UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

***“Avaliação da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da
ansiedade e da nocicepção em ratos.”***

Priscila Gonçalves de Carvalho-Costa

Ribeirão Preto

2013

PRISCILA GONÇALVES DE CARVALHO-COSTA

*Avaliação da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da
ansiedade e da nocicepção em ratos.*

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto-USP, para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto.

Carvalho-Costa, Priscila Gonçalves.

Avaliação da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade e da nocicepção em ratos. Ribeirão Preto, 2013.

97 p.: il: 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade

1. Heme-oxigenase; 2. Locus coeruleus; 3. Monóxido de Carbono;
4. Comportamento emocional; 5. GMPc.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Gonçalves de Carvalho-Costa

Avaliação da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade e da nocicepção em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Instituição: FORP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Dedico,

*Aos meus pais **Marina e Donizetti** que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.*

*Ao meu esposo **Fabiano**, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a ***Deus***, Aquele que nunca vi ou ouvi, mas sempre esteve ao meu lado, minha gratidão por ter me dado o dom da vida e a possibilidade de concluir mais esta etapa.

A ***Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi***, minha orientadora, por confiar no meu trabalho, me mostrar os caminhos da pesquisa e despertar o desejo de continuar trilhando esse caminho. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar com você.

Ao ***Professor Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza***, pelo acompanhamento do desenvolvimento que resultou no aprimoramento deste trabalho.

Aos ***Professores da Banca***, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

A ***Patrícia Adriana Basile***, pela colaboração e auxílio na obtenção dos resultados deste trabalho.

Agradeço a todos que estiveram presentes na minha trajetória acadêmica: ***Alberto, Ana Paula, Amanda, Bruna, Daniela, Eveline, Glauce, Jeane, Richard e Vinicius***, pela amizade, conselhos e colaborações neste trabalho, cada qual à sua maneira. Em especial, a ***Glauce e Amanda***, que além da amizade incondicional e auxílio, foram meu porto-seguro, por me encorajarem em todos os sentidos.

A ***Renata B. Vicentini***, secretária do Programa de Pós - Graduação em Psicobiologia da FFCLRP - USP, pelo auxílio competente.

Aos funcionários do Biotério I da FORP, ***Aline Aparecida Ferraresi Tibali, Antônio Sérgio Ap. Mesca e Antônio Massaro***, pelo cuidado e tratamento constante dos animais experimentais.

À ***minha família***, pela base sólida que sempre me deu força para encarar a vida de frente. Aos ***meus pais***, que se doaram inteiramente e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Ao ***meu irmão, Caio***, pelo incentivo, força e carinho durante esta caminhada. Aos ***meus avôs***, que mesmo sem estudo sempre me incentivaram. Aos ***meus tios (as) e primos (as)***, pelo carinho e força que me dão. Ao ***meu amor Fabiano***, sem o qual não teria encontrado êxito nesta minha trajetória.

A ***todos*** aqueles que contribuíram com a minha formação profissional, permitindo que eu leve conhecimento àqueles que anseiam por ele.

A ***CAPES*** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ***FAPESP*** pelo auxílio financeiro.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<i>Figura 1:</i>	Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme-oxigenase.	27
<i>Figura 2:</i>	Fotografia do aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).	40
<i>Figura 3:</i>	Fotografia obtida em laboratório da caixa claro-escuro utilizada nos experimentos.	41
<i>Figura 4:</i>	Fotografia de um animal durante a realização do teste de retirada de cauda em laboratório.	42
<i>Figura 5:</i>	Fotografia de um animal durante a realização do teste de formalina.	43
<i>Figura 6:</i>	Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de rato com cânula-guia dirigida para o locus coeruleus após coloração pela técnica de Nissl (cresil violeta).	50
<i>Figura 7:</i>	Efeito da administração intra-LC em ratos do inibidor inespecífico da enzima heme-oxigenase (HO), ZnDPBG (nas doses de 5 nmol, 50 nmol e 200 nmol n = 8, para cada dose) ou de seu veículo (Na ₂ CO ₃ , n = 8) no teste do labirinto em cruz elevado.	53
<i>Figura 8:</i>	Efeito da administração intra-LC em ratos do substrato da enzima heme-oxigenase (HO), Heme-lisinato (nas doses de 150 nmol, 300 nmol e 600 nmol, n = 8, para cada dose) ou de seu veículo (L-lisina n = 8) no teste do labirinto em cruz elevado.	54
<i>Figura 9:</i>	Efeito da administração intra-LC em ratos do substrato da enzima heme-oxigenase Heme-lisinato (Heme, 600 nmol) ou do veículo, L-lisina, precedido pelo inibidor específico da GMPc, ODQ (1,3 nmol) ou o veículo (DMSO 1%), n = 8, para cada grupo no teste do labirinto em cruz elevado.	55
<i>Figura 10:</i>	Efeito da administração intra-LC do ZnDPBG (5, 50 e 200 nmol/0,1 µl, inibidor inespecífico da enzima HO, n = 8 para cada dose) ou de seu veículo, Na ₂ CO ₃ (50 mmol/0,1 µl, n = 8) no teste claro-escuro (TCE) em ratos.	59
<i>Figura 11:</i>	Efeito da administração intra-LC de Heme-lisinato (150, 300 e 600 nmol/0,1 µl, substrato da enzima HO, n = 8 para cada dose) ou de seu veículo, L-lisina (14,2 µmol/0,1 µl, n = 8) no teste claro-escuro (TCE) em ratos.	60

- Figura 12:** Efeito da administração i.c.v. do inibidor específico da enzima GMPC, ou de seu veículo (DMSO 1%) seguida pela administração intra-LC de Heme-lisinato (dose de 600 nmol/0,1 µl, n = 8 para cada grupo experimental) no teste claro-escuro (TCE) em ratos. 61
- Figura 13:** Índice de Analgesia no teste de retirada de cauda em ratos (IARC). A: Efeito da administração intra-LC do ZnDPBG (5, 50 e 200 nmol/0,1 µl, inibidor inespecífico da enzima HO, n = 8 para cada dose) ou de seu veículo, Na₂CO₃ (50 mmol/0,1 µl, n = 8). B: Efeito da administração intra-LC do substrato da enzima HO, Heme-lisinato, nas doses de 150 nmol/0,1 µL, 300 nmol/0,1 µL ou 600 nmol/0,1 µL (n = 8 para cada dose) ou do veículo L-lisina (14,2 µmol/0,1 µL, n = 8). 64
- Figura 14:** Índice de Analgesia no teste de retirada de cauda em ratos (IARC). A: Efeito da administração i.c.v. do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ, 1,3 nmol/L, n = 8) ou do veículo (DMSO 1%, n = 8) seguido pelo tratamento intra-LC com L-lisina (14,2 µmol/L). B: Efeito da administração i.c.v. do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ, 1,3 nmol/L, n = 8) ou do veículo (DMSO 1%, n = 8) seguido pelo tratamento intra-LC com Heme-lisinato (600 nmol/0,1 µL). 65
- Figura 15:** Efeito da administração intra-LC de ZnDPBG (inibidor inespecífico da enzima HO), nas doses de 5 nmol/0,1µl (n = 7), 50 nmol/0,1µl (n = 7) e 200 nmol/0,1µl (n = 7), ou do veículo (Na₂CO₃/50 mmol/0,1µl, n = 8) nos comportamentos nociceptivos de sacudidas (A) ou lambidas (B) avaliados nas fases 1 e 2 do teste de formalina em ratos. 68
- Figura 16:** Efeito da administração intra-LC de Heme-lisinato (substrato da enzima HO), nas doses de 150 nmol/0,1µl (n = 8), 150 nmol/0,1µl (n = 8) e 600 nmol/0,1µl (n = 8), ou do veículo (L-lisina, 14,2 µmol/0,1 µl, n = 8) nos comportamentos nociceptivos de sacudidas (A) ou lambidas (B) avaliados nas fases 1 e 2 do teste de formalina em ratos. 69
- Figura 17:** Efeito da administração i.c.v. do inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol/0,1µl, n = 8), ou do veículo DMSO 1% seguido pela administração intra-LC de Heme-lisinato (600 nmol/0,1µl, n = 8), ou do veículo (L-lisina, 14,2 µmol/0,1 µl, n = 8) nos comportamentos nociceptivos de sacudidas (A) ou lambidas (B) avaliados nas fases 1 e 2 do teste de formalina em ratos. 70

<i>Tabela 1:</i>	Avaliação de diferentes categorias comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam administração do inibidor inespecífico da enzima heme-oxigenase (ZnDPBG) em três doses distintas (5 nmol, 50 nmol, 200 nmol) ou do veículo Na ₂ CO ₃ no locus coeruleus.	56
<i>Tabela 2:</i>	Avaliação de diferentes categorias comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam administração do substrato da enzima heme-oxigenase (Heme-lisinato) em três doses distintas (150 nmol, 300 nmol, 600 nmol) ou do veículo L-lisina.	56
<i>Tabela 3:</i>	Avaliação de diferentes categorias comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam administração do substrato da enzima heme-oxigenase Heme-lisinato (Heme, 600 nmol) ou do veículo, L-lisina, precedido pelo inibidor específico da GMPc, ODQ (1,3 nmol) ou o veículo (DMSO 1%).	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AMPc	Adenosina 3'5' monofosfato cíclico
Aδ	Fibras A-delta
BA	Braços abertos
BF	Braços fechados
Ca⁺²	Íon cálcio
CDME	Corno dorsal da medula espinal
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CO	Monóxido de carbono
CRF	Fator liberador de corticotropina
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EPM	Erro Padrão da Média
Fe⁺²	Íon ferroso
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GCs	Guanilase ciclase solúvel
GMPc	Guanosina 3'5' monofosfato cíclico intracelular
GTP	Guanosina 5' trifosfato
HBO₂	Oxigênio hiperbárico
HO	Heme-oxigenase
HO-1	Heme-oxigenase 1
HO-2	Heme-oxigenase 2
HO-3	Heme-oxigenase 3
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
IARC	Índice de antinocicepção de retirada de cauda
IASP	Associação Internacional para o estudo da dor
LB	Linha de base
LC	Locus coeruleus
LCE	Labirinto em cruz elevado
L-NAME	N ^ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
L-NOARG	L-N ^G -nitro arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
ME	Medula espinal
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NENT	Núcleo espinal do nervo trigêmio
NMDA	N-metil D-Aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NPLA	Nω-propil-L-arginina
O₂	Oxigênio
ODQ	1h- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3-A] Quinoxaline-1-One
PE	Polietileno
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SCA	Sistema cerebral aversivo
SCP	Substância cinzenta periaqueductal
SIC	Sistema de inibição comportamental
SIN-1	3-morpholinosydnonimine
SNC	Sistema nervoso central
Sn-P	Sodium nitroprusside dihydrate
TBA	Tempo nos braços abertos
TBF	Tempo nos braços fechados
TCE	Teste claro-escuro
TRC	Teste de retirada de cauda
VL	Ventrículo lateral
ZnDPBG	Zinco-Deuteroporphyrin-2,4-Bis Glicol
4V	4° ventrículo
7-NI	7-Nitroindazole

RESUMO

CARVALHO-COSTA, P.G. *Avaliação da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade e da nocicepção em ratos*. 2013. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP - Ribeirão Preto, 2013.

O gás composto monóxido de carbono (CO), está envolvido na modulação de diferentes funções orgânicas, tais como a regulação cardiovascular, a temperatura corporal e a nocicepção. A participação do CO nos processos fisiológicos ocorre por meio da atividade da enzima heme-oxigenase (HO), e seu produto CO, o qual por sua vez aumenta a produção de guanosina monofosfato cíclico intracelular (GMPc). De particular interesse, o locus coeruleus possui elevada expressão da enzima HO-2 sugerindo o envolvimento do gasotransmissor CO na modulação das funções executadas por esta estrutura encefálica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento da via HO-CO do LC na modulação da ansiedade, avaliada pelo teste de labirinto em cruz elevado e teste claro-escuro; nocicepção aguda, avaliada pelo teste de retirada de cauda e a nocicepção inflamatória, avaliada pelo teste de formalina em ratos. Para atingir estes objetivos, ratos ($\pm$ 250grs; Wistar) foram anestesiados (ketamina 75 mg/kg e xilasina 10 mg/kg i.m.) e submetidos à cirurgia estereotóxica para implante unilateral de cânulas-guias direcionadas para o LC, e para o ventrículo lateral. Após o período de recuperação, os ratos foram divididos em distintos grupos experimentais para administração intra-LC do ZnDPBG (inibidor inespecífico da enzima HO, nas doses 5,50 ou 200 nmol/0,1 μ l) ou seu veículo, Na₂CO₃ (50 mmol/0,1 μ l); do Heme-lisinato (150, 300 ou 600 nmol/0,1 μ l) ou seu veículo, L-lisina (14,2 μ mol/0,1 μ l); do ODQ i.c.v. (inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel, 1,3 nmol/1,0 μ l) ou seu veículo (DMSO 1%, 1,0 μ l) e após 15 min o Heme-lisinato (600 nmol/0,1 μ l) ou seu veículo (L-lisina, 14,2 μ mol/0,1 μ l), intra-LC. Após o tempo de 15 min, os ratos foram avaliados no teste de LCE ou no TCE por 5 minutos, no teste de retirada de cauda por 120 minutos e no teste de formalina intra-podal por 45 minutos. Os resultados obtidos mostram que o aumento da produção do neuromodulador gasoso CO no LC, pela ativação da via HO-CO-GMPc com Heme-lisinato, promove efeito ansiolítico avaliado no teste do LCE e no TCE, evidenciado pelo aumento do tempo de permanência e pelo aumento do número de entradas nos braços abertos do LCE, e pelo aumento tempo de permanência no compartimento claro do TCE. Este efeito ansiolítico é dependente da atividade de GMPc intracelular, desde que o tratamento i.c.v. com inibidor específico da enzima GCs bloqueou os efeitos do Heme-lisinato no LCE e no TCE. Ainda, a ativação da via HO-CO-GMPc por meio da administração intra-LC do Heme-lisinato promoveu efeito antinociceptivo frente estímulo térmico agudo (teste de retirada de cauda em ratos), sendo este efeito dependente da atividade do GMPc, desde que o pré-tratamento

com o inibidor da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ, bloqueou o aumento do IARC. O bloqueio da via HO-CO promove efeito hipernociceptivo em modelo de dor inflamatória, desde que o tratamento intra-LC com inibidor inespecífico da HO, ZnDPBG aumenta o número de sacudidas no teste de formalina intra-podal. Assim, este estudo é pioneiro em demonstrar que o neuromodulador CO do LC modula a ansiedade e a nocicepção aguda térmica e inflamatória.

Palavras Chaves: Heme-oxigenase; Locus coeruleus; Monóxido de Carbono; Comportamento emocional; GMPc.

ABSTRACT

CARVALHO-COSTA, P.G. *Evaluation of HO-CO-cGMP pathway activation of the locus coeruleus in the modulation of anxiety and nociception in rats*. 97 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP - Ribeirão Preto, 2013.

