livres tóxicos, tais como os radicais hidroxil ($HO^\cdot$) e $NO_2^\cdot$. Esses radicais são altamente reativos, podendo provocar lesões em ácidos nucleicos, proteínas e principalmente gordura poli-insaturada, representadas por fosfolípidos de membrana (Reiter, 1995). Esses mesmos radicais são considerados os efetores bactericida e tumoricida de macrófagos ativados e neutrófilos (Marletta et al, 1988; Beckman et al, 1990).

O mecanismo responsável pelo término da ação do NO envolve uma rápida reação com oxigênio em solução aquosa, produzindo ânions inativos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^- ; Vincent, 1994). A concentração sérica de nitratos pode ser mensurada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e utilizada como ferramenta para avaliação geral do nível de atividade da NOS (Muscará & De Nucci, 1996).

1.2. Óxido Nítrico Sintase (NOS)

A enzima NOS apresenta homologia com citocromo P-450, possuindo sítios de ligação para flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato, na sua forma reduzida (NADPH). NOS também apresenta sítio de ligação para calmodulina, o que permite que sua atividade enzimática seja, a princípio, regulada por íons cálcio. De fato, a atividade da NOS neuronal é dependente da concentração de cálcio intracelular (Bredt & Snyder, 1990).

O mecanismo de ação da enzima NOS envolve a transferência de elétrons de NADPH para FAD e FMN e então para o grupo heme, que ativa o oxigênio molecular. A molécula de L-arginina é então N^{ω} - hidroxilada, formando um intermediário reativo denominado N^{ω} - hidroxil-arginina. Essa reação de hidroxilação é dependente de outro cofator, denominado tetrahydrobiopterina. A etapa final da síntese de NO envolve a reação do intermediário N^{ω} -hidroxilado da arginina com oxigênio ativado, para gerar NO e L-citrulina (Mayer et al, 1991).

Isoformas de NOS já foram clonadas em tecido cerebral (Bredt et al, 1991) e endotélio vascular (Lammas et al, 1992). Além disso, macrófagos (Lowenstein et al, 1992), hepatócitos (Geller et al, 1993), e uma ampla variedade de tecidos tais como coração, pulmões e baço também exibem atividade NOS, demonstrando assim, a grande importância fisiológica dessa via metabólica.

De um modo geral, o grupo de enzimas NOS pode ser subdividido em duas famílias. Uma é dita constitutiva (cNOS) porque sua ativação não requer nova síntese da enzima. A segunda família é denominada induzível (iNOS) porque em resposta a certos estímulos, tais como

citocinas e lipopolissacárides (LPS) bacteriano, expressa sua atividade enzimática mediante síntese *de novo* de NOS.

Dentro de cada família, as enzimas podem ainda ser divididas em subfamílias (Moore & Handy, 1997). Assim, cNOS tem sido originada e caracterizada a partir de tecido neuronal e de células endoteliais, sendo assim denominadas de nNOS (Tipo I) e eNOS (Tipo III) respectivamente. iNOS (Tipo II) tem sido encontrada em macrófagos (macNOS), hepatócitos (hepNOS), microglia e neutrófilos.

A atividade da cNOS é cálcio- e NADPH-dependente, permanecendo ativa por tempo relativamente curto e produzindo NO na faixa de pMoles. Ao contrário, o nível de cálcio não tem nenhuma influência sobre a atividade enzimática de iNOS. A enzima é cálcio-independente e pode permanecer ativa por várias horas, produzindo grandes quantidades (nMolar) de NO (Schuman & Madison, 1994).

1.3. Óxido Nítrico e o Sistema Vascular

Duas vias de liberação de NO têm sido identificadas nas células endoteliais de vasos sangüíneos sadios: uma liberação basal e uma estimulada (Schini-Kerth & Vanhoute, 1995). Em condições de repouso, as células endoteliais da aorta de ratos liberam continuamente NO; essa liberação pode ser aumentada pela ativação do endotélio por agonistas fisiológicos ou farmacológicos e também por forças físicas (*shear stress*)

mas pode também ser inibida por análogos da arginina (Schini & Vanhoute, 1992)

A liberação basal de NO é importante no controle do tônus vascular e pressão sanguínea. Sob a ação de mediadores endógenos tais como acetilcolina, histamina, ácido araquidônico e serotonina, as células endoteliais sintetizam NO (para revisão ver Vanhoute, 1989) que, uma vez liberado, produz um tônus vasodilatador capaz de induzir quadros hipotensivos. Por outro lado, a inibição crônica da síntese de NO nas células endoteliais induz elevação da pressão arterial, sendo assim considerada um modelo animal de hipertensão (Ribeiro et al, 1992).

Em virtude de sua capacidade de causar vasodilatação, NO tem sido implicado como um novo mediador da reação inflamatória aguda. De fato, um dos primeiros eventos do processo inflamatório agudo é caracterizado por vasodilatação de arteríolas pré-capilares resultando assim, em um maior aporte sanguíneo para o leito capilar e consequentemente, aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial (Moilanen & Vapaatalo, 1995).

Ainda que a fonte predominante de NO em vasos sanguíneos saudáveis resida na atividade NOS expressada constitutivamente, anéis vasculares destituídos de endotélio, quando incubados *in vitro* com LPS (Rees et al, 1990) ou obtidos de ratos tratados com LPS (Knowles et al, 1990) também sintetizam NO. Essa indução da síntese de NO na

camada de músculo liso vascular é passível de ser inibida por supressores de síntese protéica (cicloheximida), indicando que NO pode ser produzido no músculo liso vascular, através da síntese *de novo* de iNOS (Rees et al, 1990).

Em determinadas situações, a síntese de NO através de iNOS pode apresentar implicações fisiopatológicas. A exposição por algumas horas de vasos sanguíneos isolados à mediadores pró-inflamatórios tais como Fator de Necrose Tumoral (TNF) e LPS, determina perda da contractilidade vascular, podendo levar a quadros hipotensivos (Beasley, 1990).

A literatura tem demonstrado que L-NMMA é capaz de reverter quadros de hipotensão induzidos por TNF em cães (Kilbourn et al, 1990), bem como inibir hipotensão induzida por LPS em ratos (Thiemermann & Vane, 1990). Similarmente, inibidores da GC também são capazes de prevenir o relaxamento vascular induzido por NO, o que demonstra que a formação de NO, no músculo vascular, diminui o tônus da musculatura através da ativação de GC (Joly et al, 1992).

1.4. Óxido Nítrico e o Sistema Nervoso Central

A importância fisiológica do NO em tecido neural derivou da constatação de que células cerebrais em cultura, quando estimuladas por aminoácidos excitatórios, liberavam uma substância com

propriedades semelhantes ao NO (Garthwaite et al, 1988; Garthwaite, 1991). Posteriormente, o papel do NO no sistema nervoso central foi reforçado pela constatação que inibidores da NOS, tais como nitroarginina e metilarginina, bloqueavam a produção de GMPc induzida por glutamato no cerebelo (Bredt & Snyder, 1992).

No sistema nervoso central, as ações do glutamato (principal neurotransmissor excitatório) através dos receptores do tipo NMDA envolvem a síntese de NO como sistema de amplificação de sinal (Zhang & Snyder, 1995). Os receptores NMDA estão acoplados a canais iônicos e propiciam fluxos de cálcio quando ativados por glutamato (MacDermott et al, 1986). O influxo de cálcio, induzido pela ativação de tais receptores, resulta em aumento da concentração de cálcio citosólico no neurônio pós-sináptico, com formação do complexo Cálcio/Calmodulina e ativação da enzima cNOS. Desse modo, NO é sintetizado no cérebro numa forma cálcio-dependente, participando dos eventos celulares desencadeados por aminoácidos excitatórios (Zhang & Snyder, 1995) tais como transmissão sináptica anterógrada ou retrógrada (Garthwaite, 1991), além de processos de plasticidade neural tais como memória e aprendizagem (Hölscher, 1997; Medina & Izquierdo, 1995; Mccall & Vallance, 1992).

Por outro lado, excessiva síntese de NO induzida por aumento pronunciado na liberação de aminoácidos excitatórios pode levar a epilepsia e neurotoxicidade (Becker et al, 1995; Dawson et al, 1991;

Nowicki et al, 1991). Excessiva síntese de NO através de iNOS poderia igualmente contribuir em processos degenerativos do sistema nervoso central, tais como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (Moncada & Higgs, 1993).

A literatura tem relatado que NO pode também modular a liberação de neurotransmissores em determinadas regiões cerebrais. Na área pré-óptica medial de ratos, a administração de L-arginina promove aumento da liberação de dopamina e serotonina, efeito esse inibido pela co-administração de L-NMMA (Lorrain & Hull, 1993). Similarmente, doadores de NO tais como hidroxilamina e nitroprussiato de sódio estimulam de maneira dose-dependente a liberação *in vitro* de noradrenalina e acetilcolina no hipocampo (Lonart et al, 1992). Por outro lado, estudos de microdiálise *in vivo* demonstram que a perfusão de L-NMMA no estriado de ratos aumenta a concentração de GABA, indicando que NO pode inibir a liberação de GABA nessa região atuando diretamente sobre terminais GABAérgicos (Semba et al, 1995).

NO pode ser igualmente importante na expressão de comportamentos inatos em roedores. Ingestão de alimentos em camundongos (Morley & Flood, 1991) e comportamento sexual em ratos (Benelli et al, 1995) são afetados pela administração parenteral de L-arginina ou inibidores da NOS (L-NOARG e L-NAME respectivamente). Além disso, camundongos com deficiência na síntese de NO no sistema nervoso central, manifestam elevada agressividade quando avaliada

pelo número de ataques durante interação agonística intra-específica (Nelson et al, 1995).

1.5. Medo e Ansiedade

Ansiedade e medo representam o primeiro sistema de defesa corporal contra um estímulo ameaçador ou perigo iminente (Gray, 1982). Alguns autores têm considerado ambas as definições como estados de humor indistinguíveis (Julou, et al, 1985) enquanto outros, consideram medo e ansiedade como fenômenos distintos (Applebaum, 1992).

Ansiedade representaria uma resposta do organismo a um estímulo ameaçador desconhecido ou conflito interno, enquanto medo envolveria uma resposta a um estímulo ameaçador reconhecido, não podendo portanto ser antecipado. Ansiedade pode ser duradoura, pois não existe um estímulo óbvio para ser evitado ou para se fugir. Medo é limitado ao término do estímulo, representando assim uma resposta finita (Craig et al, 1995).

A ansiedade tem sido caracterizada por apreensão, nervosismo, inquietação, tensão, agitação e, via de regra, é acompanhada por sinais de hiperatividade simpática, tais como tremores, sudorese, elevada pressão arterial e taquicardia (Van Riezen & Segal, 1988).

Charles Darwin, em seu livro "*A expressão de emoções no homem e animais*" já postulava uma relação entre comportamento defensivo em humanos e medo, pânico e raiva. Do ponto de vista filogenético, à medida que mamíferos foram submetidos a constantes desafios de sobrevivência, seu sistema nervoso central, mais especificamente o cérebro, passou a apresentar inúmeras circuitarias neuronais responsáveis pelo controle de estratégias de adaptação às constantes alterações em seu habitat (Graeff, 1990).

A atividade desses circuitos neuronais foram percebidas, de forma introspectiva, como emoções básicas tais como medo, raiva e pânico (Panksepp, 1982). Ao longo da evolução, esses mesmos circuitos neuronais passaram a ser ativados por estímulos ou situações ambientais neutras, desde que tivessem sido previamente associadas à apresentação de um estímulo punitivo ou ainda à ausência de um estímulo reforçador (Gray, 1982).

Desse modo, estímulos ambientais (inatos ou aprendidos) sinalizando perigo ativariam circuitos neuronais cerebrais responsáveis pela elaboração de estados motivacionais de medo (Fanselow, 1991), além da coordenação padrões de comportamentos defensivos tais como inibição comportamental (Gray, 1982), congelamento (*freezing*; Fanselow, 1980), fuga (Panksepp et al, 1970) e defesa afetiva, representada por posturas ameaçadoras, vocalizações e eventualmente ataques, quando a fuga do perigo não fosse possível.

Imobilidade tônica (simulação de morte) e posturas submissivas, muitas vezes exibida em confrontos intra-específicos, também seriam reações de defesa adicionais que poderiam reduzir a probabilidade de ocorrência de um ataque iminente de predadores ou indivíduos dominantes, respectivamente. O comportamento defensivo pode também ser acompanhado de intensas alterações neurovegetativas e endócrinas, o que demonstra que medo e ansiedade são estados psicobiológicos, expressados simultaneamente a nível psicológico, comportamental e fisiológico (Graeff et al, 1993).

O padrão de comportamento defensivo exibido por um animal pode variar, em função de algumas características do estímulo ameaçador. Baseados em estudos do comportamento defensivo induzido por predadores em ratos silvestres ou ainda em ratos de laboratório, Blanchard e Blanchard (1988) introduziram o conceito de níveis de defesa ou seja, um repertório comportamental característico, que pode ser eliciado de acordo com as características do estímulo ameaçador (distal ou proximal em relação ao animal ameaçado) ou ainda do contexto ambiental (previamente associado à uma punição). Dependendo do nível de ameaça ao qual o animal é exposto, três estratégias de defesa, denominadas "avaliação de risco", "congelamento" e "luta/fuga", podem ser eliciadas (para revisão ver Graeff, 1994). De forma similar, diferentes estratégias de defesa têm sido observadas em filhotes de macacos *rhesus*, expostos a diferentes níveis de ameaças

(para revisão ver Kalin, 1993)

No caso de ratos, durante a exploração de um ambiente novo, ou seja, uma situação onde o animal nunca esteve previamente, observa-se a ocorrência do comportamento de "avaliação de risco". Esse comportamento representa o primeiro nível de defesa e é caracterizado por locomoção cautelosa, com o corpo abaixado e estirado, e persistente exploração olfativa do ambiente. Eventualmente, o animal pode retrain subitamente a cabeça, em resposta a mínima alteração no ambiente.

O comportamento de "Avaliação de risco" sugere que o animal está "checando" se existe perigo naquele ambiente e pode ser evocado quando o perigo é incerto, quando a situação é nova ou ainda porque uma fonte de perigo tenha estado ali no passado (Blanchard e Blanchard, 1988).

Quando um estímulo ameaçador é identificado, mas encontra-se além de uma distância crítica em relação ao animal, seu padrão comportamental é alterado para fuga (quando esta é passível de ocorrer) ou congelamento (*freezing*), este último caracterizado por intensa imobilidade, com respiração irregular e eventualmente movimentação de vibrissae. Nesse estado, é comum o animal manifestar alterações autonômicas tais como piloereção, defecação e micção.

Por outro lado, quando o estímulo ameaçador se aproxima muito do animal ou entra em contato com o mesmo, nova alteração do padrão comportamental é observada, com o animal manifestando uma reação

vigorosa do tipo luta/fuga (fight/flight) caracterizada por vocalizações, saltos (numa tentativa frenética de fuga) ou ainda luta (Blanchard & Blanchard, 1988).

De acordo com Gray (1982), ansiedade pode ser equiparada à ativação de estruturas cerebrais denominadas coletivamente de "sistema de inibição comportamental". O principal substrato neural desse sistema seria representado pelo septo e pelo hipocampo (sistema septo-hipocampal). Entretanto, outras estruturas límbicas tais como o córtex pré-frontal, tálamo e corpos mamilares, poderiam também atuar em conjunto com esse sistema.

O sistema de inibição comportamental compara a informação sensorial recebida do ambiente externo com as predições geradas no circuito de Papez. Essas predições levam em consideração a memória de experiências passadas e o planejamento motor elaborado pelo córtex pré-frontal. O resultado dessa comparação poderia induzir o sistema septo-hipocampal a atuar através de dois modos distintos ou seja, o modo "*checking*" e o modo "*control*" (Gray, 1982).

Quando o animal é submetido a uma situação nova, o sistema poderia operar através do modo "*checking*" ou seja, comparando os estímulos sensoriais recebidos do ambiente com a predição obtida, de modo que a locomoção se tornaria cautelosa, com persistente exploração olfativa do ambiente e atenção dirigida preferencialmente ao estímulo potencialmente ameaçador ou novo, sugerindo assim que o

animal estaria "checando" se existe algum perigo ambiente.

Operando através do modo "*checking*", o sistema de inibição comportamental poderia ser importante no controle do primeiro nível de defesa, ou seja, o comportamento de "avaliação de risco" (Graeff, 1994). Entretanto, quando um estímulo indutor de medo inato ou condicionado é detectado, o sistema de inibição comportamental passaria a atuar através do modo "*control*", caracterizado por supressão do comportamento corrente do animal. Atuando através do modo "control" o sistema de inibição comportamental poderia controlar o comportamento de "congelamento" (Graeff, 1994). Desse modo, a ativação do sistema de inibição comportamental promoveria não só aumento da vigília e análise sensorial do ambiente mas também inibição do comportamento corrente.