The gas composed carbon monoxide (CO) is involved in the modulation of various physiological functions such as cardiovascular regulation, nociception and body temperature. CO participation in physiological processes occurs through the activity of the enzyme heme oxygenase (HO), and its product CO, which in turn increases the production of intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP). In particular interest, the locus coeruleus (LC) has a high HO-2 enzyme expression suggesting the involvement of CO in the modulation of the functions performed by this brain structure. The aim of this study was to evaluate the involvement of HO-CO pathway of LC in modulating anxiety, assessed by elevated plus maze test and light-dark box test. Additionally, acute nociception, as assessed by the tail flick test and inflammatory nociception, as assessed by formalin test in rats were analyzed after HO-CO pathway activation. Rats (± 250 grs; Wistar) were anesthetized (ketamine 75 mg/kg and xylazine 10 mg/kg im) and underwent stereotactic surgery for cannulas guides unilateral implantation directed to the LC, and to the lateral ventricle. After the recovery period, rats were divided into distinct experimental groups for intra-LC ZnDPBG (nonspecific enzyme inhibitor HO doses 5, 50 or 200 nmol/0.1 μ l) or its vehicle, Na₂CO₃ (50 mmol/0.1 μ l); Heme-lysinate (150, 300 or 600 nmol/0.1 μ l) or its vehicle, L-lysine (14.2 nmol/0.1 μ l), the ODQ i.c.v. (specific inhibitor of the enzyme guanylate cyclase soluble, 1.3 nmol/1.0 μ l) or its vehicle (1% DMSO, 1.0 μ l) and after 15 min the Heme-lysinate (600 nmol/0.1 μ l), or its vehicle (L-lysine, 14.2 mmol/0.1 μ l), intra-LC. After time 15 min, rats were evaluated in the EPM test or LDB for 5 minutes and in the tail flick test for 120 minutes and in the formalin test for 45 minutes. The results show that CO increased production in LC, by HO-CO-cGMP pathway activation, promotes anxiolytic effect evaluated in the EPM test and LDB. The anxiolytic effect is dependent on the activity of intracellular cGMP, since treatment i.c.v. with enzyme sGC inhibitor blocked the effects of Heme-lysinate. Moreover, the activation of the HO-CO-cGMP pathway into the LC promoted antinociceptive effect in the tail flick test, this effect being dependent on the activity of cGMP, since pre-treatment with the guanylate cyclase soluble inhibitor, ODQ, blocked the increase in analgesic index. Furthermore, the block of the HO-CO pathway intra-LC promoted hypernociception in a model of inflammatory pain, since treatment with nonspecific inhibitor HO, ZnDPBG, increases the nociceptive behavior in the formalin test. Thus, this study is the first to demonstrate that the CO neuromodulator into LC modulates anxiety and acute thermal and inflammatory nociception.

Keywords: Heme-oxygenase; Locus coeruleus; Carbon Monoxide; Emotional behavior; cGMP.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	18
1. Medo e Ansiedade.....	19
2. Sensibilidade Nociceptiva e sua modulação.....	22
3. Sistema Heme Oxigenase e o neuromodulador CO.....	26
4. Locus Coeruleus.....	31
II. OBJETIVOS	34
III. MATERIAIS E MÉTODOS	36
1. Animais.....	37
2. Cirurgia.....	37
3. Fármacos e Microinjeções	38
4. Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE).....	39
5. Teste claro-escuro (TCE).....	40
6. Teste de retirada de cauda (TRC).....	41
7. Teste de Formalina.....	42
8. Protocolos experimentais.....	43
9. Histologia ..	47
10. Análise dos resultados.....	47
IV. RESULTADOS.....	49
1. Avaliação do efeito da atividade da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste do labirinto em cruz elevado em ratos.....	51
2. Avaliação do efeito da atividade da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste claro-escuro em ratos	58
3. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos	62
4. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção inflamatória avaliada pelo teste de formalina em ratos.....	66
V. DISCUSSÃO	71
VI. CONCLUSÃO.....	80
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Medo e Ansiedade

O medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e suas origens são correlacionadas com as reações de defesa que os animais exibem em respostas a situações de ameaça, as quais podem comprometer sua integridade física ou a sobrevivência. Do ponto de vista histórico, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade se inicia nos relatos de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem. Seus trabalhos na segunda metade do século XIX indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem, seguido pelos estudos clássicos de Cannon, Bard e Papez no início do século XX (Darwin, 1872; Brandão e cols., 2003). Nesta perspectiva, a ansiedade e o medo compõem o primeiro sistema de defesa corporal contra um estímulo ameaçador ou de perigo iminente (Gray, 1982; Graeff, 1990). Alguns autores têm considerado estas emoções como estados de humor indistinguíveis (Julou e cols., 1985), enquanto outros, consideram medo e ansiedade fenômenos distintos (Applebaum, 1992). Este assunto tem sido pauta de discussões, pois embora esses dois estados emocionais sejam correlatos, a diferenciação pode ser realizada considerando os estímulos e/ou situações que os desencadeiam. Assim, o medo surgiria diante de situações evidentes de ameaça e perigo, enquanto que a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (Blanchard e cols., 2003). Além disso, de acordo com Gray e McNaughton (2000), existe ansiedade quando ocorre tendência de aproximação a uma fonte de perigo. Quando somente componentes de fuga ou de esquiva são expressos, existe o medo. De fato, dados farmacológicos mostram que as respostas de esquiva e de fuga são resistentes a agentes ansiolíticos, ao contrário das respostas comportamentais de avaliação de risco ou daquelas observadas em decorrência da apresentação de estímulos condicionados que sinalizam punição (Blanchard e cols., 2003; Gray & McNaughton, 2000). De acordo com estes estudos, a ansiedade é a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco evocado em situações em que o perigo é incerto (ameaça potencial), distal ou proximal. Em contraste, o medo ocorre quando o perigo ou a situação ameaçadora é conhecida.

Considerando a emissão de comportamentos de defesa, pode-se descrever distintas estratégias, não apenas considerando o grau de ameaça de cada situação, mas também de acordo com a distância existente do estímulo ameaçador (Ratner, 1967; Blanchard & Blanchard, 1988). Desta forma, no primeiro nível, quando o perigo é incerto, as estratégias observadas são comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, usando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e investigação da possível ameaça denominadas de comportamento de avaliação de risco. O segundo nível de defesa (perigo distal) está associado aos comportamentos de fuga e congelamento, onde o animal tenta escapar da situação de

confronto com o predador, caso exista uma rota de saída no ambiente, ou permanece imóvel, em congelamento, caso a fuga não seja viável e/ou o predador mantenha ainda certa distância. Finalmente, no caso em que o predador (ou estímulo ameaçador) está muito próximo ou em contato direto com o animal, os comportamentos observados são tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou luta defensiva (postura de ameaça e mordidas no predador) (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard, 1997; Graeff, 2007). Ainda, no caso de contato prolongado com predador e situação inescapável a presa pode emitir o comportamento de imobilidade tônica (Klemm, 2001). Charles Darwin, em seu livro “A expressão de emoções no homem e animais” já postulava uma relação direta entre a emissão de comportamentos defensivos em animais e seres humanos e as emoções de medo, pânico e raiva. Do ponto de vista filogenético, à medida que mamíferos foram submetidos a constantes desafios de sobrevivência, o sistema nervoso central, 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 foi percebida, de forma introspectiva, como emoções básicas tais como medo, raiva e pânico (Panksepp, 1982). Ao longo da evolução esses mesmos circuitos 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 encefálicos responsáveis pela elaboração de estados motivacionais de medo, além da coordenação de padrões de comportamentos defensivos tais como: congelamento, fuga e defesa afetiva, representada por posturas ameaçadoras, vocalizações e eventualmente ataques, quando a fuga do perigo não for possível (Fanselow, 1991). 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 em nível psicológico, comportamental e fisiológico (Graeff e cols., 1993).

Nas últimas décadas ocorreu um progresso significativo no conhecimento das estruturas e sistemas neuronais anatômicos relacionados com os estados de medo e ansiedade. A descoberta das estruturas encefálicas relacionadas com a ansiedade humana deriva da somatória de conhecimento obtida por observações de indivíduos com lesão encefálica, manipulação de pacientes submetidos à neurocirurgia, estudos de neuroimagem e resultados com animais de laboratório (Graeff & Hetem, 2004). Ressalta-se que embora modelos animais possam não contribuir para o entendimento das bases neurais do componente subjetivo da ansiedade, permitem identificar as estruturas e vias neurais envolvidas nos mecanismos de modulação e emissão de respostas emocionais.

Assim, com base em estudos que utilizaram animais de laboratório, foram elaboradas duas proposições teóricas, na tentativa de ordenar os dados disponíveis sobre bases neuroanatômicas dos componentes de defesa. A primeira é o Sistema de Inibição Comportamental (SIC). O principal substrato

neural deste sistema seria representado pelo septo e pelo hipocampo (sistema septo-hipocampal), os quais recebem aferências noradrenérgicas provenientes do locus coeruleus. O sistema de inibição comportamental responde a eventos punitivos, estímulos novos e frustração condicionada por meio da supressão do comportamento operante mantido por recompensa ou então, pela esquiva da punição (Brandão e cols., 2003; Canteras, 2003). Em adição, outras estruturas límbicas tais como o córtex pré-frontal, tálamo e corpos mamilares, atuam em conjunto com o sistema septo-hipocampal. Ao SIC, acrescenta-se ainda a amígdala como estrutura responsável pela avaliação do componente afetivo em situações de conflito (Graeff & Zangrossi, 2002; Graeff, 2003). A propósito, Gray & McNaughton (2000) sugeriram que a função principal do SIC é de detectar o conflito. Esta formulação é importante para se distinguir medo e ansiedade. No medo, não há tendência de aproximação da fonte de perigo, mas somente a de afastar dela ou evitá-la. Um segundo sistema de modulação das respostas emocionais é descrito tendo como eixo a substância cinzenta periaquedutal (SCP), o hipotálamo e a amígdala, denominado de Sistema Cerebral Aversivo (SCA) (Graeff, 2003). De fato, estudos pioneiros mostraram que a estimulação elétrica ou química dessas estruturas evocava padrões comportamentais defensivos espécie-específicos e, comportamentos sugestivos de experiência aversiva prévia (Olds & Olds, 1962). Além destas estruturas, há evidências de que o colículo superior (processador de informações visuais), assim como o colículo inferior (aferências das vias auditivas que se projetam para o tálamo e córtex temporal) integrem o SCA (Brandão e cols., 2003). Embora os componentes neurais do SCA trabalhem conjuntamente para gerar estratégias defensivas, estas estruturas podem exercer diferentes funções. Neste ponto, Fanselow (1991) tem sugerido que a amígdala sintetiza estímulos provenientes do meio ambiente, e então sinaliza a substância cinzenta periaquedutal o grau de ameaça que ele representa ao organismo. Esta, por sua vez, selecionaria, organizaria e executaria o comportamento apropriado e as reações defensivas neurovegetativas (Graeff, 2002).

As últimas décadas têm assistido ao crescente interesse pelo desenvolvimento e utilização de modelos animais visando o entendimento da neurobiologia dos estados emocionais de medo e ansiedade. As diferentes estratégias comportamentais defensivas (ex. fuga, esquiva, avaliação de risco e outras) adotadas pelos animais de laboratório (principalmente roedores) diante de condições ou situações aversivas, proporcionadas por diferentes tipos de modelos animais de ansiedade, têm sido relacionadas aos estados de medo/ansiedade (Blanchard e cols., 2001; Graeff & Zangrossi, 2002). Considerando a metodologia utilizada para o estudo das respostas relacionadas com medo e ansiedade, Montgomery, na década de 50, estudou o comportamento exploratório de ratos em labirintos “Y”. Estes possuíam diferentes tipos de braços, totalmente abertos, enquanto outros eram circundados por paredes (braços fechados). Através desta metodologia, Montgomery verificou que durante a exploração do labirinto, os animais exibiam preferência pelos braços fechados em relação aos abertos. Desse modo, quando o animal era colocado no labirinto (ambiente não-familiar), instalava-se uma situação de conflito interno, caracterizada por atividade

exploratória, motivada talvez por curiosidade ao ambiente novo, associada à esquiva ou evitação da exploração, motivada por medo (Montgomery, 1955). Esse conflito interno tem sido considerado análogo à ansiedade, a principal fonte de motivação aversiva (Cruz e cols., 1997). Já na década de 80, Handley & Mithani (1984) acrescentaram um quarto braço ao labirinto, tornando-o simétrico, em forma de cruz ou “x”, com dimensões equivalentes e tendo dois braços abertos e dois fechados. Assim, a exposição forçada de ratos aos braços abertos evoca maior ocorrência de comportamentos relacionados com medo/ansiedade tais como congelamento e defecação/micção. Os animais também permanecem menos tempo e entram com menor frequência nos braços abertos em comparação aos braços fechados (Pellow e cols., 1985). 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 (ou aversivos), em relação aos braços fechados (Pellow e cols., 1985). Análise fatorial do comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado 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 correlacionam-se 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 (Hogg, 1996; Dawson & Tricklebank, 1995; Handley & McBlane, 1993). Em adição, Miguel e Nunes-de-Souza (2006) mostraram que injeções de NPLA (N^ω-propil-L-arginina), inibidor da isoforma neuronal (nNOS), não foram eficazes em exibir o perfil ansiolítico em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Contudo, este mesmo composto em doses semelhantes reverteu os efeitos pró-aversivos da ativação glutamatérgica.

Em resumo, o 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 e cols., 1985). Esse modelo tem sido revisado frequentemente quanto à sua validação para o estudo da ação de drogas ansiolíticas.

2. Sensibilidade Nociceptiva e sua modulação

Antigamente acreditava-se que a dor fosse uma punição dos deuses, demônios e espíritos. A palavra dor, derivada do Latim *peone* e do Grego *poine*, significa penalidade ou punição. Aristóteles a considerava como um sentimento, e a classificou como uma paixão, onde o coração é a fonte ou centro de seu

processamento. A idéia do coração como centro das sensações perdurou por muitos séculos e recebeu apoio de importantes pensadores. Por outro lado, também foi grande o número dos que defenderam a idéia do cérebro como centro das sensações. Estudos anatômicos e fisiológicos realizados por Descartes evidenciaram a existência de nervos capazes de receber informações sensoriais desde a periferia e levá-las até o cérebro (Stimmel, 1983; Melzack & Wall, 1965; 1991; Baumann & Strickland, 2008).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), podemos definir a dor como *“uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou ainda descrita em termos de tal lesão”* (Merskey, 1986). Desta forma, a dor é uma experiência complexa, a qual não envolve somente a transdução de estímulos nocivos advindos do ambiente, mas principalmente seu processamento cognitivo emocional, realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (Julius & Basbaum, 2001). Desse modo, existem mecanismos modulatórios atuando em diferentes regiões do SNC, desde as terminações nervosas livres que recebem os estímulos nociceptivos, o corno dorsal da medula espinal e estruturas supraespinais (Millan, 1999).

Os primeiros indícios sobre receptores especializados em captar estímulos nociceptivos foram descritos por Sherrington em 1906, onde propôs a existência de nociceptores (receptores para estímulos nocivos), localizados em fibras aferentes primárias, os quais são ativados por estímulos capazes de provocar lesão tecidual (Julius & Basbaum, 2001). Essas fibras aferentes respondem a modalidades de estímulos diferentes (nociceptores polimodais), e estímulos com propriedades específicas (estímulos térmicos e mecânicos) (Meyer e cols., 2006; Ashton, 2012). São encontradas tanto em estruturas somáticas (osso, pele, tecido conjuntivo e músculo) como em estruturas viscerais (pâncreas, intestino entre outras) (Baumann & Strickland, 2008). Existem dois tipos de fibras aferentes responsáveis por conduzir a informação dolorosa: as fibras A-delta ($A\delta$), que são mielinizadas e, portanto, de maior calibre (2-6 μm de diâmetro), responsáveis pela condução rápida da dor (5-30 m/s) e as fibras C, que são amielinizadas, de menor calibre (0,4-1,2 μm de diâmetro) e responsáveis pela condução lenta da dor (menor que 2 m/s). A ativação das fibras $A\delta$ provoca sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, enquanto que a ativação das fibras C promove sensação de queimação e sem localização precisa.

Considerando a via de transmissão nociceptiva, os impulsos nociceptivos gerados periféricamente são direcionados pelos aferentes primários até as regiões da substância cinzenta da medula espinal, a qual pode ser dividida em 10 lâminas de acordo com características citoarquitetônicas. As lâminas I (camada marginal), II (substância gelatinosa), III e IV (núcleo próprio), V e VI (camadas profundas) compõem o corno dorsal. A lâmina VII corresponde à substância cinzenta intermediária, as VIII e IX respectivamente, ao corno ventral medial e lateral, enquanto que a X circunda o canal central. É principalmente nas lâminas I, II, V, VI e X que se encontram os aferentes secundários envolvidos na recepção, processamento e retransmissão da informação nociceptiva (Millan, 1999; Lent, 2001). A comunicação entre os aferentes

primários e secundários ocorre por meio de uma diversidade de substâncias envolvidas na transmissão central e modulação da informação nociceptiva, dentre eles, os aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato e neuropeptídeos, como a substância P (Teixeira, 2006; Todd & Koerber, 2006).

A neuroanatomia e organização dessas vias ascendentes da dor são altamente complexas. Os feixes ascendentes formam dois sistemas filogeneticamente diferentes. O primeiro atravessa a região média do tronco encefálico sendo formado pelos feixes: espinotalâmico, espinorreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquio-amidalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico, espino-hipotalâmico e neoespinotalâmico. Essas vias projetam-se diretamente para estruturas encefálicas e estão relacionadas com a transmissão da dor rápida ou aguda, possuem poucas sinapses e dirigem-se para o córtex somatossensorial primário. O segundo sistema ocupa a região lateral do tronco cerebral e consiste no conjunto dos tratos paleoespinotalâmico, espinocervical e feixe pós-sináptico do corno dorsal. Estas são vias que possuem várias estações relés em estruturas bulbares, pontinas e mesencefálicas antes de alcançar estruturas prosencefálicas (Almeida e cols., 2004; Dostrovsky & Craig, 2006).

Dependendo de suas características, a dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor crônica caracteriza-se por ser persistente, e sua duração ultrapassa o período de recuperação do dano causado e/ou da injúria no nervo. Pode ser espontânea (não é eliciada por estímulos externos), provocada com presença de hiperalgesia (aumento da dor, o qual é desencadeada por estímulos nocivos de baixa intensidade) e/ou de alodinia (dor eliciada por estímulos não nocivos). A dor crônica não possui papel fisiológico evidente, ou seja, não tem valor adaptativo. Ao contrário da crônica, a dor aguda possui a função de proteger o organismo contra influências externas danosas, através da ativação fásica de nociceptores por estímulos nocivos. Deste modo, evoca respostas protetoras, como reação de fuga e/ou retirada motora para que cesse a exposição ao estímulo nocivo, e assim, eliminando-a (Millan, 1999; Meintjes, 2012).

Em meados da década de 80, Bolles & Fanselow (1980) propuseram um circuito neural onde os sistemas motivacionais de dor e de medo seriam independentes, mas que interagem entre si. O modelo, chamado perceptivo-defensivo-recuperativo, sugere que o sistema motivacional de dor, ativado pelos estímulos nociceptivos, deflagre respostas imediatas de retirada e comportamentos recuperativos (repouso e outros cuidados com o corpo). O medo, em contrapartida, ativa comportamentos espécie-específicos de defesa dirigida, freqüentemente, para a fuga. Ainda, o medo, pode inibir o sistema motivacional de dor para que não interfira no sucesso da fuga, quando respostas de defesa forem solicitadas. De fato, um importante componente da resposta do organismo frente a situações de emergência é a redução da capacidade de perceber estímulos dolorosos. Vários estudos têm mostrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por diferentes estímulos nociceptivos, exercendo importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (Fanselow, 1991; Fardin e cols., 1984). Também o medo, induzido por estímulos aversivos condicionados e incondicionados, é capaz de inibir respostas comportamentais de dor (Leite-

Panissi e cols., 2001; Cornélio & Nunes-de-Souza, 2009; Castilho e cols., 2002). Deste modo, a antinocicepção tem sido considerada parte das reações do sistema defensivo (Fanselow & Bolles, 1980). Sem a existência de um sistema de inibição dos impulsos nociceptivos, os animais, se levados em confronto com um predador, poderiam adquirir comportamentos de recuperação, induzidos pelo sofrimento, em vez de apresentarem postura defensiva, induzida pelo medo, traduzindo, assim, sua vulnerabilidade a futuras injúrias e levando à morte (Fanselow & Bolles, 1980). Correlacionando a importância da percepção dolorosa para os animais de maneira geral, é fato que a exposição de animais a situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida resulta em exibição de um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e em inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie (Deakin & Graeff, 1991).

Segundo Basbaum & Fields (1978), a antinocicepção pode ser definida como redução na resposta do sistema sensorial para os estímulos nocivos. A sensação nociceptiva e os aspectos das respostas comportamentais da dor dependem do processamento neural de estímulos nocivos por estruturas encefálicas. Assim, no corno dorsal da medula espinal a informação nociceptiva de vísceras, pele e outros órgãos, passa por diversos mecanismos de processamento, alguns dos quais aumentam e outros inibem essa transferência de informação sensorial para outras estruturas do sistema nervoso central (SNC). Neste aspecto, uma rede de vias descendentes projeta-se de estruturas encefálicas a sítios espinais para desempenhar papel complexo e crucial (Casey, 1999). Desta forma, a transmissão nociceptiva da medula espinal ou do núcleo espinal do trigêmeo é regulada por neurônios descendentes originados de diversas redes neurais encefálicas. Os corpos neuronais das fibras que formam esse sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (SCP), o núcleo magno da rafe, a formação reticular mesencefálica, o núcleo dorsal da rafe (Prado & Faganello, 2000), o núcleo reticular paragigantocelular, o locus coeruleus, o bulbo ventromedial rostral, a amígdala, o hipotálamo, o tálamo, o córtex somatossensorial e vários outros componentes do sistema límbico (Willis & Westlund, 1997). Estes sítios compreendem um sistema interconectado anatômica e fisiologicamente que medeia respostas antinociceptivas por meio de interações regionais (Bodnar, 2000).

Além do sistema inibitório descendente da dor, nos últimos anos crescem as evidências que demonstram a existência de um sistema facilitatório da nocicepção. Portanto, o sistema modulador parece exercer um controle bidirecional, de modo que essa via é prontamente recrutada para suprimir respostas a estímulos nociceptivos em circunstâncias caracterizadas por ameaça de injúria ou de extremo estresse (Bolles & Fanselow, 1980), mas também contribui para aumentar a resposta nociceptiva em uma variedade de condições, incluindo a estimulação nociva prolongada, inflamação e injúria de nervos. Na verdade, muitas das vezes são as mesmas estruturas que estão envolvidas na modulação facilitatória e inibitória da dor (Heinricher & Ingram, 2008). Algumas dessas vias são tonicamente ativas, mas o balanço entre a inibição e

facilitação é dinâmico, e pode ser alterado em diferentes estados comportamentais, emocionais e patológicos. Esse sistema de modulação recebe impulsos diretos e indiretos de vias envolvidas com a transmissão nociceptiva, conecta-se com o hipotálamo e estruturas límbicas, incluindo amígdala, córtex cingulado anterior e insula anterior e propicia um mecanismo, através do qual, fatores mais relevantes, como medo, atenção e expectativa podem regular o processamento da dor (Fields e cols., 2006; Prado & Faganello, 2000).

O estudo dos neurotransmissores envolvidos na mediação de processos nociceptivos e antinociceptivos tem despertado o interesse de muitos neurocientistas, sendo intensiva a investigação dos pontos do neuroeixo em que a percepção da dor pode ser eficientemente modulada. Nos últimos anos têm-se acumulado evidências sugestivas da ação de opióides em determinados sítios do sistema nervoso periférico e central (Cartens e cols., 1987; Beitz e cols., 1987; Nichols e cols., 1989), bem como da serotonina (Beitz e cols., 1986), e do GABA (DePaulis e cols., 1987).

Fisiologicamente, a dor é iniciada pela geração de potenciais de ação de receptores especializados de fibras que inervam os diferentes tecidos periféricos. Estes potenciais de ação são conduzidos pelos neurônios aferentes primários, os quais utilizam como neurotransmissores principalmente, a substância P e o glutamato. Especificamente, o maior efeito facilitatório para a nocicepção neste caso, é exercido pelo glutamato, o qual atuando, em particular, em receptores ionotrópicos do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA) promove elevação intraneuronal de Ca^{+2} , resultando em estimulação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e produzindo óxido nítrico (Barreto & Correia, 2005; Filho & Zilberstein, 2000). O óxido nítrico (NO), por sua vez, tem sido considerado um neuromodulador de diferentes funções fisiológicas, tendo como mecanismo de atuação a ativação da enzima guanilase ciclase e aumento da formação de guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMPc) intracelular (Riedel & Neeck, 2001). Dentro desta perspectiva, vários trabalhos têm abordado a participação do gás NO na modulação nociceptiva e antinociceptiva (Brito e cols., 2006; Sachs e cols., 2004; Pol, 2007). De fato, o NO tem sido implicado no desenvolvimento da hiperexcitabilidade celular, resultando em hiperalgesia ou alodinia, promovendo aumento dos neurotransmissores nociceptivos nos terminais neuronais (Riedel & Neeck, 2001). Além do NO, evidências tem dado apoio ao envolvimento do gás composto monóxido de carbono (CO) na modulação de diferentes funções fisiológicas (Maines, 1992; Fan e cols., 2011).

3. Sistema Heme Oxigenase e o neuromodulador CO

A primeira descrição da enzima heme-oxigenase foi em 1968, quando Tenhunen e colaboradores descobriram sua existência ao estudar os mecanismos envolvidos no catabolismo do grupo heme (Tenhunen e cols., 1968).

O grupamento heme consiste de um anel porfirínico com um átomo de ferro (Fe^{+2}) quelado em seu centro pela enzima ferroquelatase e pode ser denominada ferroprotoporfirina, protoheme, heme b ou simplesmente heme (Maines, 1992; Marks, 1991; Schweitzer e cols., 1997). Os níveis tissulares da heme são regulados por duas enzimas: a δ -aminolevulinato sintase responsável pela sua biossíntese e a heme-oxigenase (HO) enzima responsável pelo catabolismo do grupamento heme (Maines, 1992). Este grupamento heme é de importância vital nos sistemas fisiológicos formando a unidade catalítica de várias proteínas (hemeproteínas) que são essenciais ao transporte de oxigênio (hemoglobina), estoque de oxigênio (mioglobina), respiração celular (citocromos mitocondriais), destruição de radicais livres (catalese e peroxidase) (Abraham e cols., 1988), regulação da pressão arterial (óxido nítrico sintase e guanilase ciclase) (Galbraiter, 1999), nocicepção (Fan e cols., 2011) entre outras.

Há alguns anos uma série de estudos tem avaliado o catabolismo do anel heme presente nos eritrócitos, verificando-se o possível vínculo da atividade desta via metabólica na modulação da pressão arterial, da temperatura corporal (Ravanelli e cols., 2006), bem como seu envolvimento nas respostas nociceptivas (Nascimento & Branco, 2007; 2008; Fan e cols., 2011).

Biologicamente a heme-oxigenase (HO) é uma enzima encontrada no retículo endoplasmático de diferentes células e tecidos. Sua principal função é catalisar a reação de quebra do anel da molécula heme na presença de oxigênio molecular e de citocromo P-450 redutase, o qual transfere elétrons de nucleotídeo piridine (NADPH) para heme (Maines, 1992; Figura 1).

Figura 1: Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme-oxigenase. (Adaptada de Maines, 1992).

A atividade enzimática da heme-oxigenase gera produtos que são biologicamente ativos (Maines, 1988; 1992; Abraham & Kappas, 2008):

1. O monóxido de carbono (CO), que tem ação semelhante a do óxido nítrico (NO), uma molécula sinalizadora para a geração da molécula GMPc nos sistemas biológicos, a qual possui, entre outras atividades, o relaxamento da musculatura lisa (Rodgers e cols., 1996).
2. A biliverdina, que é reduzida pela biliverdina redutase, formando a bilirrubina, um potente agente oxidante (Tenhunen e cols., 1968).

3. E o ferro, que é reutilizado na formação de uma nova molécula heme (Maines, 1997).

A biliverdina formada nesta reação é rapidamente convertida em bilirrubina, pela ação da enzima citosólica biliverdina redutase e após ser formada, a bilirrubina é subsequente conjugada pela enzima UDP-glicurinol-transferase e excretada na bile. Cerca de 80 a 85% da bilirrubina formada em vivo é derivada da hemoglobina liberada no envelhecimento ou de eritrócitos danificados (Schacter, 1988). Este montante representa a alta atividade basal da HO dentro dos tecidos ricos em células retículo endoteliais, tais como o baço e medula óssea, com atividade presente em diferentes tipos celulares, incluindo células-tronco, medula óssea e em diversos órgãos (Abraham e cols., 1988, 1989; Abraham, 1991).

Além de seu papel na regulação dos níveis celulares de heme, a HO também é responsável pela reciclagem do ferro de senescentes glóbulos vermelhos e células extra-hematopoéticas, tais como células do fígado.

Três enzimas de heme-oxigenase (HO) foram identificadas até o momento, a HO-1, a HO-2 e a HO-3. As três enzimas são produtos de diferentes genes, e seus padrões de expressão variam amplamente entre diferentes tipos celulares e tecidos. A HO-1, chamada de isoforma indutiva, é altamente induzível em tecidos como o coração, rim, fígado, vasos sanguíneos, baço, pulmão e outros. Sugere-se que, paralelamente à degradação do grupo heme, esta isoforma possa exercer função vital na manutenção da homeostase celular diante de situações de estresse, sendo considerada modulador das respostas adaptativas e protetora celular na presença de lesão oxidativa e inflamatória (Marilena, 1997; Foresti & Motterlini, 1999; Willis e cols., 1996). Evidências experimentais sugerem a elevação do seu nível e atividade frente a determinados fatores e eventos, tais como: choque térmico, estresse oxidativo, hipóxia, citocinas inflamatórias, óxido nítrico e prostaglandinas (Ryter e cols., 2002; Stocker, 1990). Outros reguladores da HO-1 são: o seu substrato heme, e sais de metais tais como: cromo, manganês, ferro, níquel, cobre, zinco, chumbo, estanho e outros. Alta atividade da HO-1 é encontrada no baço, testículo e no encéfalo. O baço é o único órgão sob condições normais, onde a HO-1 é a forma predominante, presumivelmente porque é o órgão responsável pela destruição das células vermelhas senescentes (Cable e cols., 1997). Por outro lado, a HO-2 é chamada de isoforma constitutiva e desempenha papel de regulador fisiológico da função celular (Watanabe e cols., 2005). É encontrada no endotélio e nas camadas média e adventícia dos vasos sanguíneos, testículos e em várias regiões do sistema nervoso central (SNC) tais como: medula espinal, mesencéfalo, gânglios da base, tálamo e tronco encefálico (Snyder e cols., 1998; Ryter & Otterbein, 2004; Watanabe e cols., 2005; Vincent e cols., 1994; Fan e cols., 2008; 2009). Sua atividade pode ser aumentada pela ativação da fosfolipase C, desencadeada por receptores de membrana acoplados a proteínas G, pela despolarização em neurônios (Snyder e cols., 1998) e também por glicocorticóides (Morse e cols., 2002). Enquanto, as duas primeiras isoenzimas apresentam semelhanças quanto à especificidade de substrato e quanto à necessidade de um co-

fator para que ocorra a atividade enzimática, a terceira isoenzima foi descrita como sendo de baixa atividade biológica. A atividade da HO-2 é comumente associada com atividade neuronal do gás CO (Fan e cols., 2011). Por outro lado, a HO-3 foi descrita mais recentemente no encéfalo por McCoubrey e cols. (1997) e pode ser derivada da retrotransposição do gene da HO-2 (Hayashi e cols., 2004). A homologia destas enzimas em ratos, camundongos e seres humanos é alta, sendo 80% e 90%, respectivamente para HO-1 e HO-2 (Alam & Den, 1992).