Apesar da participação da formação septo-hipocampal e estruturas relacionadas no repertório comportamental defensivo, outras estruturas cerebrais, hierarquicamente organizadas e interconectadas, também são igualmente importantes na regulação do medo e ansiedade. Essas estruturas, representadas pela matéria cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo e amígdala, são genericamente denominadas de "Sistema Aversivo Cerebral", e comandam não só o comportamento defensivo mas também evocam estados emocionais aversivos (Graeff, 1990). Estimulação elétrica ou química dessas estruturas evoca padrões comportamentais espécie-específicos bem como comportamentos sugestivos de experiência aversiva (Olds & Olds, 1962).

A amígdala representa a porção rostral desse sistema e recebe informação aferente não só do bulbo olfatório mas também de áreas associativas do neocórtex, as quais integram as informações provenientes dos órgãos sensoriais. Além disso, a amígdala recebe informação sensorial exteroceptiva diretamente do tálamo, bem como informação interoceptiva através de vias aferentes viscerais (Le Doux, 1986). Desse modo, é possível que a amígdala dê um significado afetivo ao estímulo, através da recepção e integração do código neural de informações oriundas do ambiente, seja ele externo ou interno (Aggleton & Mishkin, 1985). Essa conotação afetiva dos estímulos sensoriais oriundos do ambiente seria então sinalizada à PAG, indicando o grau de ameaça ou perigo ao qual o animal está submetido. Estimulação química da amígdala, através da microinjeção de serotonina ou de agonistas 5-HT_{1A}, promove elevada supressão comportamental induzida por choque nas patas (Hodges et al, 1987).

A PAG representa a porção mais caudal do sistema aversivo cerebral. Estimulação elétrica da PAG em ratos elicia o comportamento de "congelamento", (Schenberg et al, 1990). Congelamento, alternado com corridas aleatórias e saltos, também foi induzido pela microinjeção de drogas anti-GABAérgicas na PAG de ratos (Schmitt et al, 1986; Brandão et al, 1982).

Foi sugerido que a PAG seria responsável pela seleção, organização e elaboração de reações comportamentais defensivas adequadas ao estímulo (Fanselow, 1991). Recebe informação da amígdala e sistema septo-hipocampal, além de informação visual e auditiva, através do colículo superior e inferior, respectivamente (ver Graeff et al, 1993). Desse modo, tanto estímulos visuais quanto auditivos poderiam eliciar comportamento defensivo através da PAG (Dean et al, 1989; Brandão et al, 1988). Além disso, a PAG recebe informação da via paleoespinotalâmica (uma via nociceptiva primitiva) o que permite que estímulos nociceptivos possam igualmente evocar reações de defesa através da PAG (Graeff, 1993).

1.6. Avaliação Experimental da Ansiedade em animais:

Apesar de ansiedade e medo serem basicamente emoções, e portanto dotadas de características subjetivas, a literatura dispõe de metodologias capazes de identificar e mensurar alguns comportamentos que se relacionam diretamente com nível de medo/ansiedade em animais.

Ansiedade tem sido grandemente estudada em animais de laboratório através do teste de conflito. Nesse teste, uma resposta instrumental do animal é pareada à apresentação imediata de um reforço

(água ou alimento) de maneira que, cada resposta instrumental do animal (pressionar uma alavanca, no caso de ratos, ou bicar um disco, no caso de pombos) é reforçada pela apresentação de uma recompensa, o que garante a manutenção da resposta. Por outro lado, se a mesma resposta instrumental for punida através de um estímulo nocivo (por exemplo um choque elétrico), observa-se a extinção da resposta instrumental. Entretanto, quando o comportamento animal é pareado à apresentação simultânea de um reforço e uma punição, estabelecer-se-á uma situação de conflito no animal, caracterizada pela expectativa entre recompensa ou punição (Stein, 1968).

O teste de punição tem sido considerado um modelo experimental de ansiedade visto que drogas clinicamente úteis no tratamento da ansiedade são eficazes em facilitar a ocorrência de comportamentos suprimidos por punição. Além disso, existe uma correlação positiva entre a dose mínima eficaz no teste de punição, e a dose média diária utilizada no tratamento de quadros de ansiedade (Sepinwall & Cook, 1978).

Ultimamente, o comportamento exploratório de roedores tornou-se outra ferramenta útil no estudo da ansiedade. Esse comportamento é importante do ponto de vista homeostático, pois possibilita o encontro de alimento e parceiros, além de fornecer informações relevantes sobre eventuais ameaças, tais como predadores (Barnett, 1975).

Essa metodologia foi proposta na década de 50 por Montgomery, estudando o comportamento exploratório de ratos em labirintos em "Y". Tais labirintos possuíam diferentes tipos de braços, sendo alguns totalmente abertos, enquanto outros eram circundados por paredes (braços fechados). Através dessa metodologia, Montgomery verificou que durante a exploração do labirinto, os animais exibiam preferência pelos braços fechados em relação aos abertos. Montgomery atribuiu a menor exploração dos braços abertos à uma maior habilidade dos mesmos em eliciar uma pulsão de medo. Desse modo, quando o animal era colocado no labirinto (ambiente não familiar), instalava-se uma situação de conflito interno, caracterizada por uma pulsão exploratória, motivada talvez por curiosidade, associada à uma pulsão de esquia ou evitação da exploração, motivada por medo (Montgomery, 1955).

Esse conflito interno tem sido considerado análogo à ansiedade, sendo o estímulo de novidade, a principal fonte de motivação aversiva (Gray, 1982). De acordo com Gray, novidade corresponde a um estímulo incondicionado de medo ou seja, um estímulo no qual uma espécie em particular é geneticamente preparada para interpretar como um sinal potencial de perigo

Já na década de 80, Handley e Mithani (1984) acrescentaram um quarto braço ao labirinto, tornando-o simétrico, em forma de cruz, com dimensões equivalentes e tendo dois braços abertos e dois fechados (para maiores detalhes ver item *Materiais e Métodos*), de forma que a

preferência pelos braços abertos poderia ser expressada na forma de razão entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas, incluindo ambos os tipos de braços (Open/Total ratio; OTR); essa medida também tem sido representada na forma de porcentagem ($\text{Open/Total} \times 100$). Posteriormente, Pellow e colaboradores (1985) acrescentaram uma nova medida, relativa ao tempo gasto pelos animais nos braços abertos.

Os braços abertos possuem características suficientes para permitir uma predição de suas propriedades aversivas. A exposição forçada de ratos aos braços abertos ou fechados promove elevação no nível sérico de corticosterona; entretanto, o aumento no nível sérico de corticosterona foi maior quando os animais foram confinados aos braços abertos, demonstrando que tais braços são mais estressantes para o animal, em relação aos braços fechados (Pellow et al, 1985). Além disso, a exposição forçada de ratos aos braços abertos também evoca maior ocorrência de comportamentos relacionados com medo/ansiedade tais como "congelamento" e defecação. Os animais também gastam menos tempo e entram menos freqüentemente nos braços abertos em relação aos fechados (Pellow et al, 1985).

Análise fatorial do comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz revela que a porcentagem de entradas e o tempo gasto pelos animais nos braços abertos se correlacionam inversamente com o nível de ansiedade dos mesmos. Por outro lado, o número de entradas nos braços

fechados e o número total de entradas se correlacionam positivamente à atividade motora e exploração respectivamente (File, 1992). Assim, drogas com reconhecida atividade ansiolítica como os benzodiazepínicos, aumentam a porcentagem de entradas e o tempo gasto pelos animais nos braços abertos enquanto drogas com atividade ansiogênica (pentilenotetrazol, cafeína e anfetaminas) reduzem ambas as variáveis (Pellow et al, 1985).

O teste do labirinto em cruz elevado representa portanto, uma derivação da metodologia de Montgomery e tem sido validado em termos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos para o estudo de ansiedade em roedores (Pellow et al, 1985). Esse modelo também tem sido freqüentemente revisado com respeito à sua validade para o estudo de drogas potencialmente ansiolíticas (Hogg, 1996; Dawson & Tricklebank, 1995; Handley & McBlane, 1993).

1.7. Óxido Nítrico e Ansiedade

Estudos imunohistoquímicos, têm revelado a presença da enzima NOS em neurônios da formação septo-hipocampal de ratos (Kinjo et al, 1989) e gatos (Mizukawa et al, 1989). NOS também tem sido encontrada na amígdala e PAG de ratos (Vincent & Kimura, 1992), gatos (Mizukawa et al, 1989) e primatas (Brady et al, 1992). Como visto anteriormente, essas estruturas são responsáveis pelo controle do repertório comportamental

defensivo. Desse modo, é possível que NO tenha participação nas alterações comportamentais induzidas pelo medo ou ansiedade.

A literatura tem demonstrado resultados conflitantes em relação à participação do NO em modelos animais de ansiedade. Quock e Nguyen (1992) demonstraram que o pré-tratamento sistêmico com L-NOARG (um inibidor da NOS) é capaz de bloquear o efeito ansiolítico do clordiazepóxido em camundongos submetidos ao labirinto em cruz. Esse bloqueio da exploração dos braços abertos induzido pelo clordiazepóxido, foi revertido pela administração intracerebroventricular de L-arginina, indicando que NO pode exercer um efeito ansiolítico em camundongos (Quock e Nguyen, 1992). Entretanto, outros inibidores da NOS, tais como L-NAME (Wiley et al, 1995) e 7-NI (Volke et al, 1997) aumentam a exploração dos braços abertos em camundongos, sugerindo assim um efeito ansiogênico para o NO (Wiley et al, 1995).

Resultados contraditórios também têm sido obtidos em ratos. A literatura tem reportado que a administração sistêmica de 7-NI (Volke et al, 1997) e L-NAME (Volke et al, 1995; Willey et al, 1995) promove efeito ansiolítico em ratos quando submetidos ao labirinto em cruz.

Esse possível papel ansiogênico do NO em ratos é corroborado por estudos demonstrando que a microinjeção de L-NAME na PAG dorsal de ratos, induz significante elevação na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos (Guimarães et al, 1994). Entretanto, a administração sistêmica aguda de L-NOARG reduziu a exploração dos

21

braços abertos, sugerindo assim um efeito ansiolítico para NO em ratos submetidos ao labirinto em cruz.

Esses resultados contraditórios demonstram que o papel do NO na modulação da ansiedade em roedores merece maior investigação. Por outro lado, a atividade da NOS no sistema nervoso central não foi avaliada nos estudos acima citados, o que impossibilita inferir sobre a eficácia do tratamento em promover inibição da enzima. Além disso, a inibição da síntese de NO nas células endoteliais determina hipertensão (Zatz & de Nucci, 1991; Ribeiro e col., 1992). Visto que nos estudos acima mencionados, nenhum controle relativo ao sistema cardiovascular foi realizado, é possível que as alterações comportamentais reportadas, possam ser decorrentes da instalação de um quadro hipertensivo.

O presente estudo teve como objetivo proporcionar maiores subsídios experimentais sobre a participação da via L-arginina/óxido nítrico no nível de ansiedade de ratos.

2. OBJETIVOS

- Investigar o efeito do pré-tratamento agudo e crônico com L-NAME ou D-NAME (seu isômero inativo) sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz.
- Investigar algum efeito comportamental do L-NAME, não relacionado à inibição da síntese de NO (por exemplo através dos receptores de arginina).
- Avaliar a pressão arterial dos animais submetidos a tratamento agudo ou crônico com drogas.
- Avaliar a atividade da enzima NOS em amostras encefálicas de ratos tratados agudamente ou cronicamente com L-NAME.
- Avaliar o quadro geral de inibição da NOS, através da mensuração dos níveis séricos de ânions nitrato e nitrito em ratos tratados cronicamente com L-NAME.
- Avaliar se outro estado hipertensivo, não relacionado com a inibição da síntese de NO, poderia alterar o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar pesando entre 200 e 250g foram utilizados como sujeitos experimentais. De acordo com o tipo de tratamento (agudo ou crônico), diferentes condições de estocagem foram estipuladas. Para os tratamentos crônicos, os animais foram mantidos em caixas individuais, enquanto que para os tratamentos agudos, os mesmos foram divididos em grupos de 6 animais por caixa. Previamente ao início dos experimentos, os animais foram submetidos a 3 dias de adaptação ao biotério, com livre acesso a água e ração padrão (ciclo claro/escuro de 12 horas, com as luzes acendendo às 06:00hs). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas, pesagem e administração de drogas.

3.2. Drogas

N^o-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), N^o-nitro-D-arginina-metil éster (D-NAME; controle negativo), L-arginina (L-Arg) e D-arginina (D-Arg) foram obtidas da Sigma (USA). Diazepam (DZP) foi obtido da Sanofi-Winthrop (Brasil). Nos tratamentos agudos, as drogas foram dissolvidas em salina (0.9%), enquanto que nos tratamentos crônicos, as mesmas drogas foram dissolvidas em água de torneira. DZP que foi dissolvido em salina contendo 1% de Triton-X-100.

3.3. Labirinto em cruz

3.3.1. Tratamento com drogas

Previamente ao teste do labirinto em cruz, os animais foram submetidos a tratamento agudo e crônico com L-Arg, D-Arg, L-NAME, D-NAME e DZP. No tratamento agudo, as drogas foram administradas por via i.p. nas doses de 10 ou 60 mg.kg⁻¹, exceto DZP, que foi administrado na dose de 1mg/kg⁻¹ e empregado como controle positivo. O grupo controle recebeu volume equivalente de salina (0.9%) contendo 1% de Triton-X-100. Após a administração aguda de drogas, os animais foram devolvidos ao biotério.

No tratamento crônico os animais receberam *ad libitum*, pela água de bebida, as mesmas drogas do tratamento agudo (100 ou 400µg.ml⁻¹) durante sete dias consecutivos, exceto DZP (1mg/kg⁻¹) que foi dado diariamente pelo mesmo período por via i.p.. Baseado na média da ingestão diária de líquidos, essas concentrações resultaram numa dose média de aproximadamente 15 e 60 mg.kg⁻¹, respectivamente (Ribeiro et al, 1992). O grupo controle recebeu água de torneira *ad libitum*. Trinta minutos após a administração aguda e no final do tratamento crônico com drogas, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz conforme Pellow (1985).

3.3.2. Procedimento

O labirinto era constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando assim uma cruz, com 4 braços de igual tamanho (50cm de comprimento por 10cm de largura) e distante 50 cm do solo. Dois braços eram fechados por paredes de 40cm de altura, enquanto os braços restantes eram abertos e circundados por uma pequena borda (1cm) para reduzir a ocorrência de quedas. Utilizamos como única fonte de iluminação da sala, uma lâmpada de 60W localizada 100cm acima do centro do labirinto. Cada sessão experimental teve a duração de 5 minutos, sendo filmada em VHS e posteriormente reproduzida para quantificação das variáveis comportamentais. O experimentador permaneceu na sala durante a realização do teste comportamental. Todos os experimentos foram realizados entre às 08:00 e 13:00hs. Cada teste foi iniciado com a colocação do animal no centro do labirinto com a face voltada para um dos braços fechados. Registrou-se o número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo de permanência do animal nos braços abertos. Definimos como "entrada" nos braços, a colocação das quatro patas do animal dentro do mesmo. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste o labirinto foi limpo com tecido umedecido em álcool 70%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo.

3.4. Mensuração da pressão arterial

3.4.1. Tratamento com drogas

Para a mensuração da pressão arterial, os animais foram submetidos a tratamento agudo e crônico com L-Arg, D-Arg, L-NAME e D-NAME, como descrito no item 3.3.1.. Trinta minutos após o tratamento agudo e no final do tratamento crônico, cada animal teve sua pressão arterial mensurada pela cauda, através de um osciloscópio conforme o método de Zatz (1990).

3.4.2. Procedimento

Previamente à mensuração da pressão arterial, os animais foram aquecidos por 20 minutos em uma caixa de polipropileno (49x30x20cm) previamente aquecida (externamente pela base, por uma lâmpada de 100w controlada por um termostato) e mantida a 37-39°C. O pré-aquecimento teve como objetivo promover dilatação dos vasos da cauda do animal. Após o pré-aquecimento, os animais foram contidos em uma caixa de imobilização translúcida e um anel de pressão, conectado a um manômetro externo, foi acoplado à base da cauda. Um microfone elétrico (utilizado como detetor) foi conectado à uma extremidade de um tubo de látex (30cm de comprimento e diâmetro externo e interno de 12 e 10mm, respectivamente) e a cauda do animal acoplada à outra extremidade, de maneira que como um estetoscópio, as pulsações da cauda poderiam ser transmitidas para o microfone (através do ar contido no tubo de látex) e deste para um

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

Para a avaliação da pressão arterial, a pressão de "cuff" foi elevada 30mmHg acima da pressão na qual as pulsações da cauda cessaram quando então, foi lentamente reduzida. Quando as pulsações recomeçaram, a pressão arterial média foi determinada por visualização direta do sinal da cauda no osciloscópio e leitura da pressão de "cuff" para a primeira pulsação no manômetro externo.

Visto que os animais não foram previamente adaptados ao protocolo experimental e com o objetivo de minimizar os efeitos do estresse inicial sobre a pressão arterial, as leituras foram consideradas válidas somente quando 3 determinações consecutivas foram obtidas com variação não superior a 2mmHg (tipicamente 3 a 4 determinações).

3.5. Mensuração da atividade da NOS encefálica

3.5.1. Tratamento com drogas

Para a medida da atividade da NOS encefálica os animais foram submetidos a tratamento agudo (0.6, 10 e 60mg/kg) ou crônico (4, 100 ou

400 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) com L-NAME, conforme descrito anteriormente no item 3.3.1.. Trinta minutos após o tratamento agudo e no final do tratamento crônico, a atividade da NOS encefálica foi avaliada pela capacidade dos homogenatos teciduais em converter L-arginina em L-citrulina (Pollock et al, 1991).

3.5.2. Procedimento

Os animais foram anestesiados com éter e tiveram os encéfalos retirados. As amostras encefálicas frescas foram pesadas e homogeneizadas em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCL 50mM, pH 7.4) contendo 1mM de PMSF e 1mM de L-citrulina. Cinquenta microlitros do homogenato foram incubados na presença de 1mM de NADPH, 2mM de CaCl_2 e 10 μM de L-arginina contendo 100.000 dpm de [2,3,4,5- ^3H] arginina mono hidrocloreto (Amersham,UK) em um volume final de 100 μl a temperatura ambiente (25-27°C) durante 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1ml de tampão HEPES (20mM) pH 5.4 contendo 1mM de EGTA e 1mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5' a 10.000rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0.6ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8, Sigma Chem. Co., USA). Os eluatos foram recolhidos em viais de cintilação. As colunas foram lavadas com 1ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram reunidos aos anteriores.

Após adição de 10ml de líquido de cintilação (tolueno/Triton-X-100/PPO/POPOP) a radioatividade foi medida durante 1 min em espectrofotômetro de cintilação e relacionada aos picomoles de L-cit produzidos. Todos os reagentes foram preparados em tampão incubação (sem PMSF ou L-cit). O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Peterson (1977) e a atividade da NOS foi expressada como picomoles de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

Controles farmacológicos da atividade enzimática foram corridos em paralelo e consistiram na omissão do CaCl_2 e adição de 1mM de EGTA no meio de incubação (característica de NOS constitutiva) ou na adição de 1mM de L-NAME no meio de incubação. Nestas condições, a atividade de conversão de L-arginina em L-citrulina foi inibida em mais de 90%.

3.6. Dosagem sérica de nitratos e nitritos

3.6.1. Tratamento com drogas

Para a dosagem sérica de nitratos e nitritos os animais foram submetidos a tratamento crônico com L-NAME (4, 100 e 400 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) como descrito no item 3.3.1.. A fim de evitar a ingestão de nitratos exógenos, no sexto dia de tratamento, os animais foram privados de ração durante 24 horas sendo que, durante este período, as drogas foram dissolvidas em água destilada (O grupo controle recebeu água destilada). No sétimo dia os animais foram anestesiados com éter e amostras sangüíneas foram coletadas através de punção da aorta abdominal.

3.6.2. Procedimento

Após retração do coágulo a temperatura ambiente, os soros foram separados por centrifugação (2,000 rpm por 10 min.) e mantidos a -20°C até serem analisados por cromatografia de alta eficiência (HPLC). As amostras de soro foram diluídas 1:6 com água deionizada (resistividade aproximada 16MΩcm; Milli Q Plus, Milipore, USA) e desproteinizadas por ultrafiltração através de membrana de corte de peso molecular de 3kDa (Amicon, USA).

Quatrocentos microlitros dos soros desproteinizados foram injetados em sistema de HPLC acoplado à reação de Griess, para separação, detecção e quantificação específica de nitrato e nitrito. A fase móvel foi impulsionada por uma bomba (fluxo de 0.7ml/min.) através de uma coluna de troca iônica para separação dos ânions nitratos e nitritos. Em seguida, os ânions nitratos foram reduzidos de forma estequiométrica a nitritos por uma coluna de Cd/Cu (coluna redutora de nitratos). Os ânions nitritos passaram inertes por essa coluna. Ao efluente da coluna redutora de nitratos foi adicionado o reagente de Griess. A reação de Griess (Diazotização de aminas primárias) é caracterizada por ataque do NO (liberado a partir dos ânions nitritos em meio ácido) ao grupo -NH₂ de uma amina primária aromática (Sulfanilamina) e o posterior ataque deste intermediário (sal de diazônio) a um composto aromático (1-Naftil etileno diamina), rendendo assim uma estrutura ressonante (Diazo composto) com grande coeficiente de absorção molar na faixa de 530 a 550nm. Um fotodetector (540nm) determinou a absorbância das amostras e as concentrações de nitrito e

54

nitrito foram extrapoladas de uma curva padrão construída a partir de soluções aquosas de nitrito e nitrato de potássio (Sigma Chem.Co., USA).

3.7. Hipertensão “de dois rins” de Goldblatt (2K1C)

Com o objetivo de avaliar se um outro estado hipertensivo, não relacionado à inibição da síntese de óxido nítrico, poderia alterar o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um grupo de animais foi anestesiado com éter, quando então a artéria renal esquerda foi parcialmente obstruída, enquanto que o rim direito não foi manipulado (grupo 2K1C). O grupo controle foi submetido à mesma cirurgia porém nenhuma obstrução de artéria foi realizada (grupo SHAM). Após sete dias de recuperação da cirurgia sob condições padrões, os animais foram submetidos ao teste do LCE e a pressão arterial média foi determinada pelo método de Zatz (1990), como descrito anteriormente.

3.8. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações, quando necessário. Os dados referentes à hipertensão “de dois rins” Goldblatt foram analisados pelo teste de t-student. Os valores de probabilidade iguais ou superiores a 5% não foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Pressão arterial de ratos submetidos a tratamento agudo e crônico com L-NAME.

Os resultados demonstram que o tratamento agudo com L-NAME (10 e 60 mg.kg⁻¹) induziu elevação na pressão arterial dos animais (141.6 ± 6.9 mmHg, n=6 e 141.3 ± 5.9 mmHg, n=6, respectivamente) em relação ao grupo controle (121 ± 2.7 mmHg, ANOVA, F(8,45) = 5.61, p<0.001, seguida do teste de Duncan, p<0.05). O tratamento crônico com L-NAME (15 e 60 mg.kg⁻¹) também se mostrou efetivo em induzir hipertensão (152.8 ± 6.3 mmHg, n=5 e 149 ± 2.9 mmHg, n=14, respectivamente) quando comparado ao grupo controle, recebendo água de torneira *ad libitum* (120.8 ± 2.0 mmHg, ANOVA, F(8,67) = 15.95, p<0.001, seguida do teste de Duncan, p<0.05). Nenhuma alteração na pressão arterial foi observada após o tratamento dos animais com D-NAME, D-Arg ou L-Arg, seja após tratamento agudo, seja após tratamento crônico (Figuras 1 e 2).

4.2. Atividade da NOS em ratos submetidos a tratamento agudo e crônico com L-NAME.

Ambos os tratamentos, agudo (ANOVA, F(3,31) = 8.79, p<0.001) e crônico (ANOVA, F(3,25) = 31.04, p<0.001), com L-NAME inibiram a atividade da NOS quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Figuras 3 e 4). A atividade da NOS também foi inibida *in vitro* por

aproximadamente 95% quando íons cálcio foram omitidos do meio de incubação e EGTA foi adicionado ao mesmo, mostrando que a atividade enzimática era cálcio-dependente; inibição da ordem de 98% foram obtidas quando 1mM de L-NAME foi adicionado ao meio de incubação, confirmando assim que a conversão de [^3H]L-arginina para [^3H]L-citrulina havia sido catalisada pela enzima cNOS no homogenato encefálico como um todo.

4.3. Níveis séricos de nitratos e nitritos em ratos submetidos a tratamento crônico com L-NAME.

O tratamento crônico com L-NAME (15 e 60 mg.kg $^{-1}$) reduziu significativamente os níveis séricos de nitratos ($6.9 \pm 0.7\mu\text{M}$, n=8 , $p<0.05$ e $5.7 \pm 0.9\mu\text{M}$, n=8 , $p<0.001$, respectivamente; ANOVA, $F(3,28) = 9.65$, $p<0.001$ seguida do teste de Duncan) em relação ao grupo controle ($11.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$, n= 6) ou o grupo tratado cronicamente com L-NAME (0.6mg.kg $^{-1}$, $12.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$, n= 4). A concentração sérica de nitritos permaneceu inalterada em todos os grupos (Figura 5).

4.4. Efeito dos tratamentos agudo e crônico com L-NAME sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz.

No teste do labirinto em cruz, ratos tratados agudamente (ANOVA, $F(9,58) = 2.63$, $p<0.05$, seguida pelo teste de Duncan, $p<0.05$) ou cronicamente (ANOVA, $F(9,82) = 2.95$, $p<0.01$, seguida pelo teste de

Duncan, $p < 0.05$) com diazepam permaneceram mais tempo explorando os braços abertos (Figuras 6 e 7) e apresentaram maior porcentagem de entradas nos mesmos (Tabelas 1 e 2), em relação aos grupos controle (ANOVA, $F(9,58) = 2.43$, $p < 0.05$, seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$ e ANOVA, $F(9,83) = 2.54$, $p < 0.05$, seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$ respectivamente).

Em ratos tratados agudamente com L-NAME, o tempo de permanência nos braços abertos foi significativamente maior, em relação ao grupo controle (Figura 6, ANOVA, $F(9,58) = 2.63$, $p < 0.05$, seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$). Nenhuma alteração foi observada em relação à porcentagem de entradas nos braços abertos e ao número de entradas nos braços fechados, após tratamento agudo com L-NAME (Tabela 1). O tratamento crônico com L-NAME foi ineficaz em alterar o comportamento dos animais, seja nos braços abertos, seja nos braços fechados (Figura 7 e Tabela 2).

Ratos recebendo D-NAME, D-Arg ou L-Arg, aguda ou cronicamente, não diferiram do grupo controle em relação ao tempo de permanência nos braços abertos (Figuras 6 e 7), à porcentagem de entradas nos braços abertos, bem como ao número de entradas nos braços fechados (Tabelas 1 e 2, respectivamente).

4.5. Efeito da hipertensão “de dois rins” de Goldblatt sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz.

A oclusão parcial da artéria renal esquerda (grupo 2K1C; *two kidney one-clip*) elevou a pressão arterial em relação ao grupo sham-operado ($t(12) = 4.059$, $p < 0.01$). O teste de t de Student não revelou alteração significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos, no tempo de permanência dos animais nos braços abertos e no número de entradas nos braços fechados (Tabela 3).

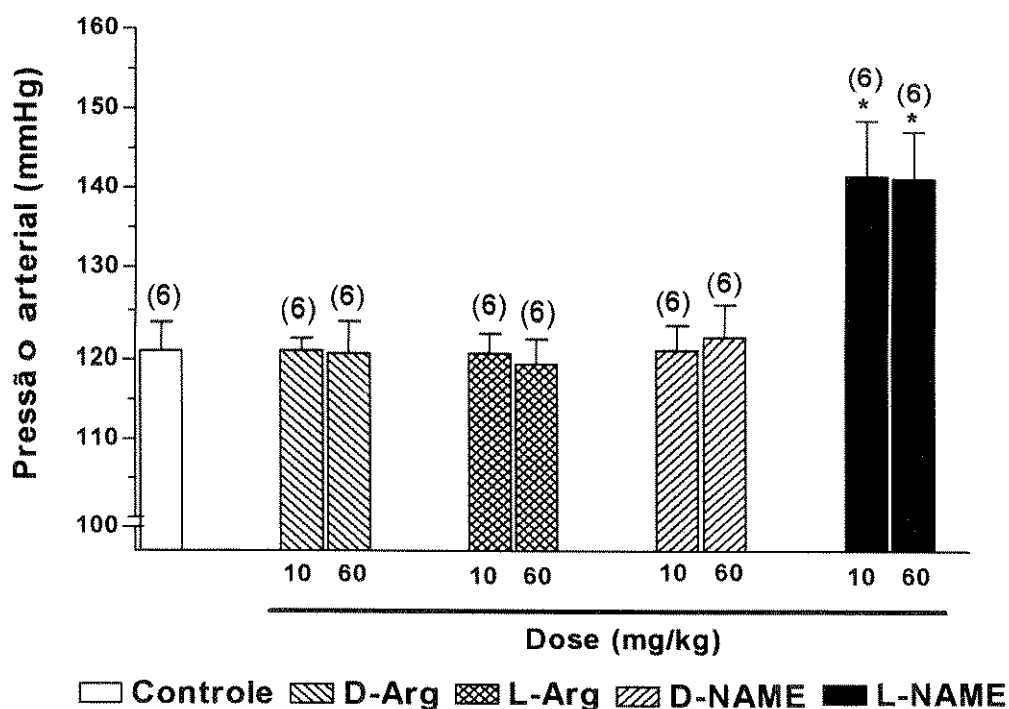


Figura 1. Pressão arterial de ratos tratados agudamente com L-NAME, D-NAME, L-Arg ou D-Arg. As drogas foram administradas por via i.p., 30 minutos antes do teste do labirinto em cruz. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.; número de animais de por grupo é dado entre parênteses. * = $p < 0.05$ em relação ao grupo controle (Teste de Duncan).

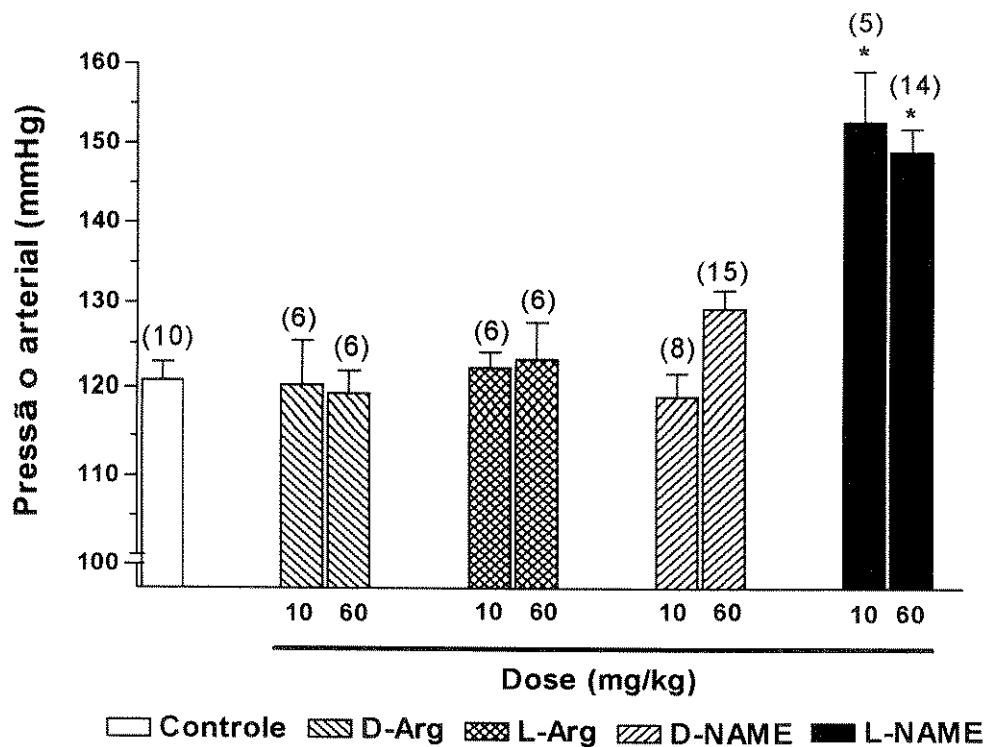


Figura 2. Pressão arterial de ratos tratados cronicamente com L-NAME, D-NAME, L-Arg ou D-Arg. Previamente ao teste do labirinto em cruz, os animais receberam as drogas através da água de bebida durante 7 dias. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.; número de animais por grupo é dado entre parênteses. As doses foram baseadas na ingestão diária de líquido e portanto, representam aproximações. * = $p < 0.05$ em relação ao grupo controle (Teste de Duncan).