O *monóxido de carbono* (CO) é amplamente reconhecido como um gás tóxico, resultado da oxidação ou combustão de materiais orgânicos como madeira, tabaco, carvão e gás natural (Ryter & Otterbein, 2004). Este também exerce importantes ações como mediador gasoso através de sua produção endógena pela enzima heme-oxigenase (HO), podendo atuar na sinalização celular e participar de uma série de funções fisiológicas como neurotransmissor e neuromodulador do sistema nervoso, substância vasoativa importante na sinalização cardiovascular, com ação anti-inflamatória e com potencial participação em processos nociceptivos, tanto periféricos quanto centrais. Embora ao longo de muitos anos o CO tenha sido visto apenas como um gás prejudicial à saúde, nas últimas décadas uma nova faceta desta molécula vem sendo revelada pelo meio científico, através da descoberta de sua produção endógena.

As primeiras indicações da produção endógena do CO foram feitas por Saint Martin & Nicloux (1898), porém apenas em 1950 foram demonstradas evidências experimentais da possível existência deste gás em nosso organismo (Sjöstrand, 1950; 1951a; 1951b; 1952; Coburn e cols., 1966). No final da década de 60, a força motriz para a produção endógena do CO começou a ser atribuída à ação da enzima heme-oxigenase (Tenhunen e cols., 1968; 1969; 1970; Landaw e cols., 1970).

Cerca de 85% de sua produção em mamíferos vem da atividade da heme-oxigenase, sendo os outros 15% decorrentes de processos como peroxidação de lipídeos (Labbé e cols., 1999). Como mecanismo de atuação, o CO estimula a formação de guanosina 3,5 monofosfato cíclico (GMPc) pela ativação da guanilase ciclase solúvel (GCs) (Nascimento & Branco, 2007; Maines, 1997; Morita e cols., 1995), da mesma forma que o óxido nítrico (Soriano e cols., 2010; Liang & Clark, 2004). Porém, dados na literatura mostram que a ativação da enzima GCs pelo CO aumenta a produção de GMPc em uma ou duas vezes (Burstyn e cols., 1995), aumento relativamente pequeno, em relação ao aumento cerca de cem vezes maior promovido pela interação do NO com a GCs (Schmidt, 1992). Foi sugerido que o CO pode atuar de maneira soberana alterando os níveis de GMPc em regiões do SNC onde a NOS não seja expressa, ou exista em pequena quantidade (Maines, 1997; Soriano e cols., 2010). A ação da GCs na produção de GMPc é semelhante à ação da adenilato ciclase (AC) na produção de adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPc), no entanto a ativação da GCs não é dependente da interação do CO com um receptor de membrana acoplado à proteína G, diferentemente dos sinalizadores que ativam a AC e o fazem por intermédio de receptores acoplados à proteína G (Alberts e cols., 1994). Assim, a ação do CO sobre o GCs é direta, de forma que a GCs é, ao

mesmo tempo, receptor e efetor enzimático das ações intracelulares do CO, sendo esse mecanismo de ação compartilhado por outro importante sinalizador gasoso, o NO (Schmidt, 1992; Maines, 1997; Soriano e cols., 2010).

Neste contexto, um número cada vez maior de estudos indicam o CO como um gás biologicamente ativo (Maines, 1992; Verma e cols., 1993) que age como neurotransmissor e neuromodulador do sistema nervoso (Dawson & Snyder, 1994), como molécula de sinalização cardiovascular e com propriedades vasoativas (Johnson e cols., 1999), substância capaz de liberar neuropeptídeos (Weber e cols., 1994; Mancuso e cols., 1997) envolvido no controle do tônus vascular em diversos tecidos tais como do encéfalo, dos rins (Galbrath, 1999) e do fígado (Suematstu e cols., 1996), envolvido no aprendizado e memória (Stevens & Wang, 1993; Zhuo e cols., 1993), em diversas atividades neuronais (Cao e cols., 2000). Experimentos demonstraram a expressão de altos níveis de GCs em numerosas regiões cerebrais, que possuem neurônios expressando HO-2 (Verma e cols., 1993; Vicent e cols., 1994) e indícios apontam o CO, como um dos maiores reguladores dos níveis GMPc no encéfalo. Além disso, evidências experimentais sugerem que a atuação do CO sobre as respostas nociceptivas também é relacionado com o envolvimento do sistema GCs/GMPc (Dawson & Snyder, 1994; Maines, 1997; Nascimento & Branco, 2007; Carvalho e cols., 2011). Ainda, Ravanelli e cols. (2006) e Raffaini e cols. (2006), relataram que o CO tem importante participação, como neurotransmissor/neuromodulador na regulação da temperatura corporal, tanto na hipotermia como na hipertermia decorrente da administração intraperitoneal de endotoxina (lipopolissacarídeo; LPS). Em adição, é possível que o mecanismo de ação do CO envolva a modulação da transmissão glutamatérgica, pelo menos, considerando o controle neural do sistema cardiovascular (Johnson e cols., 1995).

Em todas as circunstâncias em que os mecanismos de ação do CO foram identificados, seus efeitos foram citados como decorrentes de três fatores: ativação da enzima guanilase ciclase (GC), ativação da via das proteínas ativadas por mitógeno (MAP) quinases, ou por meio da modulação direta de canais de potássio (Maines, 1997).

O CO por suas propriedades lipossolúveis é capaz de se difundir através da bicamada fosfolipídica das membranas celulares das células-alvo, podendo se ligar a enzima citosólica GC, o que por sua vez estimula a produção do segundo mensageiro GMPc a partir de guanosina 5'-trifosfato (GTP) (Marilena, 1997; Morse e cols., 2002).

Contudo, a atividade da molécula de monóxido de carbono gerado a partir do sistema da enzima heme-oxigenase (HO), tem sido associada a uma importante molécula biológica funcionando como um segundo mensageiro, modulando as atividades de uma variedade de sistemas os quais envolvem a ativação da guanilase ciclase solúvel (GCs), levando ao aumento dos níveis de guanosina monofosfato (GMPc).

4. *Locus coeruleus*

O locus coeruleus (LC) é uma estrutura encefálica localizada no tronco encefálico, adjacente ao quarto ventrículo e rica em neurônios noradrenérgicos (Berridge & Waterhouse, 2003). De fato, os neurônios noradrenérgicos encefálicos possuem duas principais origens, o locus coeruleus e a área tegmental lateral, sendo que mais da metade destes neurônios localizam-se no LC (Weinshenker & Szot, 2002). Anatomicamente, o LC apresenta distintos conjuntos de núcleos noradrenérgicos ventrolateralmente localizados em relação ao eixo mediano (Foote e cols., 1983), os quais se projetam para diversas estruturas encefálicas (Jobe e cols., 1994).

Considerando as funções do LC, a modulação da dor tem especial destaque. Trabalhos prévios mostraram íntima relação desta região com a modulação nociceptiva (Basbaum & Fields, 1989, Hentall e cols., 2003). De fato, a estimulação elétrica ou química do LC em ratos promove liberação espinal de noradrenalina (Hentall e cols., 2003) seguida de antinocicepção (Jones & Gebhart, 1986). Esta nocicepção observada pela ativação do LC é atenuada pela administração espinal de antagonistas de receptores de α_2 -noradrenérgicos, reforçando o envolvimento de vias noradrenérgicas na modulação nociceptiva (Jones, 1991).

As fibras noradrenérgicas do LC atingem o corno dorsal da medula espinal (CDME), e as fibras das áreas A5 e A7 (grupo de células localizadas na parte ventrolateral e dorsolateral da ponte, respectivamente) alcançam neurônios motores das colunas ventral e ventrolateral da medula espinal (ME) (Lyons e cols., 1989; Tsuruoka e cols., 2004). Curiosamente, os axônios do LC estão situados primeiramente no funículo ventral ipsilateral e terminam na parte medial das lâminas VII e VIII, fornecendo densa inervação à parte ventral da ME e pouca inervação para o corno dorsal superficial (Proudfit & Clark, 1991; Yeomans e cols., 1992). Os neurônios situados na divisão pontina do tronco encefálico onde se situa o LC atingem o CDME (Tsuruoka e cols., 2004), modulando estímulos nociceptivos através de receptores α_2 -noradrenérgicos (Li & Zhao, 1993; King e cols., 2005).

Muito embora as conexões noradrenérgicas entre o LC e a ME sejam de crucial importância no controle da atividade das vias ascendentes nociceptivas (Basbaum & Fields, 1989) é possível que parte deste efeito modulador das sensações álgicas se deva ao resultado da ação de outras vias descendentes sobre interneurônios encefalinérgicos da substância gelatinosa, inibindo as aferências primárias A δ e C, através de projeções pré-sinápticas sobre seu primeiro contato neural com células nociceptivas localizadas no núcleo espinal do nervo trigêmeo (NENT) e, muito provavelmente, no CDME (Jessel & Iversen, 1977; Basbaum & Fields, 1984). Esse mecanismo tomaria como base o bloqueio, por meio de neurotransmissores opióides, como a encefalina e endorfinas, do influxo de íons cálcio em terminais axônicos de células do gânglio da raiz dorsal dos nervos espinais, por onde trafegam impulsos nociceptivos (Mudge e cols., 1979) estando este

sistema sob controle das projeções descendentes monoaminérgicas. Assim, ao lado das vias serotoninérgicas descendentes de inibição da dor, conexões noradrenérgicas provenientes do LC, que também se projetam ao CDME (Kwiat & Basbaum, 1992; Clark & Prodfit, 1993), desempenham importante papel no controle da dor (Jones & Gebhart, 1986; Yeomans e cols., 1992) ao inibirem, direta ou indiretamente, por meio de interneurônios medulares, o contato sináptico entre o primeiro e o segundo neurônio da via nociceptiva ascendente, também, por meio de interneurônios GABAérgicos ou glicinérgicos (Pertovaara, 2006).

Além da modulação nociceptiva, vários achados apoiam o envolvimento do LC na modulação de respostas associadas ao estresse (Morilak e cols., 2005, Tanaka e cols., 2000). Dentro desta perspectiva, estudos têm mostrado que situações envolvendo estresse emocional promovem significativo aumento da liberação de noradrenalina em várias regiões encefálicas (Tanaka e cols., 1982; 1983). Considerando que o LC é a principal aferência noradrenérgica encefálica, esta estrutura tem sido sugerida como um componente importante na circuitaria neuronal envolvida nas respostas ao estresse, participando da regulação das respostas neuroendócrinas aos agentes estressores (Carrasco e cols., 2003). Desta maneira, o sistema noradrenérgico das regiões encefálicas tais como o hipotálamo, amígdala e do locus coeruleus participariam da modulação do medo e da ansiedade (Tanaka e cols., 2000). Nestas regiões encefálicas, observou-se grande liberação de noradrenalina associada a situações emocionais negativas, tais como medo e ansiedade (Tanaka e cols., 1982a e b; 1983a e b; 1985a e b).

Os mecanismos intrínsecos do LC na modulação de funções fisiológicas tem sido amplamente investigados (Ravanelli e cols., 2006; Soriano e cols., 2010; Millan, 2002). De particular interesse, evidências têm mostrado que esta estrutura apresenta elevada expressão da enzima HO-2 (Maines, 1997) o que sugere o envolvimento do CO na modulação de parte das funções desempenhadas pelo LC. Dentro desta perspectiva, Ravanelli e cols. (2006) demonstraram que a ativação da via CO-GMPc no LC modula a febre induzida pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo em ratos. Segundo a literatura, há grande paralelismo entre as ações biológicas e as funções dos sistemas que geram os gases biologicamente ativos, CO e NO, sendo seus mecanismos regulatórios intimamente interligados (Maines, 1997). Assim, tanto a ação do CO como a do NO são dependentes da ativação do segundo mensageiro intracelular, o GMPc (Dawson & Snyder, 1994; Maines, 1997).

Considerando a modulação das respostas emocionais, têm sido encontrados na literatura resultados conflitantes com relação à participação do NO na modulação de comportamento emocionais, utilizando modelos animais de ansiedade. Quock & 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 elevado. Ressalta-se que a exploração dos braços abertos induzido pelo clordiazepóxido foi revertido pela administração intracerebroventricular de L-arginina, indicando que o NO pode exercer efeito ansiolítico em camundongos (De Oliveira e cols., 1997). Entretanto,

outros inibidores da NOS, tais como L-NAME (Wiley e cols., 1995) e 7-NI (Volke e cols., 1997; Dunn e cols., 1998) aumentam a exploração dos braços abertos em camundongos, sugerindo, assim, efeito ansiogênico do NO (Wiley e cols., 1995).

Em adição, no locus coeruleus (LC) a expressão da NOS é pequena, e em contrapartida a isoforma constitutiva da HO, HO-2, é abundante (Pineda e cols., 1996; Garthwaite e cols., 1995). Assim, é possível que o CO atue com a principal molécula capaz de interagir com GCs no LC (Maines, 1997; File e cols., 1979). No entanto, essas necessitam ser esclarecidas, uma vez que existem relatos demonstrando ações do NO no LC via ativação da GCs (Faria e cols., 1997). Ainda, com relação ao envolvimento do CO na modulação emocional não há resultados que avaliem a via HO-CO-GMPc.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Fundamentado na literatura apresentada, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o envolvimento da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade, bem como na modulação nociceptiva térmica e inflamatória em ratos.

Desta maneira, destacam-se os objetivos específicos:

1. Avaliar o envolvimento da ativação da via HO-CO-GMPc no LC na modulação da ansiedade, avaliada pelo teste do labirinto em cruz elevado e teste claro-escuro, através das administrações intra-LC dos seguintes compostos: ZnDPBG (inibidor da via HO-CO-GMPc) ou veículo (Na_2CO_3), Heme-lisinato (substrato da via) ou veículo (L-lisina), e do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel (ODQ) ou veículo (DMSO) após a administração do Heme-lisinato ou do veículo (L-lisina).
2. Avaliar o envolvimento da ativação da via HO-CO-GMPc no LC na nocicepção avaliada pelo teste de retirada de cauda e teste de formalina, através das administrações intra-LC dos seguintes compostos: ZnDPBG (inibidor da via HO-CO-GMPc) ou veículo (Na_2CO_3), Heme-lisinato (substrato da via) ou veículo (L-lisina), e do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel (ODQ) ou veículo (DMSO) após a administração do Heme-lisinato ou do veículo (L-lisina).

MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (250 a 300 gramas, $n = 381$), cedidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas coletivas (5 ratos/caixa) de polietileno forradas com maravalha (41 x 34 x 17 cm), em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro se iniciando às 6 horas da manhã), com água e comida *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais em laboratórios, conforme a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, e com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Processo nº 09.1.606.53.7).

2. Cirurgia

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina a 10% (Ketamina, 75 mg/kg intramuscular, músculo posterior da coxa) associado à xilazina 4% (Coopazine, 10 mg/kg intramuscular, músculo posterior da coxa), e suas cabeças, foram fixadas ao aparelho estereotáxico (Insight Instrumentos Ltda., Ribeirão Preto, Brasil), por meio de duas barras auriculares e de um suporte bucal. Foi injetado, subcutaneamente, 0,2 mL de xilocaína a 2 % com vasoconstritor (noradrenalina), na região do escalpo a ser aberta, para promover diminuição do sangramento e da percepção do estímulo doloroso. Foi realizada assepsia da pele, após tricotomia, com álcool iodado e após esses procedimentos, realizou-se uma incisão longitudinal na pele da cabeça e no tecido subcutâneo. A calota craniana foi exposta e efetuada nova assepsia da região com água oxigenada 10 vol.