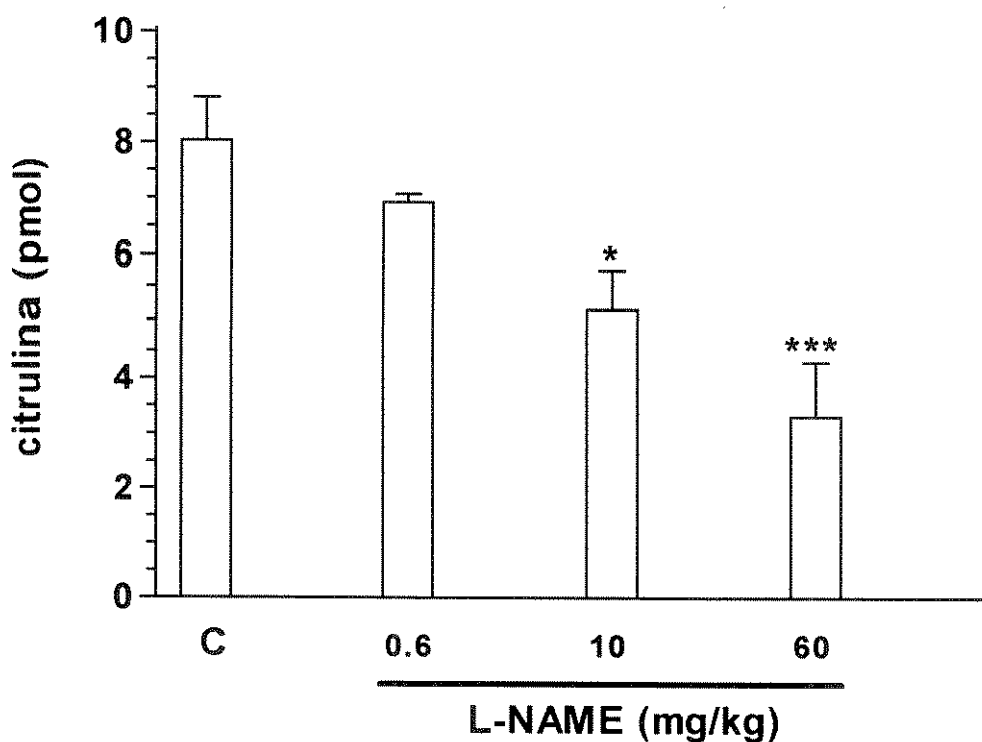


Figura 3. Atividade da NOS em homogenatos encefálicos de ratos tratados agudamente com diferentes doses de L-NAME. Atividade foi avaliada pela habilidade da enzima em converter $[^3\text{H}]$ L-arginina em $[^3\text{H}]$ L-citrulina. A avaliação foi realizada 30 minutos após o tratamento com L-NAME. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. ; * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$ em relação ao grupo controle (C) tratado com salina (Teste de Duncan).

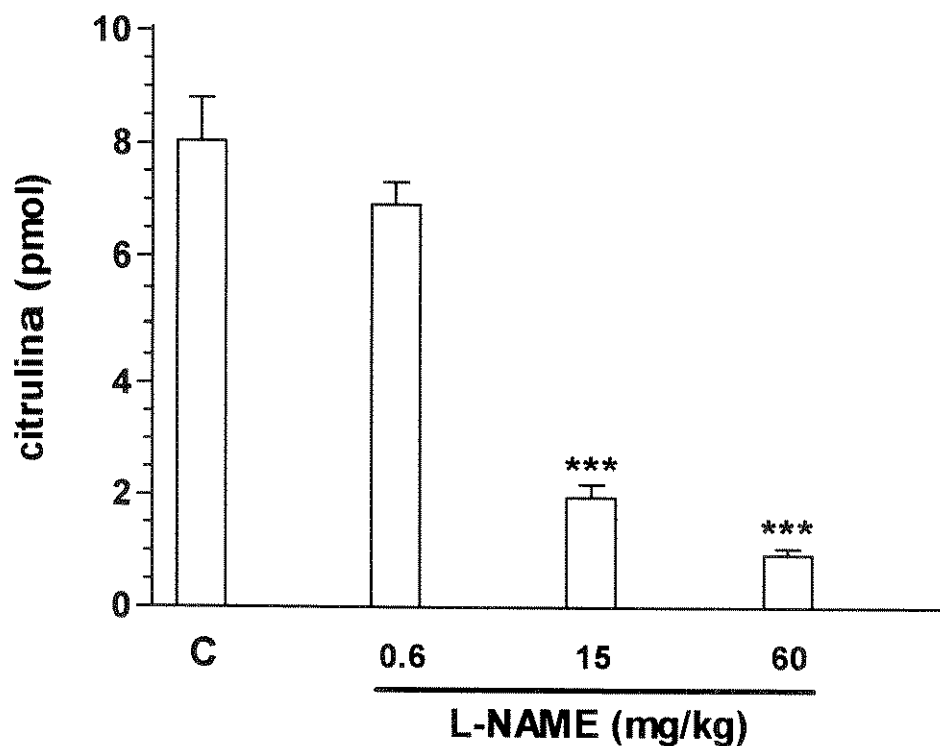


Figura 4. Atividade da NOS em homogenatos cerebrais de ratos tratados cronicamente com diferentes doses de L-NAME. Atividade foi avaliada pela habilidade da enzima em converter $[^3\text{H}]$ L-arginina em $[^3\text{H}]$ L-citrulina. A avaliação foi realizada após o tratamento crônico com L-NAME pela água de bebida. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.; As doses foram baseadas na ingestão diária de líquido e portanto, representam aproximações. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$ em relação ao grupo controle (C) tratado com água de torneira (Teste de Duncan).

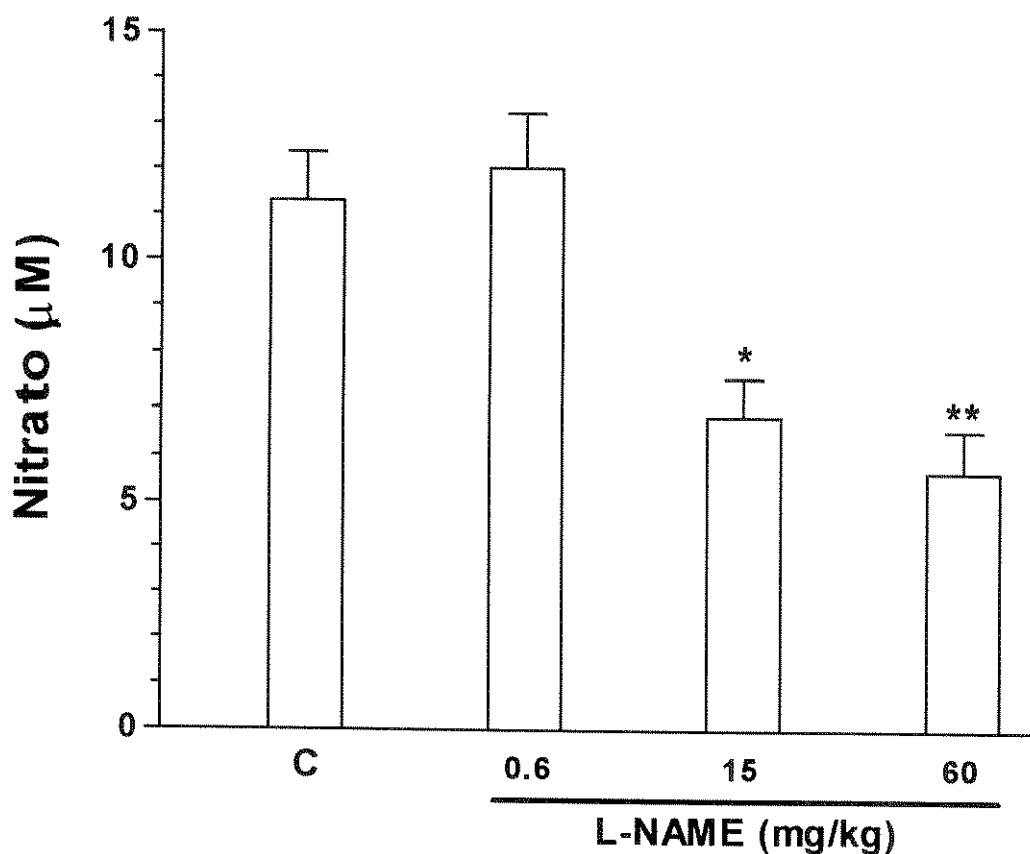


Figura 5. Nível sérico de nitratos em ratos tratados cronicamente com diferentes doses de L-NAME: O nível sérico de nitratos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após tratamento crônico com L-NAME pela água de bebida (4 , 100 e $400\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) durante 7 dias. As doses foram baseadas na ingestão diária de líquido e portanto, representam aproximações. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.001$ em relação ao grupo controle (C; Teste de Duncan).

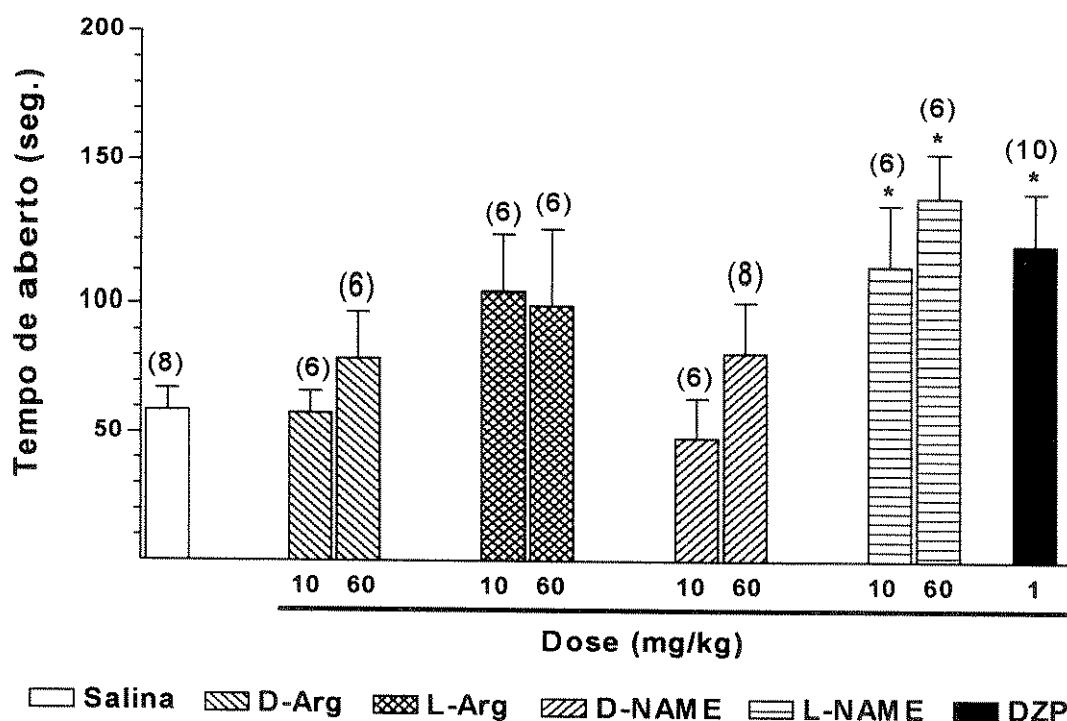


Figura 6. Tempo de permanência nos braços abertos exibido por ratos tratados agudamente com L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg ou diazepam (DZP). As drogas foram administradas por via i.p., 30 minutos antes do teste do labirinto em cruz. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.; número de animais por grupo é dado entre parênteses. * = $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Duncan).

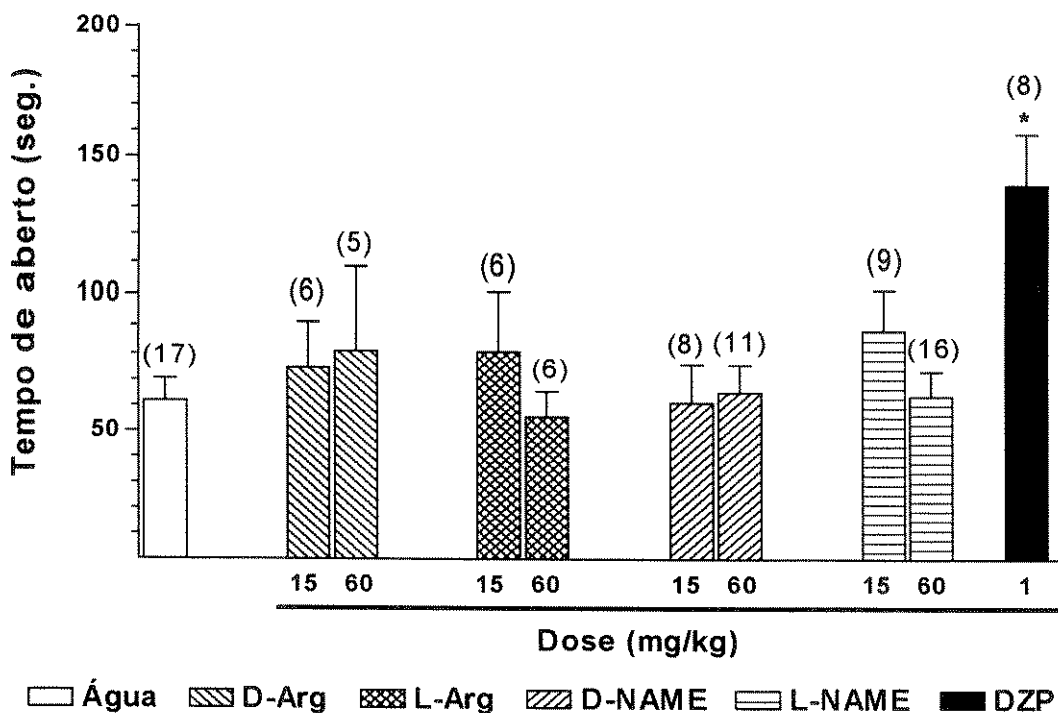


Figura 7. Tempo de permanência nos braços abertos exibido por ratos tratados cronicamente com L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg ou diazepam (DZP). Previamente ao teste do labirinto em cruz, os animais receberam as drogas através da água de bebida durante 7 dias, exceto DZP que foi administrado por via i.p. pelo mesmo período. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.; número de animais por grupo é dado entre parênteses. As doses foram baseadas na ingestão diária de líquido e portanto, representam aproximações. * = $p < 0.05$ em relação ao grupo controle tratado com água de torneira (Teste de Duncan).

Tabela 1. Porcentagem de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados em ratos tratados agudamente com L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg ou diazepam e posteriormente submetidos ao teste do labirinto em cruz.

Tratamento ^a	n ^b	Dose (mg.kg ⁻¹)	% Entrada Braços Abertos ^c	Número Entradas Braços Fechados
Salina	8	0	37.7 ± 5.2	5.5 ± 0.8
Diazepam	10	1	58.4 ± 4.9 ^d	4.6 ± 0.6
D-Arg	6	10	40.1 ± 5.2	6.5 ± 1.1
	6	60	53.5 ± 6.9	4.5 ± 0.8
L-Arg	6	10	49.6 ± 4.3	6.1 ± 0.4
	6	60	40.1 ± 4.5	6.0 ± 0.5
D-NAME	6	10	32.5 ± 4.8	6.0 ± 0.6
	8	60	42.2 ± 6.7	6.6 ± 1.0
L-NAME	6	10	50.3 ± 6.6	6.7 ± 1.0
	6	60	54.3 ± 4.0	4.3 ± 0.8

^a Todas as drogas foram administradas por via i.p., 30 minutos antes do teste do labirinto em cruz. ^b Número de animais por grupo. ^c% Entradas Abertos = Entradas Abertos/Total de Entradas x 100. Cada escore representa a média ± E.P.M.. ^dp<0.05 em relação ao grupo controle (Teste de Duncan). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, em relação ao número de entradas nos braços fechados.

Tabela 2. Porcentagem de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados em ratos tratados cronicamente com L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg ou diazepam e posteriormente submetidos ao teste do labirinto em cruz.

Tratamento ^a	n ^b	Dose ^c (mg.kg ⁻¹)	% Entrada Braços Abertos ^d	Número Entradas Braços Fechados
Água	18	0	37.3 ± 2.4	5.4 ± 0.3
Diazepam	8	1	63.2 ± 5.7°	4.6 ± 0.4
D-Arg	6	15	40.5 ± 7.1	6.7 ± 0.9
	5	60	46.0 ± 7.7	5.6 ± 0.8
L-Arg	6	15	44.3 ± 4.4	6.0 ± 0.7
	6	60	35.1 ± 2.8	6.7 ± 0.7
D-NAME	6	15	37.5 ± 5.9	4.7 ± 0.5
	11	60	37.5 ± 4.7	4.7 ± 0.6
L-NAME	9	15	43.6 ± 3.9	6.0 ± 0.6
	16	60	40.7 ± 4.4	5.8 ± 0.5

^a Todas as drogas foram dissolvidas na água de bebida (100 ou 400µg.ml⁻¹) e administradas *ad libitum* durante sete dias, exceto diazepam que foi dado por via i.p. durante o mesmo período. ^bNúmero de animais por grupo. ^cAs doses são aproximações e foram baseadas na ingestão diária de líquidos. ^d% Entradas Abertos = Entradas Abertos/Total de entradas x 100. Cada número representa a média ± E.P.M.; ^e p<0.05 em relação ao grupo controle. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos, em relação ao número de entradas nos braços fechados (Teste de Duncan).

Tabela 3. Efeito da hipertensão “de dois rins” de Goldblatt (2K-1C) sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz.

Medida	Grupo	
	SHAM ^a	2K-1C ^b
Pressão Arterial (mmHg)	126.6 ± 3.2	160.9 ± 7.8 ^d
Tempo de permanência nos braços abertos (seg.)	32.9 ± 9.1	38.6 ± 9.6
% Entrada nos braços abertos^c	29.7 ± 6.1	31.7 ± 6.9
Número de entradas nos braços fechados	4.3 ± 0.5	4.9 ± 0.6

^a Os animais foram submetidos a apenas uma incisão no flanco esquerdo, sem nenhuma obstrução na artéria renal esquerda. ^b Os animais tiveram a artéria renal esquerda parcialmente ocluída; nenhuma manipulação cirúrgica foi realizada no flanco direito do animal. ^c %Entradas Abertos = Entradas Abertos/Total de entradas x 100. Sete dias após a cirurgia, todos os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz e posteriormente tiveram a pressão arterial média mensurada pelo método de Zatz (1990). Cada escore representa a média ± E.P.M. de sete animais. ^d p<0.05 em relação ao grupo SHAM (Teste t de Student). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos, em relação ao tempo de permanência nos braços abertos, % entradas nos braços abertos ou número de entradas nos braços.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos dez anos, o comportamento exploratório de camundongos e ratos tornou-se uma ferramenta muito utilizada no estudo da ansiedade em roedores. Foi sugerido que a exploração de um ambiente não familiar é influenciada pela instalação de um conflito interno caracterizado por uma pulsão exploratória, motivada talvez por curiosidade, associada à uma pulsão de esquiva ou evitação da exploração, motivada por medo (Montgomery, 1955). Esse conflito interno é considerado análogo à ansiedade, sendo o estímulo de novidade, a principal fonte de motivação aversiva (Gray, 1982).

A exploração de um labirinto em forma de cruz (labirinto em cruz), contendo dois braços abertos e dois fechados, tornou-se um modelo animal de ansiedade (Handley & Mithani, 1984). O modelo tem sido validado em termos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos para o estudo de ansiedade em roedores (Pellow et al, 1985) e freqüentemente revisado com respeito à sua validade para o estudo de drogas com potencial ansiolítico (Hogg, 1996; Dawson & Tricklebank, 1995; Handley & McBlane, 1993).

O presente estudo demonstra que os tratamentos, agudo e crônico, com diazepam induziram aumento na exploração dos braços abertos, na medida em que os animais apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos e permaneceram mais tempo nos mesmos. A exploração dos braços fechados, quando avaliada pelo número de entradas,

permaneceu inalterada demonstrando assim que a ação do diazepam foi caracterizada por aumento seletivo na exploração dos braços abertos.

A literatura tem considerado as variáveis “porcentagem de entradas” e “tempo de permanência nos braços abertos” como índices de ansiedade, assim como o número de entradas nos braços fechados” como um índice da atividade motora do animal (Pellow et al, 1985; File, 1992 e Cruz et al, 1994). Desse modo, os resultados acima mencionados demonstram que o diazepam, uma droga reconhecidamente ansiolítica, promove efeito ansiolítico no labirinto em cruz caracterizado por um aumento seletivo na exploração dos braços abertos sem alterar contudo, o número de entradas nos braços fechados.

Esse efeito ansiolítico ou anticonflito dos benzodiazepínicos pode ser decorrente de uma potencialização das ações inibitórias do ácido gama-aminobutírico (GABA) sobre circuitos neuronais, localizados na amígdala (Hodges et al, 1987; Petersen et al, 1985) e PAG (Russo et al, 1993), responsáveis pelo controle de comportamentos defensivos (Graeff, 1994).

De forma similar, o tratamento agudo com L-NAME aumentou o tempo gasto nos braços abertos. Esse aumento da exploração nos braços abertos não deve ser atribuído a interferência da droga sobre a atividade motora dos animais, visto que não houve alteração no número de entradas nos braços fechados.

Sedação tem constituído uma limitação no estudo da ansiedade através de testes baseados em comportamento exploratório, visto que pode interferir com a atividade motora do animal. O principal desafio reside em avaliar até que ponto uma dada resposta comportamental pode ser considerada decorrente de ação ansiolítica ou devida a alteração da atividade motora (File, 1992). Desse modo, é possível que um efeito ansiolítico possa ser mascarado por uma ação sedativa da droga. Por outro lado, também é possível que um efeito sedativo possa ser erroneamente interpretado como ansiolítico.

No tocante ao teste do labirinto em cruz, efeitos sedativos acentuados podem contaminar o tempo de permanência nos braços abertos ou ainda diminuir a porcentagem de entradas nos braços abertos, induzindo assim a interpretações errôneas do efeito da droga. Nesse ponto, uma avaliação do número de entradas nos braços fechados (índice de atividade motora) permite uma melhor distinção entre efeito ansiolítico e sedativo da droga em questão. Desse modo, a ação seletiva do tratamento agudo com L-NAME, em relação à exploração dos braços abertos, pode ser considerada como refletindo um efeito ansiolítico e sugere um papel ansiogênico para o NO no sistema nervoso central. Resultados semelhantes foram obtidos por Guimarães e colaboradores (1994), demonstrando que a microinjeção de L-NAME na PAG dorsal de ratos induz significativa elevação na porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, sem alterar o número de entradas nos braços fechados.

Quando comparado ao diazepam, observamos que o efeito ansiolítico do tratamento agudo com L-NAME não foi tão evidente; somente o tratamento com diazepam aumentou de forma significativa a porcentagem de entradas nos braços abertos. Entretanto, não é incomum encontrar na literatura essa dissociação entre os dois índices ou seja, porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (Pellow et al, 1985).

Os tratamentos agudos com D- ou L-arginina se mostraram ineficazes em alterar o nível de ansiedade dos animais. Assim, é improvável que o efeito ansiolítico do tratamento agudo com L-NAME seja devido a uma possível ação da droga através dos receptores da arginina. Esse resultado é corroborado pela literatura, demonstrando que a administração sistêmica de doses elevadas de D- ou L-arginina (400 e 600mg/Kg, respectivamente) não altera o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz, ainda que uma tendência ansiogênica para L-arginina tenha ocorrido (Volke et al, 1997). A microinjeção de L-arginina através da PAG também tem se mostrado inefectiva em alterar o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz (Guimarães et al, 1994).

O presente estudo demonstrou ademais que o tratamento agudo com D-NAME não alterou o comportamento. Uma vez que o D-NAME é ineficaz em inibir a atividade da NOS, acreditamos que o efeito ansiolítico do L-NAME seja provavelmente mediado pela inibição da síntese de NO. Essa visão é suportada pelo fato do tratamento agudo com L-NAME inibir de forma dose-dependente, a atividade da NOS em homogenatos encefálicos.

A atividade da NOS foi também reduzida *in vitro*, quando cálcio foi omitido ou L-NAME adicionado ao meio de incubação do grupo controle, mostrando assim que a conversão de [3 H]L-arginina em [3 H]L-citrulina em homogenato encefálico era cálcio-dependente e portanto, devido à ação da enzima NOS constitutiva. Portanto, esses resultados indicam que a síntese de NO através da atividade da enzima NOS expressada constitutivamente, pode ter consequências ansiogênicas em ratos.

O comportamento de roedores submetidos ao labirinto em cruz é sensível tanto ao sistema de inibição comportamental quanto ao sistema aversivo cerebral (Handley & McBlane, 1991). O substrato neural para a esquiva passiva dos braços abertos estaria centrada no septo e hipocampo, estruturas que compõem o sistema de inibição comportamental (Gray, 1982). Esse sistema seria fundamental para o conflito de aproximação dos braços abertos. Desse modo, a esquiva passiva dos braços abertos tenderia a manter o animal explorando os braços fechados, com redução da porcentagem de entradas nos braços abertos, e indiretamente impedir o registro do tempo de permanência nos mesmos. Durante o desenvolvimento do presente estudo, não foi incomum observar animais explorando exclusivamente os braços fechados, o que implicou em zero por cento de entradas e tempo de permanência nos braços abertos.

A literatura demonstra que neurônios localizados no septo e no hipocampo expressam a enzima NOS (Kinjo et al, 1989). Visto que o hipocampo é considerado um sítio neuroanatômico para o efeito ansiolítico

de antagonistas de receptores do tipo NMDA (Przegalinski et al, 1996), é possível que a ação ansiogênica de agonistas NMDA envolva a síntese de NO como sistema de amplificação de sinal no hipocampo. Estudos posteriores poderão demonstrar se um aumento ou diminuição da síntese de NO no sistema septo-hipocampal induzirá alteração no comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz.

Por outro lado, o substrato neural para a esquiva ativa ou retirada/fuga dos braços abertos seria representado pelo sistema aversivo cerebral (Graeff, 1988). Como visto anteriormente, a amígdala e a PAG são ativadas quando o perigo é proximal, podendo evocar os comportamentos de fuga, que tenderia a reduzir o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, ou esquiva ativa, que tenderia a reduzir a porcentagem de entrada nos braços abertos. Uma vez que a enzima cNOS já foi descrita na amígdala (Vincent, 1994) e na PAG dorsal de ratos (Onstott et al, 1993), é possível que a síntese de NO possa modular o nível de medo/ansiedade em roedores, através do sistema aversivo cerebral. Desde que no presente estudo, a droga foi administrada de forma sistêmica, não podemos inferir quais estruturas cerebrais estariam envolvidas no efeito ansiolítico observado após tratamento agudo com L-NAME.

Entretanto, L-NAME induz elevação na porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, quando microinjetado na PAG dorsal de ratos (Guimarães et al, 1994). Portanto, é possível que a inibição da síntese de NO na PAG possa inibir o comportamento de fuga e esquiva

ativa dos braços abertos, elevando assim o tempo de permanência dos animais e a porcentagem de entrada nos braços abertos respectivamente.

Curiosamente, a administração sistêmica de L-NOARG em camundongos reverte o efeito ansiolítico induzido por clordiazepóxido no teste do labirinto em cruz (Quock & Nguyen, 1992). Além disso, a administração sistêmica de L-NOARG (30mg.kg^{-1}) reduz a porcentagem de entradas e o tempo de permanência de ratos nos braços abertos (Lino de Oliveira et al, 1997). Esses resultados sugerem que a síntese de NO pode, ao contrário, ser ansiolítica em roedores.

As razões para essa discrepância, quanto à ação ansiogênica/ ansiolítica para o NO não são claras, especialmente porque tem sido demonstrada a possibilidade do L-NAME representar uma pró-droga, que é hidrolizada no sangue ou endotélio vascular a L-NOARG (Pfeifer et al, 1996). Entretanto, é possível que uma somatória de diferenças metodológicas, nem sempre mencionadas em artigos de publicação, possam contribuir com esses resultados conflitantes (Para revisão ver Hogg, 1996). Por outro lado, na medida em que a síntese de NO pode ter consequências neuroprotetoras ou neurotóxicas, dependendo do seu estado redox (Lipton et al, 1993), é possível que esse papel dual do NO possa também ocorrer na modulação do nível de ansiedade. Estudos posteriores poderão confirmar a possibilidade dessa hipótese.

Outra fonte de discrepância diz respeito à relação dose-resposta da droga. A administração aguda de L-NAME provoca efeito do tipo ansiolítico

em ratos quando submetidos ao labirinto em cruz, ainda que a mesma dose tenha induzido elevação no número de entradas nos braços fechados (Volke et al, 1995). Tais autores argüíram que o efeito ansiolítico não foi do tipo dose-dependente, mas seguiu a forma de "U" invertido ou seja, a droga se mostrou eficaz apenas em doses intermediárias (10mg.kg^{-1}), sendo inefectiva em doses inferiores (1mg.kg^{-1}) ou mais elevadas (20mg.kg^{-1}).

De forma similar, Wiley e colaboradores (1995) demonstraram em camundongos, um efeito ansiolítico para L-NAME nas doses de 10 e 176mg/kg , sendo as doses intermediárias (30 e 100mg/kg) inefectivas; tais resultados reforçam aqueles de Volke e colaboradores (1995), mostrando que o efeito ansiolítico do L-NAME não é do tipo dose-dependente mas, ao contrário, demonstram que o efeito ansiolítico segue uma curva dose-resposta assumindo a forma de "U". Acreditamos que a ausência de efeito ansiolítico com a utilização de baixas doses da droga pode ser explicada pela ausência de inibição da NOS. Entretanto, não temos uma explicação plausível para a ausência de efeito ansiolítico com doses mais elevadas de L-NAME (20, 30 e 100 mg/kg), visto que observamos efeito ansiolítico quando uma significativa inibição aguda da NOS foi obtida.

Recentemente foi demonstrado que, ao contrário do L-NAME, o também inibidor da NOS, 7-NI, promoveu um efeito ansiolítico em ratos e camundongos (Volke et al, 1997); entretanto, o efeito foi do tipo dose-dependente. Volke tem atribuído essa diferença na curva dose-resposta, ao fato de L-NAME induzir hipertensão (Wang et al, 1995), o que não é o caso

do 7-NI, uma droga capaz de inibir eNOS e cNOS *in vitro* (Babbedge et al, 1993), sem alterar a pressão arterial (Moore et al, 1993; Wang et al, 1995). De fato, a inibição crônica da síntese de NO pela administração L-NAME através da água de “ bebida tem sido estabelecida como um modelo animal de hipertensão (Ribeiro et al, 1992).

Entretanto, o presente estudo demonstra que a existência de um quadro hipertensivo não parece influenciar o comportamento dos animais no labirinto. Primeiro porque o quadro hipertensivo induzido por obstrução parcial da artéria renal (grupo 2k1C) não alterou o comportamento dos animais no labirinto em cruz. Segundo porque a administração crônica de L-NAME similarmente aumentou a pressão arterial mas não alterou o nível de ansiedade dos animais. Terceiro porque a redução do quadro de hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não afeta o comportamento exploratório dos animais, quando submetidos ao labirinto em cruz (Rosa et al, 1994).

Desse modo, ainda que existam evidências de que pressão sangüínea elevada pode ser induzida por predisposição genética associada a estresse psicológico, além de outros fatores ambientais tais como ingestão de sal e inatividade física (Williams et al, 1991), a literatura tem demonstrado que o oposto parece não ser verdade.

Ânions nitrato e nitrito são produtos de degradação do NO (Vincent, 1994). A redução nos níveis séricos de nitrato, observada em animais tratados cronicamente com L-NAME, indica a efetividade deste tratamento

em produzir inibição generalizada da síntese de NO. Entretanto, o efeito ansiolítico induzido pelo tratamento agudo com L-NAME não foi observado após tratamento crônico, ainda que os animais apresentassem reduzida atividade da NOS encefálica e reduzido nível sérico de nitratos. Apesar do isolamento interferir com o comportamento de ratos no teste do Labirinto em cruz (Vasar et al, 1993), isso não parece explicar a diferença observada entre o tratamento agudo e crônico com L-NAME, pois não observamos diferença significativa no tempo gasto nos braços abertos em ambos os grupos controle. Resultado semelhante foi obtido por Lino de Oliveira e colaboradores (1997), demonstrando perda do efeito ansiogênico após 4 dias de administração de L-NOARG. Assim, ao contrário do efeito hipertensivo, é possível que ocorra o desenvolvimento de tolerância aos efeitos do NO, sejam eles ansiolíticos ou ansiogênicos. Assim sendo, a ausência de alterações comportamentais após a inibição crônica da síntese de NO sugere que a via L-arginina talvez não seja importante na modulação do nível basal de ansiedade em roedores .

6. CONCLUSÕES

- Apenas o tratamento agudo com L-NAME induziu efeito ansiolítico em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. O efeito foi caracterizado pela elevação do tempo de permanência dos animais nos braços abertos. Essa variável não foi alterada após o tratamento crônico com a mesma droga.
- O efeito ansiolítico induzido pelo tratamento agudo com L-NAME não se deve à uma ação da droga através dos receptores da arginina, visto que a administração aguda de D-, ou L-arginina não alterou o comportamento dos animais no labirinto em cruz.
- Ambos os tratamentos, agudo e crônico, com L-NAME promoveram inibição de eNOS e nNOS, visto que os animais manifestaram elevada pressão arterial e diminuída atividade da NOS em tecido encefálico. O tratamento crônico com L-NAME também reduziu os níveis séricos de nitratos.
- É provável que o efeito ansiolítico induzido pelo tratamento agudo com L-NAME seja decorrente da inibição aguda da síntese de NO, visto que o tratamento agudo com L-NAME se mostrou eficaz em promover inibição enzimática nNOS (Tipo I) e a administração aguda de D-NAME não alterou o comportamento exploratório dos animais no labirinto em cruz.