Após a exposição da calota craniana, foram realizados dois orifícios com auxílio de um motor elétrico de baixa rotação e de uma fresa odontológica esférica de aço inoxidável nº 4 (carbide). Em um dos orifícios foi rosqueado um pequeno parafuso com a finalidade de servir de apoio para o capacete de acrílico, confeccionado com resina autopolimerizável (Simplex®, Dental Fillings). O outro orifício permitiu a introdução da cânula-guia de aço inoxidável (15 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo) no locus coeruleus ou no ventrículo cerebral lateral direito, considerando as seguintes coordenadas, de acordo com Paxinos e Watson (2007):

Locus coeruleus (LC): anterior: -3,4 mm do bregma; lateral: -1,2 mm da linha média e dorsal: -5,8 mm da calota craniana. A cânula-guia utilizada foi de 15 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro, introduzida 1mm acima da região do LC conforme coordenadas apresentadas.

Ventrículo lateral (VL): ântero-posterior: 1,0 mm posterior do bregma; 1,6 mm lateral à linha média e de 3,2 a 3,7 mm abaixo da superfície da calota craniana. O deslocamento do menisco em um manômetro assegurou o correto posicionamento da cânula no ventrículo lateral.

O ventrículo lateral foi introduzido neste estudo para evitar múltiplas injeções no LC, o que poderia, eventualmente, causar lesões neste núcleo, sendo fundamentada em trabalhos anteriores (Ravanelli e cols., 2006; Ravanelli & Branco, 2008).

Com a completa polimerização do acrílico, foi removido o suporte de apoio da cânula-guia acoplado à torre do estereotáxico, e colocado na mesma, já fixada, um mandril ocluser de aço inoxidável com 0,2 mm de diâmetro e do mesmo comprimento da cânula-guia, para evitar uma possível obstrução. Em seguida, os ratos receberam via administração subcutânea, 1 ml/kg de Banamine 1% (Schering-Plough SA, RJ), um antiinflamatório, antipirético e analgésico de longa duração e 0,3 ml/kg de Pentabiótico veterinário pequeno porte (Fort Dodge).

Após a cirurgia, os ratos foram mantidos aquecidos sob a iluminação de uma lâmpada elétrica, para a recuperação da anestesia geral. O período de recuperação da cirurgia foi de 6 dias com livre acesso à água e comida.

3. Fármacos e Microinjeção

O inibidor da heme-oxigenase, zinco deuteroporphirina 2,4-bis glicol (ZnDPBG) foi obtido da Porphyrin Products (UT, USA). Este composto foi dissolvido na concentração de 50 mmol/L em Na₂CO₃ e estocado no escuro. O Heme-lisinato foi dissolvido na concentração de 38 mmol/L. As preparações com o aminoácido L-lisina, mas livres de heme foram usadas no tratamento de animais controle, tratados com este veículo. O inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3,-a]quinoxalin-1-one, ODQ foi adquirido da Trocris Cookson (St. Louis, MO) e dissolvido em 1% DMSO (dimetilsulfóxido), em uma solução salina estéril, livre de pirógenos; DMSO (1%) foi utilizado como controle do veículo. O volume administrado no LC foi de 0,1 µl, e no ventrículo lateral de 1,0 µl. Todas as doses empregadas neste estudo foram fundamentadas em trabalhos anteriores (Steiner e cols., 2003; Paro e cols., 2002; Ravanelli e cols., 2006; Ravanelli & Branco, 2008). Animais pré-tratados com inibidor da GCs, ODQ (1,3 nmol) ou veículo (1% DMSO) foram injetados i.c.v. para evitar múltiplas lesões no LC, o que pode eventualmente promover lesões nesta estrutura (Ravanelli e cols., 2006; e Ravanelli & Branco, 2008).

Para a administração das drogas em estudo, foi utilizada uma microseringa Hamilton 10,0 µL (EUA), conectada a uma agulha dental (BD agulha gengival 30G curta), de 0,3 mm de diâmetro externo e 16 mm de comprimento, por meio de um segmento de polietileno PE 10 de aproximadamente 45 cm. Dessa forma, a agulha alcançou o tecido encefálico, ultrapassando em 1 mm a extremidade inferior da cânula-guia.

Após a microinjeção a agulha foi mantida por mais 40 segundos na cânula-guia para evitar o refluxo da solução injetada.

4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido amplamente utilizado como modelo animal de ansiedade. A maioria do repertório comportamental exibido por roedores submetidos a esse teste é o resultado da tendência natural desses animais de se aproximarem de estímulos ambientais novos, de forma que a avaliação desses estímulos é crucial para a determinação do modo como esses animais se aproximam de um ambiente seguro ou se esquivam de um ambiente potencialmente perigoso. Neste sentido, (LCE) envolve mecanismos aversivos condicionados e inatos, proximais e distais, de forma que os sinais aversivos detectados à distância podem funcionar como um estímulo capaz de ativar o sistema de medo, que mantém o organismo distante do perigo representado pelos braços abertos do labirinto (Deakin & Graeff, 1991).

O LCE é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) perpendiculares a dois braços fechados da mesma medida, mas circundados por paredes elevadas (40 cm de altura). Todo o aparato encontra-se elevado 50 cm do solo (Pellow e cols., 1985, Figura 2). A intensidade da luz no LCE foi de 5000 lux.

A atividade exploratória do animal no LCE foi avaliada segundo quatro parâmetros tradicionais:

- Número de entradas nos braços abertos: números de vezes que o animal atravessa com as quatro patas para o interior desses braços;
- Número de entradas nos braços fechados: número de vezes que o animal atravessa com as quatro patas para o interior desses braços;
- Total de entradas: foi obtido através da somatória do número total de entradas nos braços abertos com o número total de entradas nos braços fechados do LCE, o que reflete a atividade geral do animal (Pellow e cols., 1995).
- Percentual de tempo nos braços abertos: foi obtido através da relação entre o tempo gasto nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 min).

$$\% \text{ Tempo} = \frac{100 \times \text{Tempo nos BA}}{\text{Tempo total do teste}}$$

Observação: BA indica braços abertos e BF braços fechados.

Além das medidas clássicas, a atividade exploratória do animal foi analisada através de nove categorias comportamentais:

- Exploração na extremidade (*end-arm-exploration*): postura exploratória na extremidade dos braços abertos do labirinto;

- Levantamento (*rearing*): consiste na postura bípede do rato, apoiando-se com as patas posteriores no assoalho do labirinto, estando completamente ereto ou semi-arqueado;
- Espreitamento (*peeping out*): projeção da cabeça/ombros dos braços fechados para o centro, sendo que as quatro patas permanecem no braço fechado;
- Autolimpeza (*grooming*): é a sequência de autolimpeza da espécie, começando pelo focinho, indo até as orelhas e terminando pela limpeza do corpo inteiro;
- Esquadrinhamento (*scanning*): projeção da cabeça do animal sobre as beiradas de um braço, farejando em qualquer direção;
- Mergulho de cabeça (*head-dipping*): movimento exploratório de cabeça/membros anteriores nas laterais ou extremidades do labirinto, em direção ao “precipício”;
- Esticamento (*stretched-attend-posture*): uma postura exploratória na qual o animal se estica e em seguida retoma a posição original, sem se locomover para frente;
- Rastejamento (*flat-back-approach*): locomoção exploratória onde o animal se estica e cuidadosamente move-se para frente;
- Imobilidade (*immobility*): imobilidade por um período mínimo de 6 segundos.

As sessões do teste no LCE foram filmadas, os dados computados e analisados através do programa Geo Vision GC-250 System. O teste do labirinto em cruz elevado teve a duração de 5 minutos.

Figura 2: Fotografia do aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

5. Teste Claro-Escuro (TCE)

O teste de claro-escuro (TCE) consiste de dois compartimentos, uma área escura (30 cm de profundidade X 80 cm de largura X 60 cm de altura) e uma área clara (50 cm de profundidade X 80 cm de largura X 60 cm de altura) conectados por uma abertura central (15 cm de altura X 10 cm de largura). A

caixa é construída de plástico, e a região clara não é coberta, e recebe luz da sala experimental (Figura 3). A intensidade da luz no compartimento escuro foi menor que 5 lux, enquanto que no compartimento claro foi de 5000 lux. No início do teste os animais foram colocados no lado claro da caixa, com a face voltada para a abertura para o lado escuro, e o comportamento foi avaliado pelo período de 5 minutos. O TCE foi filmado e gravado utilizando o software Geo Vision. Para análise deste teste, foram considerados os seguintes parâmetros: tempo total de permanência em cada compartimento (claro e escuro) e número total de transições entre os dois compartimentos. Foi considerado para análise a entrada em um determinado compartimento (claro ou escuro) quando a cabeça e as duas patas anteriores estavam localizadas na área (Bouwknicht & Paylor, 2001; Bourin & Hascoet, 2003).

Figura 3: Fotografia da caixa claro-escuro utilizada nos experimentos, obtida em laboratório.

6. Teste de Retirada de Cauda (TRC)

Para realização do teste de retirada de cauda (TRC), os animais foram contidos manualmente, e a porção distal (3 a 4 cm) de sua cauda foi colocada sobre uma resistência, a qual é aquecida por corrente elétrica. Cronometrou-se o tempo em segundos (latência) que o animal levou para emitir o reflexo, ou seja, retirar a cauda do estímulo térmico nocivo. Caso o animal não removesse a cauda da fonte de calor dentro de 6 s, o dispositivo desliga-se automaticamente para prevenir possíveis danos teciduais (Figura 4). Antes de efetuar qualquer tratamento, foi determinada a latência da resposta em segundos para cada animal, por 3 vezes consecutivas em intervalos aleatórios de 1 a 3 minutos. A média da latência das três respostas foi considerada como valor basal no teste de retirada de cauda. Após a medida da latência basal, os animais formaram diferentes grupos experimentais, sendo submetidos a novas medidas da latência no teste de retirada da cauda após a realização dos distintos tratamentos experimentais em intervalos de 15 minutos até o tempo máximo de 120 minutos.

Figura 4: Fotografia de um animal durante a realização do teste de retirada de cauda em laboratório.

7. Teste de Formalina

O teste de formalina é um modelo experimental bastante utilizado para avaliar as respostas nociceptivas. Com este modelo, podemos quantificar as respostas do animal frente a um estímulo químico que causa dor moderada e contínua gerada pelo dano tissular (aplicação de formaldeído no membro posterior de ratos) (Abbott e cols., 1982a; Abbott e cols., 1982b; Manning & Franklin, 1998; Abbott & Teng, 1998; Abbott e cols., 1995).

A principal característica do teste da formalina, em roedores, refere-se a duas fases das respostas comportamentais nociceptivas registradas pelo teste. A primeira fase (fásica ou primária) se inicia imediatamente após a injeção da formalina, com um pico em 3-5 minutos, devido à estimulação direta dos nociceptores. A segunda fase (tônica ou secundária) deve-se ao surgimento de processos inflamatórios e, inicia-se aproximadamente entre 15-20 minutos após a injeção de formalina e termina por volta de 40-60 minutos (Tjolsen e cols., 1992; Puig & Sorkin, 1996). Entre as duas fases há um período intermediário de pouca ou nenhuma resposta nociceptiva.

Para realizar este teste, a formalina (2%) foi diluída em solução salina 0,9% e injetada com auxílio de uma seringa de 1 ml, com agulha 30½ G (13 X 4,5 mm) na face plantar do membro posterior do animal (na pata posterior), num volume de 0,05 ml. As respostas comportamentais (sacudidas e lambidas), consideradas como índice nociceptivo, foram derivadas dos modelos descritos por Dubuisson & Dennis (1977) e Tjolsen e cols. (1992). A avaliação da sensibilidade nociceptiva (número de sacudidas e lambidas) foi realizada em blocos de 5 minutos, durante 45 minutos após a administração da formalina. A figura 5 apresenta o aparato utilizado em laboratório para o teste da formalina.

Figura 5: Fotografia de um animal durante a realização do teste de formalina.

8. Protocolos Experimentais

Para avaliar o envolvimento da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação ansiedade e da nocicepção térmica e inflamatória foram realizados 4 protocolos experimentais:

Experimento 1: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste de labirinto em cruz elevado em ratos.

Uma semana após a implantação da(s) cânula-guia(s), os ratos foram submetidos a diferentes tratamentos, e 15 min após, foram avaliados no teste de labirinto em cruz elevado por um período de 5 minutos.

Experimento 2: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste claro-escuro em ratos.

Uma semana após a implantação da(s) cânula-guia(s), os ratos foram submetidos a diferentes tratamentos, e 15 min após, foram avaliados no teste claro-escuro por um período de 5 minutos.

Experimento 3: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Uma semana após a implantação da(s) cânula-guia(s), os ratos foram avaliados no teste de retirada da cauda para determinação da latência basal, após este procedimento, foram submetidos a diferentes tratamentos, e 15 min após, submetidos ao teste nociceptivo novamente, em intervalos aleatórios, durante o tempo total de 120 minutos.

Experimento 4: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção inflamatória avaliada pelo teste de formalina em ratos.

Uma semana após a implantação da(s) cânula-guia(s), os ratos foram submetidos a diferentes tratamentos, e 15 min após, foram submetidos ao teste nociceptivo de formalina, sendo observados por um período de 45 minutos.

Em cada um destes protocolos, foram realizados 12 grupos experimentais, os quais são descritos a seguir:

Grupo 1: animais receberam a administração intra-LC do inibidor da heme-oxigenase, ZnDPBG, na dose de 5 nmol.

Grupo 2: animais receberam a administração intra-LC do inibidor da heme-oxigenase, ZnDPBG, na dose de 50 nmol.

Grupo 3: animais receberam a administração intra-LC do inibidor da heme-oxigenase, ZnDPBG, na dose de 200 nmol.

Grupo 4: animais receberam a administração intra-LC do veículo utilizado para diluição do ZnDPBG (Na₂CO₃).

Grupo 5: animais receberam a administração intra-LC do substrato para a via heme oxigenase, o Heme-lisinato, na dose de 150 nmol.

Grupo 6: animais receberam a administração intra-LC do substrato para a via heme-oxigenase, o Heme-lisinato, na dose de 300 nmol.

Grupo 7: animais receberam a administração intra-LC do substrato para a via heme-oxigenase, o Heme-lisinato, na dose de 600 nmol.

Grupo 8: animais receberam a administração intra-LC do veículo do Heme-lisinato, L-lisina (14,2 µmol).

Grupo 9: animais receberam a administração i.c.v. do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol) e após 15 min receberam o Heme-lisinato (600 nmol), substrato para a via HO-CO-GMPc

intra-LC. A administração do inibidor da GCs foi realizada no ventrículo lateral e não no LC para evitar múltiplas injeções no LC, o que pode eventualmente promover lesões nesta estrutura, sendo que este protocolo é fundamentado em trabalho anterior (Ravanelli e cols., 2006; Ravanelli & Branco, 2008).

Grupo 10: animais receberam a administração i.c.v. do veículo do ODQ, o DMSO 1% e após 15 min receberam o Heme-lisinato (600 nmol) intra-LC.

Grupo 11: animais receberam a administração i.c.v. do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, ODQ e após 15 min receberam o veículo do Heme-lisinato (L-lisina - 14,2 μ mol) intra-LC.

Grupo 12: animais receberam a administração i.c.v. do veículo do ODQ, o DMSO 1% e após 15 min receberam o veículo do Heme-lisinato (L-lisina - 14,2 μ mol) intra-LC.

9. Histologia

Com o término dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (10%; 0,5 mL/ 100 mg de peso corporal, i.p.) para realização da perfusão transcardíaca através do ventrículo esquerdo. Inicialmente foi utilizada solução fisiológica (NaCl 0,9%) para a remoção do sangue do animal, seguida de perfusão com formaldeído (10%) para a fixação dos tecidos. A seguir os encéfalos foram retirados e armazenados por 4 dias em formaldeído (10%). Após este período o material foi colocado em solução de sacarose 10% por 12 horas depois em sacarose 20% por 48 horas, ou até que o encéfalo migre para o fundo do frasco indicando saturação do tecido.