- É improvável que o efeito ansiolítico induzido pelo tratamento agudo com L-NAME seja decorrente da hipertensão induzida pela droga, visto que outro estado hipertensivo não relacionado com inibição da síntese de NO (hipertensão “de dois rins” de Goldblatt ou 2K1C) não alterou o comportamento exploratório dos animais no labirinto. Além disso, a administração crônica de L-NAME aumentou a pressão arterial mas não alterou o nível de ansiedade dos animais.
- A ausência de alterações comportamentais após a inibição crônica de nNOS sugere que a via L-arginina/óxido nítrico talvez não seja importante na modulação do nível basal de ansiedade em roedores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGLETON, J.P. & MISHKIN, M. The amygdala: sensory gate to the emotions. In: *Emotion: Theory, Research and Experience*, ed. by R. Plutchik & H. Klerman, pp 281-299, Academic Press, New York, 1985.
- APPLEBAUM, P.S. Controlling prescriptions of benzodiazepines. *Hosp. Community Psychiatry*, 43: 12-13, 1992.
- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S & MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3203-3207, 1977.
- BABBEDGE, R.C.; BLAND-WARD, P.A ; HART, S.L. & MOORE, P.K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 225-228, 1993.
- BARNETT, S.A. Movements in the living space. In: *The rat: A study in behaviour*, Aldine Publications Co., Chicago, pp 30-50, 1975.
- BEASLEY, D. Interleukin 1 and endotoxin activate soluble guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 259: R-38-44, 1990.
- BECKER, A. ; GRECKSCH, G. & SCHRÓDER, H. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester interferes with pentylenetetrazol-induced kindling and has no effect on changes in glutamate binding. *Brain res.*, 688: 230-232, 1995.

- BECKMAN, J.S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol.*, 15: 53-59, 1991.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W. & CHEN, J. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1620-1624, 1990.
- BENELLI, A.; BERTOLINI, A.; POGGIOLI, R.; CAVAZZUTI, E.; CALZÀ, L.; GIARDINO, L. & ARLETTI, R. Nitric oxide is involved in male sexual behaviour of rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 294: 505-510, 1995.
- BLANCHARD, D.C. & BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. In: Annual review of psychology, ed. by M.R. Rosenzweig & L.W. Porter, pp 43-69, Annual Review, Inc., Palo Alto, 1988.
- BRADY, D.R.; CAREY, R.G. & MUFSON, E.J. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) profiles in the amygdala of human and new world monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain res.*, 577: 236-248, 1992.
- BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; LEÃO BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C. & BAGRI, A. Defence reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, 44: 361-365, 1988.
- BRANDÃO, M.L.; DE AGUIAR, J.C. & GRAEFF, F.G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 397-402, 1982.

- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger molecule. *Neuron*, 8: 3-11, 1992.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.H. & GLATT, C. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351: 714-718, 1991.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 87: 682-685, 1990.
- BUSH, P.A.; GONZALEZ, N.E.; GRISCAVAGE, J.M. & IGNARRO, L.J. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyses the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 960-966, 1992.
- CRAIG, K.J.; BROWN, K.J. & BAUM, A. Environmental factors in the aetiology of anxiety. In: *Psychopharmacology: The Fourth generation of Progress*, ed. by F.E. Bloom & D.J. Kupfer, pp 1325-1339, 1995.
- CRUZ, A.P.M.; FREI, F. & GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49: 171-176, 1994.
- DARWIN, C. *The Expression of Emotion in Man and Animals*, Philosophical Library, New York, 1872 (Reprinted 1985).
- DAWSON, G.R. & TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 33-36, 1995.

DAWSON, T.M.; BREDET, D.S.; FOTUHI, M.; HWANG, P.M. & SNYDER, S.H.

Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7797-7801, 1991.

DEAN, P; REDGRAVE, P. & WETSBY, G.W.M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci.*, 12: 137-147, 1989.

FANSELOW, M.S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian J. Biol. Sci.*, 15: 177-182, 1980.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: *The midbrain periaqueductal grey matter: Functional, anatomical and immunohistochemical organisation*, ed. by A. Depaulis & R. Bandler, pp 151-173, Plenum, New York, 1991.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. in: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*, ed. by J.M. Elliot, D.J. Heal & C.A. Marsden, pp 25-44, Elsevier, Amsterdam, 1992.

FUKUTO, J.M. & CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: Potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 165-194, 1995.

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

- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neural Sci.*, 14: 60-67, 1991.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L. & CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 336: 385-388, 1988.
- GELLER, D.A.; LOWENSTEIN, C.J.; SHAPIRO, R.A. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3491-3495, 1993.
- GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R.F. & SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension. The production persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.*, 59: 347- , 1934.
- GORIDIS, R C. & MORGAN, I.G. Guanyl cyclase in rat brain subcellular fractions. *FEBS Letts.*, 34: 71-73, 1973.
- GRAEF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27: 811-829, 1994.
- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev. Neurosci.*, 4: 181-211, 1993.
- GRAEFF, F.G. Brain defence systems and anxiety. in: *Handbook of anxiety, The neurobiology of anxiety*, ed. by G.D. Burrows, M. Routh & R. Noyes, pp 307- 354, Elsevier, Amsterdam, 1990.

- GRAEFF, F.G. Animal models of aversion. in: *Animal models of psychiatric disorder*, ed. by P. Simon, P. Soubrié & D. Widlocher, pp 115-141, Basel: Karger, 1988.
- GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.L.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A. & OLIVEIRA R.M.W. Role of the amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.* , 58: 123- , 1993.
- GRAY, J.A. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. New York: Oxford University Press, 1982.
- GRIFFITH, T.M.; EDWARDS, D.H.; NEWBY, A.C. ET AL. Production of endothelium-derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovasc. Res.*, 20: 7-12, 1986.
- GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; DEL-BEL, E.A. & BALLEJO, G. Anxiolytic effect of NOS inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* , 5: 1929-1932, 1994.
- HANDLEY, S.L. & MCBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 29: 129-138, 1993.
- HANDLEY, S.L. & MITHANI, S. Effects of $\alpha 2$ -adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1993)

- HODGES, H.; GREEN, S. & GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not in discrimination. *Psychopharmacology*, 92: 491-504, 1987.
- HOFMANN, M.; SPANO, P.F.; TRABUCCHI, M. & KUMAKURA, K. Guanylate cyclase activity in various rat brain areas. *J Neurochem.*, 29: 395-396, 1977.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 21-30, 1996.
- HÖLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 20: 298-303, 1997.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 9265-9269, 1987.
- IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.; EDWARDS, J.C.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J. & GRUETTER, C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218: 739-749, 1981.
- ISHIZAKI, Y.; MA, L.; MORITA, I. & MUROTA, S.I. Astrocytes are responsive to endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Neurosci. Lett.*, 125: 29-30, 1991.

- JOLY, G.; SCHINI, V.B. & VANHOUTE, P.M. Ballon injury and interleukin-1 β induce nitric oxide synthase activity in rat carotid arteries. *Circulation Res.*, 71: 331-338, 1992.
- JULOU, L.; BLANCHARD, J.C. & DREYFUS, J.F. Pharmacological and clinical studies of cyclopyrrolones: zopiclone and suriclone. *Pharmacol Biochem. Behav.*, 23: 653-659, 1985.
- KALIN, N.H. The neurobiology of fear. *Sci. Am.*, 268: 54-60, 1993.
- KILBOURN, R.G.; GROSS, S.S.; JUBRAN, A.; ADAMS, J.; GRIFFITH, O.W.; LEVI, R. & LODATO, R.F. N^G-methyl-L-arginine inhibits tumour necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3629-3632, 1990.
- KINJO, N.; SKINNER, R.D. & POWELL, E.W. A study of NADPH-diaphorase positive septohippocampal neurons in rat. *Neurosci. Res.*, 7: 154-158, 1989.
- KNOWLES, R.G.; SALTER, M.; BROOKS, S.L. & MONCADA, S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 1042-1048, 1990.
- LAMAS, S.; MARSDEN, P.A. & LI, G.K. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterisation of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6348-6352, 1992.
- LE DOUX, J.E. Sensory systems and emotion: A model of affective processing. *Integr. Psychiat.*, 4: 237-248, 1986.

- LINO DE OLIVEIRA, C.; DEL BEL, E.A. & GUIMARÃES, F.S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56: 55-59, 1997.
- LIPTON, S.A.; CHOI, Y.B.; PAN, Z.H.; LEI, S.Z.; CHEN, H.S.V.; 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*, 364: 626-632, 1993.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185, 1987.
- LONART, G.; WANG, J. & JOHNSON, K.M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 220: 271-272, 1992.
- LORRAIN, D.S. & HULL, E.M. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport*, 5: 87-89, 1993.
- 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 USA*, 89: 6711-6715, 1992.
- MACDERMOTT, A.B.; MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L. NMDA-receptor activation Increases cytoplasmatic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321: 519-22, 1986.

- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D. & WISHNOK, J.S.
Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-8711, 1988.
- MAYER, B.; JOHN, M.; HEINZEL, B.; WERNER, E.R.; WACHTER, H.; SCHULTZ, G. & BÖHME, E. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxide-reductase. *FEBS Letts.*, 288: 187-191, 1991.
- MCCALL, T. & VALLANCE, P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 1-6, 1992.
- MEDINA, J.H. & IZQUIERDO, I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res. Rev.*, 21: 185-194, 1995.
- MIZUKAWA, K.; McGEER, P.L.; VINCENT, S.R. & McGEER, E.G.
Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 279: 281-311, 1989.
- MOILANEN, E. & VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.*, 27: 359-367, 1995.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 30: 2002-2012, 1993.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260, 1955.

- MOORE, P.K. & HANDY, R.L.C. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase - is no NO really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol. Sci.*, 18: 204-211, 1997.
- MORLEY, J.E. & FLOOD, J.F. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci.*, 49: 707- ,1991.
- MURPHY, S.; SIMMONS, M.L.; AGULLO, L.; GARCIA, A.; FEINSTEIN, D.L.; GALEA, E.; REIS, D.J.; MINC-GOLOMB, D. & SCHWARTZ, J.P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.*, 16: 323-328, 1993.
- MUSCARÁ, M.N. & DE NUCCI, G. Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post column reactions. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 686: 157-164, 1996.
- 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*, 378: 383-386, 1995.
- NOWICKI, J.P.; DUVAL, D.; POIGNET, H. & SCATTON, B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 204: 339-40, 1991.
- OLDS, M.E. & OLDS, J. Approach-escape interactions in rat brain. *Am. J. Physiol.*, 203: 803-810, 1962.

- ONSTOTT, D.; MAYER, B. & BEITZ, A. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorso-lateral column within the midbrain periaqueductal grey of the rat: Analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res.* , 610: 317- , 1993.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behav. Brain Sci.*, 5: 407-467, 1982.
- PANKSEPP, J.; GANDELMAN, R. & TROWILL, J. Modulation of hypothalamic self-stimulation and escape behavior by chlordiazepoxide. *Physiol. Behav.*, 5: 965-969, 1970.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* , 14: 149-167, 1985.
- PETERSEN, E.N.; BRAESTRUP, C. & SCHEEL-KRÜGER, J. Evidence that the anticonflict effect of midazolam in the amygdala is mediated by specific benzodiazepine receptors. *Neurosci. Lett.*, 53: 285-288, 1985.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83: 346-356, 1977.

- PFEIFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F. & MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* , 118: 1433-1440, 1996.
- POLLOCK, J.S.; FÖRSTERMANN, U.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; SCHMIDT, H.H.H.W.; NAKANE, M. & MURAD, F. Purification and characterisation of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 88: 10480-, 1991.
- PRZEGALINSKI, E.; TATARCZYNSKA, E.; DEREN-WESOLEK, A. & CHOJNACKA-WOJCIK, E. Anticonflict effects of a competitive NMDA receptor antagonist and a partial agonist at strychnine-insensitive glycine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 73-77, 1996.
- QUOCK, R.M. & NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.*, 51: PL255-260, 1992.
- RAPOPORT, R.M.; DRAZNIN, M.B. & MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cGMP-dependent phosphorylation. *Nature*, 306: 174-176, 1983.
- RASHATWAR, S.S.; CORNWELL, T.L. & LINCOLN, T.M. Effects of 8-bromo-cGMP on Ca⁺² levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of Ca⁺² -ATPase by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5685-5689, 1987.

- REES, D.D.; CELLEK, S.; PALMER, R.M.J. & MONCADA, S.
Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 173: 541-547, 1990.
- REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defence mechanisms in the aging brain. *FASEB. J.* 9: 526-533, 1995.
- RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M. & ZATZ, R.
Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* , 20: 298-303, 1992.
- ROSA, W.C.M.; OLIVEIRA, G.M. & NAKAMURA-PALACIOS, E.M. Effects of the antihypertensive drugs α -methyldopa and hydralazine on the performance of spontaneously hypertensive rats in the elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.* , 27: 55-59, 1994.
- RUSO, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C. & GRAEFF, F.G.
Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology*, 110: 198-202, 1993.
- SCHENBERG, L.C.; COSTA, M.B. & CASTRO, F.S. Logistic analysis of the defence reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 14: 473-479, 1990.
- SCHINI-KERTH, V.B. & VANHOUTTE, P.M. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp. Physiol.*, 80: 885-905, 1995.

- SCHINI, V.B. & VANHOUTE, P.M. Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261: 553-559, 1992.
- SCHMITT, P.; CARRIVE, P.; DI SCALA, G.; JENCK, F.; BRANDÃO, M.L.; BAGRI, A.; MOREAU, J.L. & SANDNER, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behav. Brain Res.*, 22: 181-190, 1986.
- SCHULZ, R.; REES, D.D.; HODSON, H.F.; PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. Inhibition of vascular nitric oxide synthesis by novel L-arginine analogues. *Eur. J. Pharmacol.*, 183: 645, 1990.
- SCHUMAN, E.M. & MADISON, D.V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 153-183, 1994.
- SEMBA, J.; SAKAI, M.; MIYOSHI, R. & KITO, S. N^G -monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, increases extracellular GABA in the striatum of the freely moving rat. *Neuroreport*, 6: 1298-1300, 1995.
- SEPINWALL, J. & COOK, L. Behavioral pharmacology of anti-anxiety drugs. In: *Handbook of Psychopharmacology*, ed. by L.L. Iversen; S.D. Iversen and S.H. Snyder, Plenum Press, New York, pp 345, 1978.
- SNYDER, S.H. & BREDET, D.S. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12: 125-128, 1991.
- STEIN, L. Chemistry of reward and punishment. In: *Psychopharmacology, a review of progress*. ed. by D.H. Efron, pp 105-123, U.S. Government Printing Office, Washington, 1968.

- THIEMERMANN, C. & VANE, J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*; 182: 591-595, 1990.
- VAN RIEZEN, H. & SEGAL, M. Introduction to the evaluation of anxiety and related disorders. In: *Comparative evaluation of rating scales for clinical psychopharmacology*. Elsevier, New York, pp 225-228, 1988.
- VANHOUTTE, P.M. & SHIMOKAWA, H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation*, 80: 1-9, 1989.
- VASAR, E.; PEURANEN, E.; HARRO, J.; LANG, A.; ORELAND, L. & MÄNNISTÖ, P.T. Social isolation of rats increases the density of cholecystokinin receptors in the frontal cortex and abolishes the anti-exploratory effect of caerulein. *N. S. Arch. Pharmacol.*, 348: 96-, 1993.
- VINCENT, S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 42: 129-160, 1994.
- VINCENT, S.R. & KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46: 755-784, 1992.
- VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KÖKS, S.; BOURIN, M.; MÄNNISTÖ, P.T. & VASAR, E. 7-nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology*, 131: 399-405, 1997.
- VOLKE, V.; KÖKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J. & MÄNNISTÖ, P.T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, 6: 1413-1416, 1995.

- WANG, Y.X.; LIM, S.M. & PANG, C.C.Y. Increase by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) of resistance of venous return in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 1454-1458, 1995.
- WANG, Q.; PELLIGRINO, D.A.; BAUGHMAN, V.L.; KOENING, H.M. & ALBRECHT, R.F. The role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of cerebral blood flow in normocapnia and hypercapnia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15: 774-778, 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: 101-107, 1995.
- WILLIAMS, R.R.; HUNT, S.C.; HASSTEDT, S.J.; HOPKINS, P.N.; WU, L.L.; BERRY, T.D.; SUTLITS, B.M.; BARLOW, G.K.; SCHUMAKER, M.C.; LIFTON, R.P. & LALOUEL, J.M. Are there interactions and relations between genetic and environmental factors predisposing to high blood pressure? *Hypertension*, 18: 1-29, 1991.
- WOLIN, M.S.; WOOD, K.S. & IGNARRO, L.J. Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of unpurified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme and nitrosyl-heme. *J. Biol. Chem.*, 257: 11312-11320, 1982.
- ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Animal Sci.*, 40: 198-201, 1990.
- ZATZ, R. & DE NUCCI, G. Effect of acute nitric oxide inhibition on glomerular microcirculation. *Am. J. Physiol.*, 261: F360-F363, 1991.