Após os períodos de fixação e crioproteção, os encéfalos foram congelados, cortados em secções transversais na espessura de 40 μ m, em criostato (Microm, HM 505 E). Em seguida foi realizada a técnica de Nissl (cresil violeta) para coloração do tecido. Os cortes foram analisados sob microscopia de luz, e os sítios de microinjeção identificados segundo o Atlas de Paxinos & Watson (2007). Somente os animais que tiverem os sítios de microinjeção localizados no ventrículo lateral e no locus coeruleus foram considerados para análise dos resultados.

10. Análise dos Resultados

Para a análise dos dados obtidos no teste do LCE, foram calculadas as médias do número de entradas nos braços abertos (BA), número de entradas nos braços fechados (BF) e porcentagem de tempo de permanência nos BA (%TBA) em relação ao tempo total. Esta última variável foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$\%TBA = 100 \times [TBA / (TBA + TBF)]$, onde:

TBA: Tempo despendido nos braços abertos

TBF: Tempo despendido nos braços fechados

Além das medidas clássicas foram analisadas também as nove categorias comportamentais: exploração na extremidade, levantamento, espreitamento, autolimpeza, esquadrinhamento, mergulho de cabeça, esticamento, rastejamento e imobilidade.

Para o teste claro-escuro, foram calculados o tempo de permanência no compartimento claro e escuro e a média do número de transições entre os dois compartimentos.

Para análise estatística do LCE e teste claro-escuro foi utilizada a análise de variância (ONE-WAY), para cada parâmetro analisado, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Os resultados do teste de retirada da cauda foram normalizados de acordo com a seguinte fórmula:

$$IARC = \frac{\text{latência teste} - \text{latência basal}}{6 - \text{latência basal}}$$

IARC representa o Índice de Antinocicepção da Retirada da Cauda; latência teste corresponde ao tempo que o animal levou para emitir a resposta após o tratamento experimental, latência basal é a duração da latência no período controle e o valor 6 corresponde ao tempo de corte do estímulo térmico nocivo em segundos.

Para a análise estatística do teste de retirada de cauda, foi utilizada a análise de variância de duas vias para medidas repetidas (TWO-WAY ANOVA), considerando como fatores tempo e tratamento, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls, e uma análise de variância (ONE-WAY ANOVA), considerando como fator o tempo, seguida do teste *post hoc* de Tukey, quando necessário. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média).

Os dados do teste de formalina estão apresentados considerando a média $\pm$ erro padrão da média do número de sacudidas e lambidas para a fase 1 (0-10 minutos) e da fase 2 (20-45 minutos). Para a análise estatística do teste de formalina, foi utilizada a análise de variância de duas vias para medidas repetidas (TWO-WAY ANOVA), considerando como fatores tempo e tratamento, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Quando necessário foi utilizada uma análise de variância ONE-WAY ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, se apropriado. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A Figura 6 apresenta uma fotomicrografia do tronco encefálico de um animal experimental representativo, indicando a localização da cânula-guia unilateral no LC.

Figura 6: Fotomicrografia de um corte transversal do tronco encefálico de rato com cânula-guia dirigida para o locus coeruleus após coloração pela técnica de Nissl (cresil violeta). Abreviação: 4V: 4º ventrículo. Aumento de 5X. A barra representa 100 µm.

1. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste de labirinto em cruz elevado em ratos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a inibição inespecífica da atividade da enzima HO, por meio da administração do ZnDPBG no LC, na dose de 50 nmol promoveu alteração no número de entradas nos BF avaliados no teste do LCE (Figura 7C). Em contraste, o aumento da atividade da via HO-CO, promovida pela administração intra-LC do Heme-lisinato (substrato para a enzima HO) na dose de 600 nmol, produziu aumento na porcentagem de tempo nos BA (Figura 8A) e do número de entradas nos BA (Figura 8B). Em adição, a administração i.c.v. prévia do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol), seguida do tratamento do Heme-lisinato (600 nmol) intra-LC bloqueou os efeitos da administração do Heme-lisinato precedido pelo veículo (DMSO, Figura 9), considerando tanto a porcentagem de tempo de permanência nos BA como a média de entradas nos BA. Acrescenta-se que a administração do ODQ seguida pelo veículo L-lisina, não promoveu alterações nos parâmetros comportamentais clássicos analisados no teste do LCE (Figura 9A a C).

A análise estatística das medidas clássicas do teste do LCE evidenciou que não há diferença significativa na porcentagem de tempo despendido nos BA ($F_{3,31} = 1,913$, $P = 0,150$, ONE-WAY ANOVA), nem na média de entradas nos BA ($F_{3,31} = 0,176$, $P = 0,912$) dos grupos tratados com o inibidor inespecífico da enzima HO, ZnDPBG ou do seu veículo, Na_2CO_3 , (Figura 7A e B). Entretanto, há diferença significativa na média de entradas nos BF ($F_{3,31} = 11,300$, $P < 0,001$, ONE-WAY ANOVA) no grupo ZnDPBG, dose de 50 nmol, quando comparado ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com o veículo (Na_2CO_3) e com os grupos ZnDPBG 5 nmol e ZnDPBG 200nmol (Figura 7C). Em relação às novas medidas etológicas, a ONE-WAY ANOVA evidenciou diferença em apenas dois comportamentos: autolimpeza ($F_{3,31} = 4,27$, $P = 0,013$) e esticamento ($F_{3,31} = 6,55$, $P = 0,002$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença entre o grupo ZnDPBG 200 nmol (Esticamento); grupo ZnDPBG 5 nmol (Autolimpeza) quando comparado com demais grupos (Tabela 1). Os outros comportamentos avaliados, ou seja, exploração da extremidade ($F_{3,31} = 1,026$, $P = 0,39$), levantamento ($F_{3,31} = 0,70$, $P = 0,55$), imobilidade ($F_{3,31} = 0,59$, $P = 0,62$), rastejamento ($F_{3,31} = 1,00$, $P = 0,40$), mergulho de cabeça ($F_{3,31} = 2,61$, $P = 0,07$), esquadrinhamento ($F_{3,31} = 2,78$, $P = 0,05$) e espreitamento ($F_{3,31} = 1,41$, $P = 0,25$) não apresentaram diferença significativa (Tabela 1).

A aplicação da ONE WAY ANOVA mostrou que a administração intra-LC do Heme-lisinato, na dose de 600 nmol aumentou a porcentagem de tempo de permanência nos BA ($F_{3,31} = 10,73$, $P < 0,001$), bem como o número de entradas nos BA ($F_{3,31} = 20,69$, $P < 0,001$), quando comparado ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com o veículo (L-lisina), e com os grupos Heme-lisinato 150 nmol e Heme-lisinato 300 nmol (Figura 8A e B). Porém, não há diferença significativa quanto ao número de entradas nos BF ($F_{3,31} = 0,29$, $P = 0,82$) entre os diferentes grupos analisados tratados com o substrato da enzima heme-oxigenase (Figura 8C). A análise dos comportamentos etológicos apontou diferença na autolimpeza ($F_{3,31} = 5,30$, $P = 0,005$) dos

grupos Heme-lisinato 150 nmol, 300 nmol e 600 nmol quando comparados ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com o grupo controle (L-lisina, Tabela 2). Em adição, a ONE WAY ANOVA não demonstrou diferença significativa em relação às demais medidas etológicas: exploração da extremidade ($F_{3,31} = 0,03$, $P = 0,99$), levantamento ($F_{3,31} = 0,59$, $P = 0,62$), rastejamento ($F_{3,31} = 1,89$, $P = 0,15$), imobilidade ($F_{3,31} = 0,05$, $P = 0,98$), espreitamento ($F_{3,31} = 0,88$, $P = 0,46$), esquadrinhamento ($F_{3,31} = 0,23$, $P = 0,87$), mergulho de cabeça ($F_{3,31} = 2,17$, $P = 0,11$) e esticamento ($F_{3,31} = 1,55$, $P = 0,22$) (Tabela 2).

A análise estatística do teste do LCE nos grupos que receberam o inibidor específico da enzima GMPC, ODQ (1,3 nmol), mostrou diferença significativa na porcentagem de tempo nos BA ($F_{1,15} = 61,65$, $P = 0,002$) quando comparado ($P < 0,05$, Newman-Keuls) o grupo ODQ+Heme com os grupos DMSO+L-lisina e ODQ+L-lisina (Figura 9A), e no número de entradas nos BA ($F_{3,31} = 30,18$, $P < 0,001$) quando comparado ($P < 0,05$, Newman-Keuls) o grupo DMSO+Heme com os grupos ODQ+L-lisina, DMSO+L-lisina e ODQ+Heme (Figura 9B). Ainda, a análise da média de entradas nos BF não há diferença significativa entre os grupos ($F_{3,31} = 1,15$, $P = 0,34$, Figura 9C). Ressalta-se que a administração de ODQ seguida do veículo L-lisina não foi diferente do tratamento DMSO+L-lisina, em todos os comportamentos clássicos analisados no teste do LCE (Figura 9A a C). Em relação às novas medidas etológicas, a ONE-WAY ANOVA evidenciou diferença estatística na exploração da extremidade ($F_{3,31} = 5,33$, $P = 0,005$), levantamento ($F_{3,31} = 7,80$, $P < 0,001$), esquadrinhamento ($F_{3,31} = 27,81$, $P < 0,001$), mergulho de cabeça ($F_{3,31} = 11,729$, $P < 0,001$), esticamento ($F_{3,31} = 3,79$, $P = 0,02$), rastejamento ($F_{3,31} = 3,08$, $P = 0,04$), quando comparado com os demais grupos ($P < 0,05$, Newman-Keuls) (Tabela 3). Porém os comportamentos de espreitamento ($F_{3,31} = 2,65$, $P = 0,06$), imobilidade ($F_{3,31} = 11,28$, $P < 0,001$) e autolimpeza ($F_{3,31} = 1,14$, $P = 0,35$) não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados (Tabela 3).

Figura 7: Efeito da administração intra-LC em ratos do inibidor inespecífico da enzima heme-oxigenase (HO), ZnDPBG (nas doses de 5 nmol, 50 nmol e 200 nmol $n = 8$, para cada dose) ou de seu veículo (Na_2CO_3 , $n = 8$) no teste do labirinto em cruz elevado. A: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA); B: Média de entradas BA; C: Média de entradas nos braços fechados (BF). * $P < 0,05$, teste de Newman-Keuls comparado com demais grupos.

Figura 8: Efeito da administração intra-LC em ratos do substrato da enzima heme-oxigenase (HO), Heme-lisinato (nas doses de 150 nmol, 300 nmol e 600 nmol, $n = 8$, para cada dose) ou de seu veículo (L-lisina $n = 8$) no teste do labirinto em cruz elevado. A: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA); B: Média de entradas BA; C: Média de entradas nos braços fechados (BF). * $P < 0,05$, teste de Newman-Keuls comparado com demais grupos.

Figura 9: Efeito da administração intra-LC em ratos do substrato da enzima heme-oxigenase (HO), Heme-lisinato (600 nmol) ou do veículo, L-lisina, precedido pelo inibidor específico da GMPc, ODQ (1,3 nmol) ou o veículo (DMSO 1%), $n = 8$, para cada grupo no teste do labirinto em cruz elevado. A: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA); B: Média de entradas BA; C: Média de entradas nos braços fechados (BF). * $P < 0,05$, teste de Newman-Keuls comparado com demais grupos.

Tabela 1: Avaliação de diferentes categorias comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam administração do inibidor inespecífico da enzima heme-oxigenase (ZnDPBG) em três doses distintas (5 nmol, 50 nmol, 200 nmol) ou do veículo Na₂CO₃ no locus coeruleus. * P < 0,05, comparado com demais grupos teste Newman-Keuls. Grupos independentes com n = 8 para cada tratamento.

COMPORTAMENTOS	Na ₂ CO ₃	ZnDPBG 5nmol	ZnDPBG 50nmol	ZnDPBG 200nmol
Extremidade	6,6±1,0	6,3±1,4	4,0±1,1	5,6±0,9
Levantamento	12,7±1,2	10,5±1,8	12,8±2,4	10,0±1,3
Espreitamento	4,7±1,2	2,8±0,9	3,8±0,4	2,5±0,5
Esquadrinhamento	7,5±1,1	5,2±1,4	6,3±1,5	2,6±0,7
Mergulho de Cabeça	6,8±1,6	1,8±0,5	3,5±1,4	5,8±1,5
Esticamento	4,2±0,5	5,8±0,5	3,5±0,7	1,6±0,8*
Rastejamento	1,8±0,3	1,8±0,5	3,1±0,9	1,6±0,6
Imobilidade	0,8±0,5	1,8±1,3	0,6±0,3	2,1±1,1
Autolimpeza	18,7±5,6	3,3±0,5*	18,0±4,3	24,0±4,6

Tabela 2: Avaliação de diferentes categorias comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam administração do substrato da enzima heme-oxigenase (Heme-lisinato) em três doses distintas (150 nmol, 300 nmol, 600 nmol) ou do veículo L-lisina. * P < 0,05, comparado com demais grupos teste Newman-Keuls. Grupos independentes com n = 8 para cada tratamento.

COMPORTAMENTOS	L-lisina	Heme 150nmol	Heme 300nmol	Heme 600nmol
Extremidade	6,1±0,6	6,7±1,8	6,7±1,8	6,7±1,8
Levantamento	10,8±1,3	11,6±1,8	11,6±1,8	9,0±1,2
Espreitamento	4,3±0,6	3,1±0,8	3,1±0,8	4,5±0,8
Esquadrinhamento	8,3±0,9	7,1±1,3	7,2±1,3	7,5±1,0
Mergulho de Cabeça	4,6±1,4	6,2±1,0	7,3±1,0	8,5±0,9
Esticamento	3,7±0,7	4,1±0,7	5,6±0,8	5,3±0,6
Rastejamento	2,1±0,5	2,1±0,2	2,6±0,3	3,5±0,5
Imobilidade	1,6±0,6	1,6±0,6	1,8±0,3	1,6±0,4
Autolimpeza	27,1±7,0*	56,7±6,8	51,3±3,6	57,6±6,7

Tabela 3: Avaliação de diferentes categorias comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam administração do substrato da enzima heme-oxigenase (Heme-lisinato 600 nmol) ou do veículo, L-lisina, precedido pelo inibidor específico da GMPc, ODQ (1,3 nmol) ou o veículo (DMSO 1%). * $P < 0,05$, comparado com demais grupos teste Newman-Keuls. Grupos independentes com $n = 8$ para cada tratamento.

COMPORTAMENTOS	ODQ +Heme	DMSO+Heme	ODQ+L-lisina	DMSO+L-lisina
Extremidade	5,3±0,6	12,3±1,5*	8,0±1,2	7,3±1,5
Levantamento	5,2±0,8*	14,2±1,8*	15,8±2,0*	17,1±2,5
Espreitamento	3,3±0,4	5,8±1,0	3,3±0,8	2,7±0,9
Esquadrinhamento	4,3±0,5*	11,7±0,9*	3,5±0,7	11,2±1,0*
Mergulho de Cabeça	3,8±0,3*	18,8±1,2*	11,3±2,2*	14,1±2,5
Esticamento	3,5±0,5*	3,1±0,3*	2,6±0,8*	0,8±0,5
Rastejamento	3,5±0,3	5,2±0,7	2,1±0,5*	4,2±1,0
Imobilidade	1,5±0,2*	2,6±0,5*	0,6±0,2	0,0±0,0
Autolimpeza	14,6±1,2	19,0±2,5	21,0±3,4	26,8±8,4

2. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste claro-escuro em ratos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a inibição inespecífica da atividade da enzima HO, por meio da administração do ZnDPBG no LC, na dose de 200 nmol aumentou o tempo gasto do compartimento claro, bem como reduziu o tempo no compartimento escuro do teste claro-escuro, sem alterar o número de transições (Figura 10). Ainda, o tratamento com o substrato da enzima HO, Heme-lisinato, nas doses de 150 nmol, 300 nmol e 600 nmol aumentou o tempo de permanência no compartimento claro (Figura 11A), sem alterar o número de transições (Figura 11C). O tratamento prévio com o inibidor específico da enzima GMPc, ODQ (1,3 nmol) bloqueou o aumento do tempo gasto no compartimento claro induzido pela administração do Heme-lisinato 600 nmol (Figura 12A).

A análise estatística dos grupos tratados com inibidor específico da enzima HO, ZnDPBG apontou que há diferença no tempo gasto no compartimento claro ($F_{3,31} = 11,931$, $P < 0,001$, ONE WAY ANOVA) e no compartimento escuro ($F_{3,31} = 11,946$, $P < 0,001$, ONE WAY ANOVA) quando comparado o grupo ZnDPBG, dose de 200 nmol ($P < 0,05$, Newman-Keuls), com os demais (Figura 10A e C), sem alterar o número de transições entre os compartimentos ($F_{3,31} = 0,617$, $P = 0,610$, ONE WAY ANOVA, Figura 10B).

Com relação aos grupos tratados com o substrato para a enzima HO, Heme-lisinato, a aplicação da ONE WAY ANOVA evidenciou diferença no tempo gasto no compartimento claro ($F_{3,31} = 15,972$, $P < 0,001$) e no compartimento escuro ($F_{3,31} = 15,985$, $P < 0,001$) quando comparados os grupos Heme-lisinato, nas distintas doses, 150 nmol, 300 nmol e 600 nmol, ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com o grupo veículo (L-lisina, Figura 11A e C). Entretanto, não há alteração do número de transições entre os compartimentos ($F_{3,31} = 0,341$, $P = 0,796$, Figura 11C).

A análise de variância (ONE WAY ANOVA) dos grupos tratados previamente com ODQ, inibidor específico da GMPc ou de seu veículo (DMSO) apontou diferença significativa no tempo gasto no compartimento claro ($F_{3,31} = 115,42$, $P < 0,001$) bem como no tempo de gasto no compartimento escuro ($F_{3,31} = 115,38$, $P < 0,001$) quando comparado o grupo DMSO+Heme ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com os demais grupos (Figura 12A e C). Porém, não há diferença entre do número de transições entre os distintos tratamentos ($F_{3,31} = 0,34$, $P = 0,79$, Figura 12B).

Figura 10: Efeito da administração intra-LC do ZnDPBG (5, 50 e 200 nmol/0,1 μl , inibidor inespecífico da enzima HO, $n = 8$ para cada dose) ou de seu veículo, Na_2CO_3 (50 mmol/0,1 μl , $n = 8$) no teste claro-escuro (TCE) em ratos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (*) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls, quando comparado com o respectivo controle (Na_2CO_3) e com os grupos ZnDPBG 5nmol e ZnDPBG 50nmol.

Figura 11: Efeito da administração intra-LC do Heme-lisinato (150, 300 e 600 nmol/0,1 μ l, substrato da enzima HO, n = 8 para cada dose) ou de seu veículo, L-lisina (14,2 μ mol/0,1 μ l, n = 8) no teste claro-escuro (TCE) em ratos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (*) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls, quando comparado com o respectivo controle (L-lisina).

□ DMSO+L-lisina ■ ODQ+L-lisina ■ DMSO+Heme ▨ ODQ+Heme

Figura 12: Efeito da administração i.c.v. do inibidor específico da enzima GMPc, ou de seu veículo (DMSO 1%) seguida pela administração intra-LC do Heme-lisinato (dose de 600 nmol/0,1 µl, n = 8 para cada grupo experimental) no teste claro-escuro (TCE) em ratos. Os dados estão apresentados como média ± EPM. (*) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls, quando comparado com o grupo DMSO+Heme com os demais. (#) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls, quando comparado com o grupo ODQ+L-lisina com os demais.

3. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Os resultados do presente estudo mostram que a inibição da enzima HO, pela administração intra-LC de ZnDPBG, nas diferentes doses não alterou a nocicepção frente um estímulo térmico agudo (Figura 13A). Em contraste, a ativação da via HO-CO, por meio do tratamento com Heme-lisinato, nas doses de 150 nmol, 300 nmol ou 600 nmol promoveu aumento do índice de analgesia no teste de retirada de cauda (IARC, Figura 13B). Ainda, o tratamento prévio i.c.v. com inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol) bloqueou o aumento do IARC promovido pelo Heme-lisinato (600 nmol) (Figura 14B), entretanto o tratamento *per se* com ODQ, seguido pelo veículo (L-lisina) não alterou o IARC (Figura 14A).

A análise estatística (TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas) das médias do IARC realizada nos grupos que receberam administração intra-LC do inibidor inespecífico da HO, ZnDPBG nas doses de 5, 50 ou 200 nmol/L ou do veículo (Na_2CO_3 , 50 mmol/L) mostrou que há diferença considerando o fator tempo ($F_{8,287} = 3,806$, $P = 0,001$), mas não há diferença no tratamento ($F_{3,287} = 2,533$, $P = 0,085$), nem interação tempo e tratamento ($F_{24,287} = 1,041$, $P = 0,417$, Figura 13A). Ainda, a análise individual de cada grupo experimental (ONE-WAY ANOVA) não apontou diferença significativa do IARC ao longo do tempo após a administração intra-LC do veículo Na_2CO_3 ($F_{8,71} = 0,257$, $P = 0,977$) ou após a administração de ZnDPBG nas doses de 5 nmol/L ($F_{8,71} = 0,933$, $P = 0,496$), 50 nmol/L ($F_{8,71} = 1,882$, $P = 0,079$) ou 200 nmol/L ($F_{8,71} = 1,770$, $P = 0,100$).

Nos grupos que receberam o tratamento intra-LC com Heme-Lisinato nas doses de 150 nmol/L, 300 nmol/L ou 600 nmol/L, a aplicação da TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas no IARC evidenciou diferença significativa no fator tempo ($F_{8,287} = 170,587$; $P < 0,001$), no tratamento ($F_{3,287} = 114,793$; $P < 0,001$), bem como interação tempo e tratamento ($F_{24,287} = 15,621$; $P < 0,001$). O teste de *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que há diferença do IARC entre os grupos Heme-lisinato, nas diferentes doses, quando comparado ($P < 0,05$) com o grupo veículo (L-lisina) já aos 15 minutos de teste perdurando por todo o período experimental (Figura 13B). Ainda, há diferença significativa do IARC nos grupos que receberam Heme-lisinato, nas diferentes doses ao longo de todo período experimental (15 min a 120 min), quando comparado com o IARC do seu respectivo controle (linha de base, Figura 13B).

Considerando os grupos que receberam administração prévia do inibidor específico da guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol) a aplicação da TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas evidenciou diferença significativa no fator tempo ($F_{8,287} = 74,085$; $P < 0,001$), no tratamento ($F_{3,287} = 53,876$; $P < 0,001$), bem como interação tempo e tratamento ($F_{24,287} = 12,024$; $P < 0,001$). O teste de *post hoc* de Newman-Keuls ($P < 0,05$) mostrou que há diferença do IARC do grupo DMSO+Heme-lisinato, quando comparado com o IARC dos grupos ODQ+Heme-lisinato, ODQ+L-lisina e DMSO+L-lisina no tempo de 15 minutos

perdurando em todo período experimental (Figura 14). Ainda, no grupo DMSO+Heme, o IARC foi diferente ao longo de todo período experimental (15 min a 30 min, Figura 14B) quando comparado com seu respectivo IARC no período controle ($P < 0,05$, Newman-Keuls).

Figura 13: Índice de Analgesia no teste de retirada de cauda em ratos (IARC). A: Efeito da administração intra-LC do ZnDPBG (5, 50 e 200 nmol/0,1 μL , inibidor inespecífico da enzima HO, $n = 8$ para cada dose) ou de seu veículo, Na_2CO_3 (50 mmol/0,1 μL , $n = 8$). B: Efeito da administração intra-LC do substrato da enzima HO, Heme-lisinato, nas doses de 150 nmol/0,1 μL , 300 nmol/0,1 μL ou 600 nmol/0,1 μL ($n = 8$ para cada dose) ou do veículo L-lisina (14,2 μmol /0,1 μL , $n = 8$). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. LB: Linha de base. (a) $P < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado o IARC ao longo do período experimental com seu respectivo controle (LB), (b) $P < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado os grupos Heme-Lisinato 150, 300 ou 600 nmol/ 0,1 μL com o grupo L-lisina.

Figura 14: Índice de Analgesia no teste de retirada de cauda em ratos (IARC). A: Efeito da administração i.c.v. do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ, 1,3 nmol/L, $n = 8$) ou do veículo (DMSO 1%, $n = 8$) seguido pelo tratamento intra-LC com L-lisina (14,2 μ mol/L). B: Efeito da administração i.c.v. do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ, 1,3 nmol/L, $n = 8$) ou do veículo (DMSO 1%, $n = 8$) seguido pelo tratamento intra-LC com Heme-lisinato (600 nmol/0,1 μ L). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. LB: Linha de base. (a) $P < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado o IARC ao longo do período experimental com seu respectivo controle (LB), (b) $P < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado o grupos DMSO+Heme-Lisinato com ODQ+Heme.

4. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção inflamatória avaliada pelo teste de formalina em ratos.

Os resultados do presente trabalho mostram que a administração intra-LC do inibidor específico da enzima heme-oxigenase, ZnDPBG promoveu aumento da nocicepção inflamatória avaliada no teste da formalina (Figura 15), evidenciada pelo aumento de sacudidas na fase 2 do teste de formalina. Entretanto, a administração isolada do substrato da enzima HO, Heme-lisinato não alterou os comportamentos nociceptivos (sacudidas e lambidas) nas fases 1 e 2 do teste da formalina (Figura 16). Ainda, o tratamento i.c.v. com o inibidor da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ (seguido do veículo L-lisina) reduziu o número de sacudidas nas fases 1 e 2 do teste da formalina (Figura 17).

A análise estatística (TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas) dos grupos que receberam administração intra-LC do inibidor inespecífico da HO, ZnDPBG, nas doses de 5 nmol, 50 nmol e 200 nmol evidenciou diferença significativa no comportamento de sacudidas no fator tempo ($F_{1,55} = 21,837$, $P = 0,003$), no tratamento ($F_{3,55} = 5,854$, $P = 0,006$), bem como interação entre tempo e tratamento ($F_{3,55} = 6,020$, $P = 0,005$). A aplicação do teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença entre a média do número de sacudidas quando comparados os grupos ZnDPBG 5 nmol e ZnDPBG 200 nmol na fase 2 do teste de formalina com o grupo veículo (Na_2CO_3) e ZnDPBG 50 nmol (Figura 15A). Considerando o comportamento de lambidas, a análise estatística evidenciou diferença significativa no fator tratamento ($F_{3,55} = 4,878$, $P = 0,012$), porém não há diferença no fator tempo ($F_{1,55} = 0,438$, $P = 0,533$), nem interação entre tempo e tratamento ($F_{3,55} = 0,0663$, $P = 0,977$). A aplicação do teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença entre os tratamentos ZnDPBG 5 nmol, ZnDPBG 50 nmol e ZnDPBG 200 nmol quando comparados com o grupo veículo (Na_2CO_3). Entretanto, a aplicação da ONE-WAY ANOVA considerando o fator tratamento não apontou diferença nas fases 1 ($F_{3,28} = 1,089$, $P = 0,372$) ou 2 ($F_{3,28} = 0,729$, $P = 0,545$, Figura 15B).

Com relação aos grupos que receberam administração intra-LC do substrato da enzima HO, Heme-lisinato nas doses de 150 nmol, 300 nmol ou 600 nmol, a aplicação da TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas na média do número de sacudidas evidenciou que não há diferença no fator tempo ($F_{1,63} = 0,0373$, $P = 0,852$), no tratamento ($F_{3,63} = 1,670$, $P = 0,204$), nem interação entre tempo e tratamento ($F_{3,63} = 1,560$, $P = 0,229$, Figura 16A). Considerando o comportamento de lambidas, nas fases 1 e 2 do teste de formalina nos grupos tratados com Heme-lisinato a análise estatística (TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas) apontou diferença no fator tempo ($F_{1,63} = 125,295$, $P < 0,001$), mas não há diferença no tratamento ($F_{3,63} = 1,587$, $P = 0,222$), nem interação entre tempo e tratamento ($F_{3,63} = 0,844$, $P = 0,485$, Figura 16B). A aplicação do teste *post hoc* de Newman-Keuls evidenciou que há diferença ($P < 0,05$) entre a fase 1 e a fase 2 do teste de formalina, porém não há diferença entre os distintos tratamentos.

A análise estatística (TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas) dos grupos que receberam administração i.c.v. do inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol), ou do seu veículo (DMSO 1%) seguido pela administração intra-LC do substrato da enzima HO, Heme-lisinato (600 nmol) ou do veículo (L-lisina) apontou diferença significativa no fator tempo ($F_{1,47} = 28,753$, $P = 0,003$), no tratamento ($F_{3,47} = 7,274$, $P = 0,003$), mas não há interação tempo-tratamento ($F_{3,47} = 0,549$, $P = 0,656$) considerando o número de sacudidas. A aplicação do teste *post hoc* de Newman-Keuls evidenciou diferença entre a fase 1 e fase 2 do teste de formalina, ainda apontou diferença entre o grupo ODQ+L-lisina quando comparado ($P < 0,05$) com DMSO+L-lisina e ODQ+Heme (Figura 17A). A aplicação da ONE-WAY ANOVA considerando o fator tratamento evidenciou que há diferença na média de sacudidas na fase 1 ($F_{3,28} = 11,729$, $P < 0,001$) e na fase 2 ($F_{3,28} = 4,517$, $P = 0,012$) quando comparado o grupo ODQ+L-lisina ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com os grupos DMSO+L-lisina, ODQ+Heme e DMSO+Heme na fase 1, e com os grupos DMSO+L-lisina, ODQ+Heme na fase 2 (Figura 17A). Em contraste, a análise estatística (TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas) do comportamento de lambidas mostrou diferença no fator tempo ($F_{1,47} = 8,648$, $P = 0,032$), mas não no fator tratamento ($F_{3,47} = 1,395$, $P = 0,283$) nem interação entre tempo e tratamento ($F_{3,47} = 1,867$, $P = 0,179$). A aplicação do teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença significativa da média do número de lambidas entre a fase 1 e fase 2 do teste da formalina (Figura 17B).

Figura 15: Efeito da administração intra-LC do ZnDPBG (inibidor inespecífico da enzima HO), nas doses de 5 nmol/0,1µl (n = 7), 50 nmol/0,1µl (n = 7) e 200 nmol/0,1µl (n = 7), ou do veículo (Na_2CO_3 /50 mmol/0,1µl, n = 8) nos comportamentos nociceptivos de sacudidas (A) ou lambidas (B) avaliados nas fases 1 e 2 do teste de formalina em ratos. * $P < 0,05$, Newman-Keuls, quando comparado com os grupos Na_2CO_3 e ZnDPBG 50 nmol.

Figura 16: Efeito da administração intra-LC do Heme-lisinato (substrato da enzima HO), nas doses de 150 nmol/0,1µl (n = 8), 300 nmol/0,1µl (n = 8) e 600 nmol/0,1µl (n = 8), ou do veículo (L-lisina, 14,2 µmol/0,1 µl, n = 8) nos comportamentos nociceptivos de sacudidas (A) ou lambidas (B) avaliados nas fases 1 e 2 do teste de formalina em ratos.