ZHANG, J. & SNYDER, S.H. Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 213-233, 1995.

8. SUMMARY

The involvement of nitric oxide (NO) in anxiety was investigated in rats, using the elevated plus maze test. Acute, but not chronic, systemic treatment with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 and 60 mg.kg⁻¹), an inhibitor of NO synthase, increased the time spent by the rats in the open arms. Both the acute and chronic treatments with L-NAME inhibited NO synthase in endothelial cells and in the central nervous system, as shown by the increase in mean arterial pressure and decreased NO synthase activity in brain tissue. Chronic treatment with L-NAME also decreased the serum nitrate levels. The anxiolysis induced by acute L-NAME treatment is unlikely to be due to hypertension, since two kidney-one clip hypertension in non-L-NAME-treated rats failed to significantly change exploratory behaviour in the elevated plus maze. These results indicate that acute inhibition of NO synthesis decreases anxiety in rats.

Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test

Moacir S. Faria ^{a,b,*}, Marcelo N. Muscará ^a, Heitor Moreno Jr. ^a, Simone A. Teixeira ^c, Heidi B. Dias ^a, Benedito De Oliveira ^c, Frederico G. Graeff ^d, Gilberto De Nucci ^a

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Sciences and Clinical Analysis, CCBPS, UNIMEP, Piracicaba, SP, Brazil

^c Department of Biochemistry, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^d Laboratory of Psychopharmacology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 18 July 1996; revised 31 December 1996; accepted 3 January 1997

Abstract

The involvement of nitric oxide (NO) in anxiety was investigated in rats, using the elevated plus maze test. Acute, but not chronic systemic treatment with *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 and 60 mg · kg⁻¹), an inhibitor of NO synthase, increased the time spent by the rats in the open arms. Both the acute and chronic treatments with L-NAME inhibited NO synthase in endothelial cells and in the central nervous system, as shown by the increase in mean arterial pressure and decreased NO synthase activity in brain tissue. Chronic treatment with L-NAME also decreased the serum nitrate levels. The anxiolysis induced by acute L-NAME treatment is unlikely to be due to hypertension, since two-kidney one-clip hypertension in non-L-NAME-treated rats failed to significantly change exploratory behaviour in the elevated plus maze. These results indicate that acute inhibition of NO synthesis decreases anxiety in rats. © 1997 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Nitric oxide (NO); Anxiety; Plus maze; elevated; *N*^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); Arterial blood pressure; Nitric oxide (NO) synthase; Brain

1. Introduction

The L-arginine/nitric oxide (NO) pathway has been implicated in the control of a variety of physiological functions (for review see Zhang and Snyder, 1995 and Moncada et al., 1991). The neuronal isoform of the enzyme NO synthase has already been characterised and cloned (Snyder and Brecht, 1991). Constitutive brain NO synthase activity depends on the presence of calcium and NADPH, and hence agonists acting at the NMDA receptors activate the enzyme by promoting a rise in cytosolic calcium (Mayer and Miller, 1990; Vincent, 1994).

In the central nervous system, the participation of NO as a neurotransmitter or neuromodulator was originally proposed by Garthwaite et al. (1988) and later confirmed by Snyder and Brecht (1991). NO has been implicated in

memory formation (Schuman and Madison, 1991), nociception (Moore et al., 1991; Handy et al., 1995), as well as sexual (Nelson et al., 1995; Benelli et al., 1995), aggressive (Nelson et al., 1995) and feeding behaviour (Morley and Flood, 1991).

In the brain, NO synthase has been localised in regions involved with anxiety, such as the hypothalamus, amygdala and hippocampus (Vincent, 1994). Thus, it is possible that the L-arginine/NO pathway may underlie anxiety.

The elevated plus maze test, a widely used animal model of anxiety (Pellow et al., 1985; Lister, 1987), was applied by Quock and Nguyen (1992) to show that acute L-NAME administration counteracts chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice, suggesting an anxiolytic action for NO.

In contrast, other reports point to an anxiogenic action of NO in the central nervous system of rats. Thus, Volke et al. (1995) have shown that *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) has an anxiolytic effect in the elevated plus maze and Guimarães et al. (1994) reported that micro-injection of L-NAME into the dorsal central grey induces

* Corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, P.O. Box 6111, 13081-970 Campinas, SP, Brazil.

anxiolysis in the same test. These contradictory results indicate that the participation of the L-arginine/NO pathway in anxiety deserves further investigation.

The aim of the present study was to evaluate the effect of inhibiting acute and chronic NO synthesis by systemic administration of L-NAME on anxiety as measured with the elevated plus maze test in the rat. For comparison, the inactive enantiomer, *N*^ω-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), was also administered. Since inhibition of NO synthesis induces hypertension (Ribeiro et al., 1992), we also tested if another hypertensive condition, not related with the inhibition of NO synthesis (two-kidney one-clip rats), could itself change the level of anxiety in rats in the elevated plus maze test.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing approximately 250 g were used in all experiments. They were housed either in individual cages (for chronic treatment) or in groups of six (for acute treatment). Prior to the experiments, the animals underwent a period of adaptation for 3 days with free access to food and water, under a light/dark cycle of 12 h (lights on 06:00 a.m.).

2.2. Drugs

N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), *N*^ω-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), L-arginine (L-Arg) and D-arginine (D-Arg) were obtained from Sigma (USA). Diazepam was obtained from Sanofi-Winthrop (Brazil).

In the acute experiments, the drugs were dissolved in saline solution (0.9% w/v). Diazepam was dissolved in saline containing 1% Triton X-100. In the chronic experiments, the drugs were dissolved in tap water.

2.3. Treatments

For acute treatment, either L-NAME, D-NAME, L-Arg or D-Arg was administered i.p. at doses of either 10 or 60 mg · kg⁻¹. The control group received the same volume of saline solution. For chronic treatment, the same drugs were dissolved in the drinking water (100 or 400 µg · ml⁻¹) which was given ad libitum for 7 days. Based on the individual daily liquid intake, these concentrations resulted in a dose of approximately 15 and 60 mg · kg⁻¹ per day, respectively (Ribeiro et al., 1992). Control animals received tap water ad libitum. Diazepam was given i.p. (1 mg · kg⁻¹) daily for 7 days. Thirty minutes after the acute treatment and at the end of chronic treatment, each group of animals was randomly subdivided into two groups. The first underwent the elevated plus maze test while the second had their mean arterial pressure measured.

2.4. Elevated plus maze

The plus maze used was built of wood according to the specifications reported by Pellow et al. (1985) and consisted of two open arms (50 × 10 cm) surrounded only by a short (1 cm) edge to avoid falls and two enclosed arms (50 × 10 × 40 cm) arranged in such a way as to form a cross. The arms extended from a central platform (10 × 10 cm) and were raised 50 cm above the floor.

Each rat was placed at the centre of the maze facing an enclosed arm and was allowed to explore the maze for 5 min. The number of entries into the open and closed arms, as well as the time spent in the open arms were recorded. Factor analysis studies showed that the most selective (heavy load in the anxiety factor alone) indexes of anxiety are the time spent in the open arms and the percentage of entries into the open arm, while the total number of entries into the enclosed arms reflects locomotor activity (Cruz et al., 1994). Any animal which fell off the maze was excluded from the experiment.

2.5. Blood pressure

The mean arterial pressure values were measured by a tail-cuff method, according to Zatz (1990). In order to minimise the effects of initial stress due to animal handling, measurements were considered valid only when three consecutive readings did not differ by more than 2 mmHg.

2.6. Brain NO synthase activity

The effects of acute and chronic L-NAME treatment on brain NO synthase activity *ex vivo* were studied. The assay measures the ability of a whole-brain homogenate to convert [³H]L-arginine to [³H]L-citrulline (Pollock et al., 1991). A group of rats was treated acutely with L-NAME (0.6, 10 and 60 mg · kg⁻¹) while another group received the same drug chronically (4, 100 and 400 µg · ml⁻¹ of drinking water), as described above. Thirty minutes after the acute treatment and at the end of the chronic treatment, the animals were anaesthetised with ethyl ether and brain samples were rapidly removed. The samples were homogenised in 5 vols. of cold incubation buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) containing 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-citrulline.

The homogenates were incubated for 30 min in the presence of 1 mM NADPH, 2 mM CaCl₂ and 10 µM L-arginine containing 100 000 dpm of [2,3,4,5-³H]L-arginine monohydrochloride (Amersham, UK) at room temperature (25–27°C).

Pharmacological controls of enzymatic activity were carried out in parallel and consisted of either the omission of CaCl₂ and addition of 1 mM of either EGTA or the addition of 1 mM L-NAME to the incubation medium.

The protein content of the samples was determined

according to the method of Peterson (1977) and the activity of brain NO synthase was expressed as pmol L-citrulline produced/min per mg of protein.

2.7. Serum nitrite and nitrate

A group of rats received chronic treatment with L-NAME (4, 100 and 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of drinking water) as described above. Based on the individual daily liquid intake, these concentrations resulted in a dose of approximately 0.6, 15 and 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day, respectively. After a 7-day treatment, the animals were anaesthetised with ethyl ether and blood samples were obtained from the abdominal aorta. After clotting at room temperature, the samples were centrifuged (10 min at $2000 \times g$) and the sera were separated and kept at -20°C until analysed for nitrite and nitrate content by high-performance liquid chromatography (Muscará and De Nucci, 1996).

In order to avoid the ingestion of exogenous nitrate, the animals were deprived of food for 24 h before blood sampling. During this period, the drugs were dissolved in distilled water. The control group received distilled water only (instead of tap water).

2.8. Two-kidney one-clip hypertension

In order to investigate whether a hypertensive condition per se (independent of NO synthesis inhibition) could lead to any significant change in the behaviour of rats in the elevated plus maze test, a group of rats was made hypertensive by partial occlusion of the left renal artery (Goldblatt et al., 1934).

The rats were anaesthetised with ether and the left renal artery was occluded with a clip to achieve a luminal diameter of 0.2 mm, while the right kidney was not disturbed (two-kidney one-clip group). In the control group (sham-operated) an incision was made in the flank without artery clipping. Seven days after surgery, the animals were tested in the elevated plus maze and had their mean arterial pressure measured as described above.

2.9. Statistical analysis

The data were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test for multiple comparisons where necessary. The number of entries into the closed arms was evaluated with the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons. The data for two two-kidney one-clip rats were analysed with Student's *t*-test. Probability values less than 5% ($P < 0.05$) were considered significant.

3. Results

Acute treatment with L-NAME (10 and 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) induced an elevation in mean arterial pressure (141.6 ± 6.9

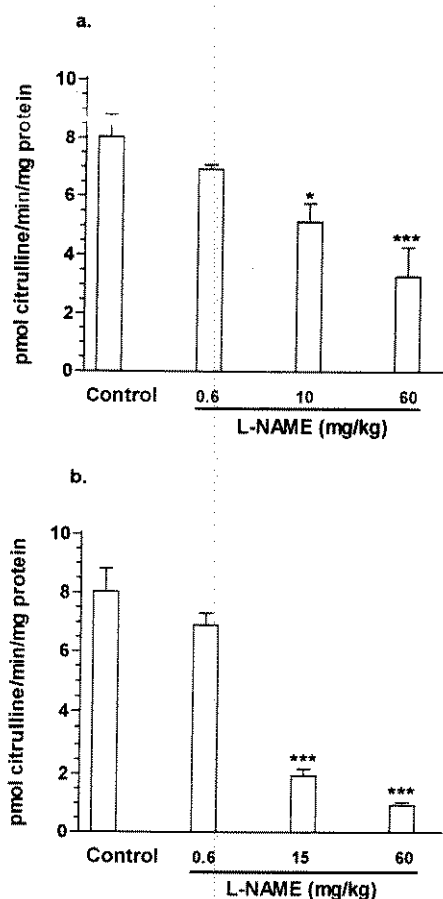


Fig. 1. NO synthase activity in brain homogenates from rats treated with different doses of L-NAME, measured as the rate of conversion of [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline. Panel a: Brain NO synthase activity measured 30 min after the animals received single L-NAME doses i.p. Panel b: Brain NO synthase activity measured after a 7-day period of oral treatment with L-NAME dissolved in the drinking water. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. The doses for chronic treatment are approximations and were based on the individual daily liquid intake. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ relative to the control group (Duncan's test for multiple comparisons).

mmHg, $n = 6$ and 141.3 ± 5.9 mmHg, $n = 6$, respectively) relative to the control group (121 ± 2.7 mmHg, $n = 6$; ANOVA, $F(8,45) = 5.61$, $P < 0.001$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$). Chronic treatment with L-NAME (15 and 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) also induced hypertension (152.8 ± 6.3 mmHg, $n = 5$ and 149 ± 2.9 mmHg, $n = 14$, respectively) relative to the control group (120.8 ± 2.0 mmHg, $n = 10$; ANOVA, $F(8,67) = 15.95$, $P < 0.001$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$). Neither acute nor chronic treatment with D-NAME, D-Arg or L-Arg changed the mean arterial pressure of the rats.

Both acute (ANOVA, $F(3,31) = 8.79$, $P < 0.001$) and chronic (ANOVA, $F(3,25) = 31.04$, $P < 0.001$) treatment with L-NAME significantly inhibited brain NO synthase activity when compared to the respective control groups (Fig. 1). Brain NO synthase activity was inhibited in vitro by approximately 95% when calcium ions were omitted from, and EGTA was added to, the incubation media, and

by approximately 98% when 1 mM L-NAME was added to the incubation mixture, thus confirming that the conversion of [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline was due to a Ca^{2+} -dependent constitutive NO synthase in the whole-brain homogenates.

Chronic treatment with L-NAME (15 and 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) significantly reduced serum nitrate levels ($6.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$, $P < 0.05$ and $5.7 \pm 0.9 \mu\text{M}$, $P < 0.001$, respectively; ANOVA, $F(3,28) = 9.65$, $P < 0.001$ followed by Duncan's test) relative to either the control group ($11.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$) or the group treated chronically with L-NAME (0.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $12.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$). The nitrite concentrations remained unchanged in all the groups (ANOVA, $F(3,28) = 0.4017$, $P = 0.7530$) and were below $1 \mu\text{M}$.

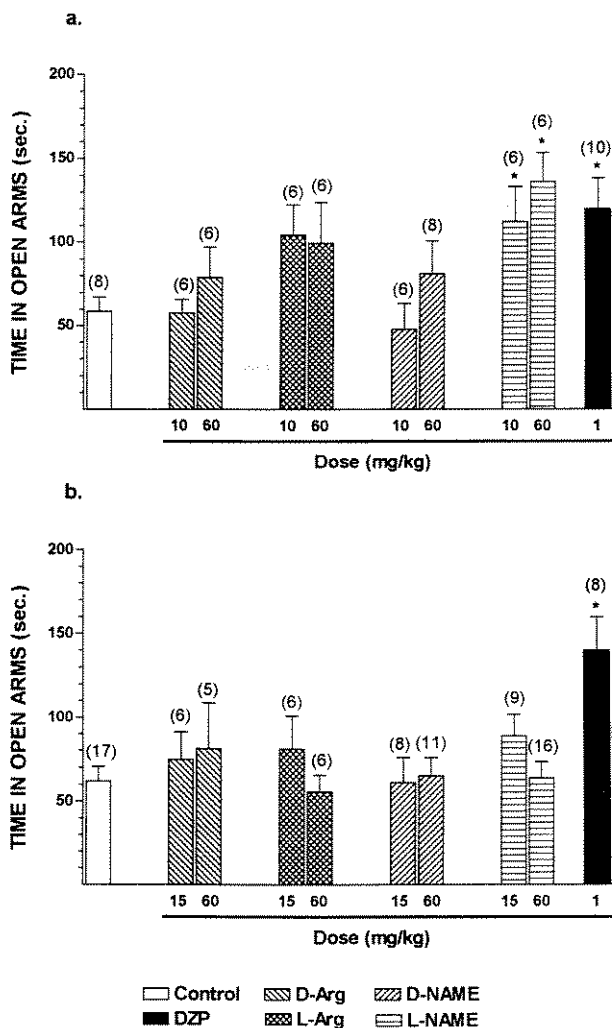


Fig. 2. The time spent in the open arms by rats treated with either L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg or diazepam (DZP). Panel a: The drugs were administered acutely 30 min prior the elevated plus maze test. Panel b: Previous to the elevated plus maze test, the animals received the drugs chronically dissolved in their drinking water, except diazepam which was given i.p. for 7 days. The doses for chronic treatment are approximations and were based on the individual daily liquid intake. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. for the number of animals given in parentheses. * $P < 0.05$ relative to the control group.

Table 1

Percentage of entries into the open arms and number of entries into the closed arms by rats treated chronically with either L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg or diazepam and subsequently tested in the elevated plus maze test

Treatment ^a	n ^b	Dose (mg $\cdot$ kg ⁻¹) ^c	% Open arm entries ^d	Closed arm entries
Tap water	18	0	37.3 $\pm$ 2.4	5.4 $\pm$ 0.3
Diazepam	8	1	63.2 $\pm$ 5.7 ^e	4.6 $\pm$ 0.4
D-Arg	6	15	40.5 $\pm$ 7.1	6.7 $\pm$ 0.9
	5	60	46.0 $\pm$ 7.7	5.6 $\pm$ 0.8
L-Arg	6	15	44.3 $\pm$ 4.4	6.0 $\pm$ 0.7
	6	60	35.1 $\pm$ 2.8	6.7 $\pm$ 0.7
D-NAME	6	15	37.5 $\pm$ 5.9	4.7 $\pm$ 0.5
	11	60	37.5 $\pm$ 4.7	4.7 $\pm$ 0.6
L-NAME	9	15	43.6 $\pm$ 3.9	6.0 $\pm$ 0.6
	16	60	40.7 $\pm$ 4.4	5.8 $\pm$ 0.5

^a All the drugs were dissolved in the drinking water (100 or 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and given ad libitum for 7 days, except diazepam which was given i.p.

^b Number of animals per group.

^c The doses are approximations and were based on the individual daily liquid intake.

^d % open entries = open/total $\times$ 100. Each score represents the mean $\pm$ S.E.M.

^e $P < 0.05$ relative to the control group. No significant differences were observed among the groups, relative to the number of entries into the closed arms.

In the elevated plus maze test, the rats treated either acutely (ANOVA, $F(9,58) = 2.63$, $P < 0.05$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$) or chronically (ANOVA, $F(9,82) = 2.95$, $P < 0.01$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$) with diazepam spent a longer time (Fig. 2) and had a greater percentage of entries (Tables 1 and 2) in the open

Table 2

Percentage of entries into the open arms and number of entries into the closed arms by rats treated acutely with either L-NAME, D-NAME, L-Arg, D-Arg or diazepam and subsequently submitted to the elevated plus maze test

Treatment ^a	n ^b	Dose (mg $\cdot$ kg ⁻¹)	% Open arm entries ^c	Closed arm entries
Saline	8	0	37.7 $\pm$ 5.2	5.5 $\pm$ 0.8
Diazepam	10	1	58.4 $\pm$ 4.9 ^d	4.6 $\pm$ 0.6
D-Arg	6	10	40.1 $\pm$ 5.2	6.5 $\pm$ 1.1
	6	60	53.5 $\pm$ 6.9	4.5 $\pm$ 0.8
L-Arg	6	10	49.6 $\pm$ 4.3	6.1 $\pm$ 0.4
	6	60	40.1 $\pm$ 4.5	6.0 $\pm$ 0.5
D-NAME	6	10	32.5 $\pm$ 4.8	6.0 $\pm$ 0.6
	8	60	42.2 $\pm$ 6.7	6.6 $\pm$ 1.0
L-NAME	6	10	50.3 $\pm$ 6.6	6.7 $\pm$ 1.0
	6	60	54.3 $\pm$ 4.0	4.3 $\pm$ 0.8

^a All the drugs were administered by i.p. route, 30 min before the elevated plus maze test.

^b Number of animals per group.

^c % open entries = open/total $\times$ 100. Each score represents the mean $\pm$ S.E.M.

^d $P < 0.05$ relative to the control group. No significant differences were observed among the groups, relative to the number of entries into the closed arms.

Table 3

Effect of high mean arterial pressure (two-kidney one-clip hypertension, 2K-1C), not related with NO synthesis inhibition, on the behavior of rats in the elevated plus maze test

Measurement	Group	
	Sham ^a	2K-1C ^b
Mean arterial pressure (mmHg)	126.6 ± 3.2	160.9 ± 7.8 ^d
Time spent in the open arms (s)	32.9 ± 9.1	38.6 ± 9.6
Percentage of open arm entries ^c	29.7 ± 6.1	31.7 ± 6.9
Number of closed arm entries	4.3 ± 0.5	4.9 ± 0.6

^a The animals had an incision made in the left flank without artery clipping.

^b The animals had the left renal artery partially occluded with a clip while the right kidney was not disturbed.

^c %open arm entries = open/total × 100. All the animals were tested in the elevated plus maze 7 days after the surgery. Each score represents the mean ± S.E.M. for 7 animals.

^d $P < 0.05$ relative to the sham-operated group (Student's *t*-test). No significant differences were observed among the groups, relative to either time spent in the open arms, %open arm entries or number of closed arm entries.

arms than their respective control groups (ANOVA, $F(9,58) = 2.43$, $P < 0.05$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$ and ANOVA, $F(9,83) = 2.54$, $P < 0.05$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$ respectively). In rats treated acutely with L-NAME, the time spent in the open arms (Fig. 2a, ANOVA, $F(9,58) = 2.63$, $P < 0.05$, followed by Duncan's test, $P < 0.05$) but not the percentage of entries into the open arms (Table 2) was significantly higher than for the control group.

The number of entries into the enclosed arms was not affected by acute treatment with L-NAME (Table 2). Chronic treatment with L-NAME failed to change the behaviour of rats in the open and enclosed arms (Table 1).

Rats receiving D-NAME, D-Arg or L-Arg either chronically or acutely did not differ from the control with regard to the time spent in the open arms (Fig. 2), to the percentage of entries into the open arms, as well as to the number of entries into the enclosed arms (Kruskal-Wallis, $H(9) = 11.885$, $P = 0.2199$ and $H(9) = 8.47$, $P = 0.4876$; Tables 1 and 2, respectively).

Partial occlusion of the left renal artery (two-kidney one-clip group) elevated the mean arterial pressure (Table 3) relative to the sham-operated group ($t(12) = 4.059$, $P < 0.01$) but failed to change the percentage of entries into the open arms ($t(12) = 0.217$, $P = 0.4159$) and the time spent in the open arms ($t(12) = 0.432$, $P = 0.3369$), as well as the number of entries into the enclosed arms ($t(12) = 0.6957$).

4. Discussion

In the elevated plus maze test, untreated rats usually spend more time and enter more frequently into the enclosed arms than into the open arms (Pellow et al., 1985).

This is due to the natural aversion rodents have for open spaces and to the elevation of the maze (Lister, 1987, 1990; Pellow et al., 1985; Treit et al., 1993). As a result, the number (or percentage) of open arm entries and the time spent in open arms have been considered as indexes of anxiety in rats (Pellow et al., 1985; File, 1992; Cruz et al., 1994) or mice (Lister, 1987). In turn, the number of entries into the closed arms has been considered an index of the animal's motor activity (File, 1992; Cruz et al., 1994).

The present results show that both chronic and acute diazepam treatment increased the time spent in open arms and the percentage of open arm entries (Fig. 2, Tables 1 and 2, respectively) without changing the number of entries into the closed arms (Tables 1 and 2). Since acute treatment with L-NAME similarly increased the time spent in the open arms of the elevated plus maze (Fig. 2a) without changing the number of entries into the enclosed arms (Table 2) this may be interpreted as an anxiolytic effect.

The difference between the effect of diazepam and that of acute L-NAME administration on plus maze exploration was quantitative rather than qualitative. Both drugs increased one of the indexes of anxiety (time spent in the open arms). However, only diazepam significantly increased the percentage of entries into the open arms. Therefore, the anxiolytic effect of diazepam was more evident. However, it is not uncommon to find such a dissociation between the two indexes (as in the case of L-NAME) in the literature (Pellow et al., 1985). Neither drug affected locomotion as represented by the total number of entries into the enclosed arms.

The anxiolysis induced by acute L-NAME administration is unlikely to be due to a non-specific action of the drug because acute treatment with either L-Arg or D-Arg did not change the level of anxiety in the animals (Fig. 2a and Table 2). Acute treatment with D-NAME also failed to change the behaviour of the rats in the elevated plus maze. Since D-NAME is unable to inhibit NO synthase activity, the anxiolytic effect of L-NAME is likely to be mediated by NO.

This view is supported by the present finding that brain NO synthase activity was decreased in rats treated acutely with L-NAME (Fig. 1a). Brain NO synthase activity was also reduced in vitro when either calcium was lacking or when L-NAME was added to the incubation mixture of the control group, thus showing that the conversion of [³H]-L-arginine to [³H]-L-citrulline by the whole-brain homogenates was due to a calcium-dependent constitutive NO synthase.

Overall, the above results indicate that acute inhibition of constitutive brain NO synthase has an anxiolytic effect in rats in the elevated plus maze. Accordingly, Guimarães et al. (1994) recently reported that microinjection of L-NAME into the dorsal central grey of rats had an anxiolytic effect in the elevated plus maze. Similarly, Volke et

al. (1995) reported that, depending on the dose, acute L-NAME administration caused anxiolysis. At a low dose ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), no effect was observed. This may reflect a lack of brain NO synthase inhibition by L-NAME at low doses (Fig. 1a). In contrast, these authors noticed anxiolysis only with 10 but not with $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of L-NAME. We have no satisfactory explanation for the discrepancy between these results and ours (Fig. 2a) since we did observe anxiolysis once a significant acute brain NO synthase inhibition was reached. Interestingly, acute inhibition of NO synthesis in the mouse counteracts the anxiolysis induced by chlordiazepoxide in the elevated plus maze test, thus suggesting an anxiolytic action for NO (Quock and Nguyen, 1992). Except for the species differences, the reasons for this discrepancy are not clear.

Nitrate and nitrite anions are the NO breakdown products (Vincent, 1994). The reduced serum nitrate levels we now observed in animals chronically treated with L-NAME indicate the effectiveness of this treatment to produce widespread inhibition of NO synthesis. However, the anxiolysis induced by acute treatment with L-NAME was not observed after chronic treatment, even though the animals showed a reduced brain NO synthase activity (Fig. 1b) and a reduction in serum NO_3^- and NO_2^- levels. Although isolation might interfere with the behaviour of a rat in the elevated plus maze test (Vasar et al., 1993), it does not explain the difference observed between acute and chronic treatment with L-NAME, since there was no significant difference in the time both control groups spent in the open arms. Whether animals treated chronically with L-NAME develop tolerance to the anxiolysis induced by NO synthesis inhibition remains to be investigated.

In our laboratory, chronic NO synthesis inhibition by L-NAME administration in the drinking water has been established as an animal model of hypertension (Ribeiro et al., 1992). Nevertheless, anxiolysis induced by acute L-NAME does not seem to be due to mean arterial pressure elevation, since chronic L-NAME administration similarly raised mean arterial pressure values, but failed to change the level of anxiety of the animals (Fig. 2 and Table 1). In addition, two-kidney one-clip hypertension failed to change the behaviour of rats in the elevated plus maze test (Table 3). There is evidence that high blood pressure can be induced by genetic predisposition associated to environmental factors such as salt intake, physical inactivity and psychological stress (Williams et al., 1991). However, the reverse may not be true since the renovascular hypertensive rats displayed the same level of anxiety in the elevated plus maze as did the sham-operated group. Indeed, hypertension per se does not affect the level of fear in spontaneously hypertensive rats submitted to the elevated plus maze test (Rosa et al., 1994).

The presence of constitutive NO synthase has been described in the amygdala (Vincent, 1994) and in the dorsal central grey (Onstott et al., 1993). These areas belong to the so-called brain aversive system which com-

mands defensive behaviour and elaborates aversive emotional and motivational states and has been proposed as a main neural substrate of fear and anxiety (Graeff, 1990; Graeff et al., 1993). Indeed, L-NAME has an anxiolytic effect in rats when microinjected into the dorsal central grey (Guimarães et al., 1994). Since, in the present study, the same drug was administered systemically, we do not yet know what brain structures are involved in the anxiolysis observed following acute L-NAME treatment.

There is increasing evidence that NO is a neuromodulator/neurotransmitter which plays an important role in anxiety in rodents. Whether the finding that the anxiogenic effect of NO, present only in acute studies, indicates that it may not be an important mediator of this phenomenon remains to be further investigated.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Stephen Hyslop for the revision of the manuscript.

References

- Benelli, A., A. Bertolini, R. Poggioli, E. Cavazzuti, L. Calzà, L. Giardino and R. Arletti, 1995. Nitric oxide is involved in male sexual behavior of rats, *Eur. J. Pharmacol.* 294, 505.
- Cruz, A.P.M., F. Frei and F.G. Graeff, 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 171.
- File, S.E., 1992. 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) p. 25.
- Garthwaite, J., S.L. Charles and R. Chess-Williams, 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain, *Nature* 336, 385.
- Goldblatt, H., J. Lynch, R.F. Hanzal and W.W. Summerville, 1934. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia, *J. Exp. Med.* 59, 347.
- Graeff, F.G., 1990. 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.
- Graeff, F.G., M.C.L. Silveira, R.L. Nogueira, E.A. Audi and R.M.W. Oliveira, 1993. Role of the amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic, *Behav. Brain Res.* 58, 123.
- Guimarães, F.S., J.C. De Aguiar, E.A. Del-Bel and G. Ballejo, 1994. Anxiolytic effect of NO synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey, *NeuroReport* 5, 1929.
- Handy, R.L.C., P. Wallace, Z.A. Gaffen, K.J. Whitehead and P.K. Moore, 1995. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the mouse, *Br. J. Pharmacol.* 116, 2349.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology* 92, 180.
- Lister, R.G., 1990. Ethological-based animal models of anxiety disorders, *Pharmacol. Ther.* 46, 321.
- Mayer, M.L. and R.J. Miller, 1990. Excitatory amino acid receptor, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons, *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 254.

- Moncada, S., R.M. Palmer and E.A. Higgs, 1991. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43, 109.
- Moore, P.K., A.O. Oluyomi, R.C. Babbedge, P. Wallace and S.L. Hart, 1991. 1-Nitro-arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse, *Br. J. Pharmacol.* 102, 198.
- Morley, J.E. and J.F. Flood, 1991. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice, *Life Sci.* 49, 707.
- Muscará, M.N. and G. De Nucci, 1996. Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post column reactions, *J. Chromatogr. B* 686, 157.
- Nelson, R.J., G.E. Demas, P.L. Huang, M.C. Fishman, V.L. Dawson, T.M. Dawson and S.H. Snyder, 1995. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase, *Nature* 378, 383.
- Onstott, D., B. Mayer and A. Beitz, 1993. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorso-lateral column within the midbrain periaqueductal grey of the rat: analysis using laser confocal microscopy, *Brain Res.* 610, 317.
- Pellow, S., P. Chopin, S.E. File and M. Briley, 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods* 14, 149.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83, 346.
- Pollock, J.S., U. Förstermann, J.A. Mitchell, T.D. Warner, H.H.W. Schmidt, M. Nakane and F. Murad, 1991. Purification and characterisation of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10480.
- Quock, R.M. and E. Nguyen, 1992. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice, *Life Sci.* 51, PL255.
- Ribeiro, M.O., E. Antunes, G. De Nucci, S.M. Lovisolo and R. Zatz, 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension, *Hypertension* 20, 298.
- Rosa, W.C.M., G.M. Oliveira and E.M. Nakamura-Palacios, 1994. Effects of the antihypertensive drugs α -methyldepa and hydralazine on the performance of spontaneously hypertensive rats in the elevated plus-maze, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 55.
- Schuman, E.M. and D.V. Madison, 1991. A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation, *Science* 254, 1503.
- Snyder, S.H. and D.S. Bredt, 1991. Nitric oxide as a neuronal messenger, *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 125.
- Treit, D., J. Menard and C. Royan, 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 463.
- Vasar, E., E. Peuranen, J. Harro, A. Lang, L. Oreland and P.T. Männist, 1993. Social isolation of rats increases the density of cholecystokinin receptors in the frontal cortex and abolishes the anti-exploratory effect of caerulein, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348, 96.
- Vincent, S.R., 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system, *Prog. Neurobiol.* 42, 129.
- Volke, V., S. Köks, E. Vasar, M. Bourin, J. Bradwejn and P.T. Männistö, 1995. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze, *NeuroReport* 6, 10.
- Williams, R.R., S.C. Hunt, S.J. Hasstedt, P.N. Hopkins, L.L. Wu, T.D. Berry, B.M. Sutlits, G.K. Barlow, M.C. Schumaker, R.P. Lifton and J.M. Lalouel, 1991. Are there interactions and relations between genetic and environmental factors predisposing to high blood pressure?, *Hypertension* 18, 129.
- Zatz, R., 1990. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats, *Lab. Anim. Sci.* 40, 198.
- Zhang, J. and H. Snyder, 1995. Nitric oxide in the nervous system, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 213.