□ DMSO+L-lisina ■ ODQ+L-lisina ■ DMSO+Heme ▨ ODQ+Heme

Figura 17: Efeito da administração i.c.v. do inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol/0,1µl, n = 8), ou do veículo DMSO 1% seguido pela administração intra-LC de Heme-lisinato (600 nmol/0,1µl, n = 8), ou do veículo (L-lisina, 14,2 µmol/0,1 µl, n = 8) nos comportamentos nociceptivos de sacudidas (A) ou lambidas (B) avaliados nas fases 1 e 2 do teste de formalina em ratos. * $P < 0,05$, Newman-Keuls, quando comparado com o grupo ODQ+L-lisina com os demais grupos.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

1. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na modulação da ansiedade avaliada pelo teste de labirinto em cruz elevado e teste claro-escuro em ratos.

Os resultados do presente trabalho mostram que a atividade da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus pode modular a ansiedade avaliada pelo teste de labirinto em cruz elevado e pelo teste claro-escuro em ratos. Em particular, observa-se que a administração intra-LC do substrato para a enzima heme-oxigenase, Heme lisinato, aumentou o tempo de permanência, bem como a média de entradas nos braços abertos do LCE (Figura 8) e o tempo de permanência no compartimento claro do TCE (Figura 10). Estes resultados sugerem que a ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus promove ação ansiolítica. Adicionalmente, este efeito ansiolítico foi bloqueado pelo tratamento prévio com o inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel (ODQ) demonstrando que esta ação é dependente da ativação do GMPc intracelular (Figuras 9 e 12). Entretanto, a administração *per se* do ODQ, não alterou os comportamentos analisados no LCE e ou no TCE. Assim, é possível sugerir que a via HO-CO-GMPc não participa de forma tônica na modulação do comportamento emocional, em especial da ansiedade. É importante ressaltar que a combinação de dois testes para avaliação do comportamento emocional é fundamental para a melhor compreensão e credibilidade dos resultados obtidos, em particular considerando testes que são fundamentados na exploração livre de ambientes aversivos, tais como o teste do labirinto em cruz elevado e o teste de claro-escuro (Ramos e cols., 2008; Li e cols., 2004; 2005).

Estudos anatômicos mostraram que o locus coeruleus (LC) é o maior de todos os núcleos noradrenérgicos encefálicos. Em adição, o sistema noradrenérgico, em especial o LC, é um sistema intimamente correlacionado com estados atencionais, ciclo sono/vigília, aprendizado e memória, reprodução, comportamentos emocionais e situações estressantes, bem como modulação do medo e da ansiedade (Berridge & Waterhouse, 2003; Sara, 2009). Dentro desta perspectiva, achados clínicos sugerem a relação entre o sistema noradrenérgico central com estados de medo/ansiedade ou depressão em seres humanos, desde que o tratamento com o agonista α_2 -adrenérgico, clonidina, é efetivo no tratamento de pacientes portadores de distúrbios de ansiedade, enquanto que a administração do antagonista α_2 -adrenérgico exacerba os sintomas emocionais (Charney, 2003).

Embora evidências corroborem a participação do sistema noradrenérgico na modulação do comportamento emocional, os mecanismos desta modulação ainda necessitam ser esclarecidos. Considerando estudos funcionais robusta ativação do LC é observada em gatos submetidos a situações de estresse (Rasmussen & Jacobs, 1986), bem como ocorre aumento da expressão de *c-fos* nesta região e em outros núcleos noradrenérgicos em camundongos expostos à situações de estresse (Pirnik e cols., 2004).

Porém, estudos realizados em modelos animais ainda não esclareceram se o LC é integrante essencial na modulação das respostas relacionadas com medo e ansiedade (Itoi & Sugimoto, 2010). Nesta linha de investigação, estudo prévio (Lähdesmäki e cols., 2002) mostrou que camundongos knockout para receptores α_2 A-adrenérgicos apresentaram aumento da ansiedade avaliada no teste do labirinto em cruz elevado, sugerindo que estes receptores são importantes para o balanço da emocionalidade, possivelmente atuando como protetor contra estados de desordens da ansiedade e da depressão. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, é possível sugerir que administração do Heme-lisinato, o qual aumenta a atividade da via HO-CO-GMPc, promoveu efeito ansiolítico observado pelo aumento da porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos. Ainda, o efeito do tratamento com Heme-lisinato foi bloqueado pela prévia administração do inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel, sugerindo que o mecanismo de ação desencadeado envolve a formação intracelular de GMPc. Assim, pode-se hipotetizar que a administração intra-LC do Heme-lisinato promoveu aumento da atividade de neurônios noradrérgicos locais resultando em efeito ansiolítico. De fato, estudos clínicos prévios mostram que a administração de agonistas α_2 -adrenérgico produz efeitos ansiolíticos em pacientes com desordens de ansiedade generalizada (Charney, 2003).

Os circuitos pelos quais o sistema noradrenérgico participa da modulação emocional tem sido investigados nas últimas décadas (Pacák & Palkovits, 2001; Itoi e cols., 2004, Radley e cols., 2008, Ziegler e cols., 1999, Tanaka e cols., 1985). Dentro desta perspectiva, têm sido apontado que o sistema noradrenérgico é um dos importantes moduladores da regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, principalmente atuando sobre a liberação do fator liberador de corticotropina (CRF) em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Pacák & Palkovits, 2001; Itoi e cols., 2004). Além disso, Ziegler e cols. (1999) mostraram que a lesão de neurônios catecolaminérgicos do LC pela administração de 6-hidroxidopamina atenuou a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) em animais submetidos ao estresse de restrição física. Considerando estes achados anatômicos, é possível que a ativação de neurônios noradrenérgicos do LC promova inibição de neurônios do córtex pré-frontal desinibindo eferências GABAérgicas desta região, as quais por sua vez levam a ativação do PVN e consequentemente ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Radley e cols., 2008).

Diferentes evidências mostraram que o estresse de imobilização, induz marcada liberação de noradrenalina em distintas regiões encefálicas, em particular no hipotálamo, na amígdala (Tanaka e cols., 1982, 1983) e no locus coeruleus (Tanaka e cols., 1985). Em conjunto, estes achados sugerem que o aumento da atividade noradrenérgica está envolvida na modulação de estados emocionais, induzidos por estresse, sugerindo que a alteração da neurotransmissão noradrenérgica pode ser responsável pelos estados de medo e ansiedade induzidos por exposição a situações de estresse (Tanaka, 1992; Tanaka e cols., 2000). Estudos iniciais realizados por Redmond e cols. (1976) mostraram que a estimulação elétrica do LC em

macacos resultou em comportamentos observados em situação de medo intenso, entretanto, em ratos, estudos mostraram resultados contrários (Mason & Fibiger, 1979; Lapid e cols., 2001). Em particular, a depleção de noradrenalina em ratos resultou em aumento do medo e da ansiedade (Mason & Fibiger, 1979), bem como, a lesão química de neurônios noradrenérgicos do LC promoveu redução de comportamentos ansiogênicos avaliados no LCE (Lapid e cols., 2001). Considerando o substrato anatômico, é possível que o envolvimento do LC na modulação dos estados de medo e ansiedade ocorra por meio de eferências para o núcleo basolateral da amígdala (McGaugh, 2004), sendo que a atividade de neurônios do LC promove efeito inibitório predominante nos neurônios localizados nesta região (Chen & Sara, 2007).

De acordo com Weiss e cols. (1994), estudos realizados com modelos animais sugerem que, contrariamente a uma teoria inicial descrita por Redmond e cols. (1976), onde o aumento da atividade dos neurônios do LC resulta em aumento do medo e da ansiedade, a atividade do sistema noradrenérgico do LC relaciona-se com redução da ansiedade e do medo. Porém, de acordo com Crow e cols. (1978) ratos submetidos à lesão neurotóxica por meio da injeção de 6-hidroxidopamina no LC, mostraram atividade motora normal, exploração, habituação normal e não mostraram qualquer evidência de maior suscetibilidade a estímulos auditivos. No teste de interação social, estes animais apresentaram diminuição nos contatos sociais numa situação pouco habitual (interpretado como uma resposta à ansiedade) e de magnitude semelhante ao observado no grupo controle. Estes achados são incompatíveis com a hipótese de que o locus coeruleus seja parte integrante dos mecanismos fisiológicos que controlam o comportamento motor ou ansiedade. Desta forma, são necessários mais estudos para se esclarecer o papel do locus coeruleus na mediação de respostas emocionais.

Considerando que o CO possui atividade funcional semelhante ao NO (Maines, 1992), e que no LC há maior quantidade da enzima HO em comparação com a enzima NOS, é possível que no LC, o aumento da atividade do GMPc seja mediado pela atividade do CO (Soriano e cols., 2010) e não pelo neuromodulador gasoso NO. Além disso, várias evidências apoiam o envolvimento do NO na modulação de comportamento emocionais (Quock & Nguyen, 1992; Wiley e cols., 1995; Volke e cols., 1997). Porém, os achados são contraditórios considerando o envolvimento do NO. Desta forma, estudos de Pokk & Väli (2002) mostraram que o tratamento sistêmico com o 7-NI (inibidor da NO sintase) induziu um efeito ansiolítico evidenciado pelo aumento no número de entrada nos braços abertos, porcentagem de entrada nos braços abertos e no tempo despendido nesses braços em camundongos avaliados no teste do LCE. Em contraste, o tratamento com o inibidor da NO sintase (L-NAME) diminuiu o total do número de entradas nos braços abertos induzindo um efeito ansiogênico. Estudos de Quock & Nguyen (1992) mostraram que os efeitos ansiolíticos do clordiazepóxido (agonista de receptores benzodiazepínicos) em camundongos no LCE foram antagonizados pelo pré-tratamento sistêmico com o inibidor da NOS, (L-NOARG), este efeito

inibitório foi completamente revertido pela administração intracerebroventricular de L-arginina, mas não do D-arginina.

Li & Quock (2002) mostraram que a administração i.c.v. com SIN-1 (doador de NO), significativamente aumentou o tempo gasto no compartimento claro, mas não o número de transições entre os compartimentos, no teste de claro-escuro realizado em camundongos. É importante destacar que o teste claro-escuro fundamenta-se na tendência natural dos roedores de evitar áreas iluminadas (Hascoët e cols., 2001). Neste paradigma, os agentes ansiolíticos aumentam a quantidade de tempo gasto no compartimento iluminado. A avaliação do número de transições representa um índice de comportamento locomotor. Além disso, o tempo gasto no compartimento iluminado é sensível a ação ansiolítica de drogas (Hascoët & Bourin, 1998), sendo este parâmetro considerado um importante índice para avaliação da ansiedade.

Considerando os resultados do presente estudo, a administração do ZnDPBG (50 nmol), observou-se um aumento da média de entradas nos braços fechados do teste do labirinto em cruz elevado, o que poderia sugerir aumento da atividade locomotora, entretanto, não há qualquer outra alteração nos parâmetros avaliados neste teste (porcentagem de tempo dos braços abertos e média de entradas nos braços abertos), os quais indicariam alteração do comportamento emocional. Por outro lado, o tratamento com ZnDPBG (200 nmol), aumentou o tempo no compartimento claro do TCE, sem alterar o número de transições entre os compartimentos claro-escuro, ou seja, não há alteração do comportamento locomotor. Estes achados são contraditórios, e podem sugerir efeito inespecífico do ZnDPBG, nos testes de avaliação do comportamento emocional. Ainda, na avaliação das medidas etológicas (Tabela 1) não há alteração significativa dos parâmetros comportamentais avaliados no teste do LCE. É importante destacar que não há na literatura outros estudos comportamentais com o uso do ZnDPBG.

Em estudo prévio que utilizou o tratamento i.p com ODQ, mostrou que o inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel antagonizou o efeito ansiolítico do HBO₂ (oxigênio hiperbárico) no teste claro-escuro em camundongos (Carlile e cols., 2012). Os resultados do presente estudo corroboram estes achados desde que o tratamento prévio i.c.v. com ODQ bloqueou o efeito ansiolítico da administração intra-LC de heme-oxigenase avaliado no teste do LCE e do TCE em ratos. Assim, presente trabalho é pioneiro em demonstrar que o neuromodulador gasoso CO no LC pode modular estados emocionais, via GMPc e possivelmente pela modulação do sistema noradrenérgico. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar a interação da via HO-CO-GMPc com os demais sistemas de neurotransmissores envolvidos nas respostas de medo e ansiedade.

2. Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO-GMPc do locus coeruleus na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda e na nocicepção inflamatória avaliada pelo teste de formalina em ratos.

A respeito da modulação nociceptiva realizada pela via HO-CO-GMPc do locus coeruleus, os resultados do presente estudo mostram que a ativação da via, por meio da administração do substrato para a enzima HO, Heme-lisinato, promove efeito antinociceptivo no teste de retirada de cauda (estímulo nocivo agudo térmico, Figura 13B), o qual é bloqueado pelo pré-tratamento i.c.v. com inibidor específico da enzima guanilase ciclase solúvel (Figura 14B). Em contraste, no teste da formalina, o qual avalia a nocicepção inflamatória frente a estímulo nocivo químico, os resultados mostram que o tratamento com o inibidor inespecífico da HO, ZnDPBG, promoveu efeito hipernociceptivo, em particular na fase inflamatória do teste (Fase 2, Figura 15). Adicionalmente, a administração intra-LC do Heme-lisinato não alterou significativamente os comportamentos nociceptivos (sacudidas e lambidas), em todas as doses utilizadas (Figura 16). Além disso, o tratamento i.c.v. do inibidor específico da GCs, ODQ reduziu o número de sacudidas nas fases 1 e 2 do teste de formalina (Figura 17). Juntos, os nossos resultados sugerem que, enquanto a antinocicepção térmica aguda realizada pela ativação da via HO-CO-GMPc do LC depende da ativação do GMPc, a hipernocicepção inflamatória promovida pelo bloqueio da enzima HO pode ocorrer por mecanismo alternativo independente da ativação do GMPc.

Os resultados do presente estudo corroboram estudo prévio de Carvalho e cols. (2011) onde mostraram que a administração i.c.v. do ZnDPBG (50 nmol ou 200 nmol/4 µl) não alterou o IARC no teste de retirada de cauda. Enquanto que a administração i.c.v. do Heme-lisinato (150, 300 e 600 nmol) produziu um claro efeito antinociceptivo, o qual também foi bloqueado pelo tratamento prévio com inibidor específico da enzima GCs. Em conjunto, estes dados sugerem que a via HO-CO-GMPc, agora em particular do locus coeruleus, está intimamente relacionada com a modulação da nocicepção térmica aguda, promovendo efeito antinociceptivo.

Considerando a nocicepção inflamatória, estudos anteriores têm demonstrado que o bloqueio da enzima heme-oxigenase por meio da administração do ZnDPBG *per se* promove efeito hipernociceptivo no teste da formalina (Nascimento & Branco, 2007 e 2008) ou na hipersensibilidade mecânica (Steiner & Branco, 2001), semelhante ao observado no presente estudo. Nestes trabalhos, a administração de ZnDPBG local (intra-plantar) ou intra-tecal promoveu aumento do comportamento nociceptivo avaliado pelo teste da formalina intrapodal (Nascimento & Branco, 2007 e 2008). Em adição, Nascimento & Branco (2009) mostra que a administração conjunta de doses sem efeito de ZnDPBG, intra-tecal e local (intra-plantar) pode promover o mesmo efeito hipernociceptivo, sugerindo sinergismo na modulação nociceptiva inflamatória pela atividade da enzima heme-oxigenase. Dentro desta perspectiva, Li & Clark (2000) mostraram que o inibidor seletivo da enzima heme-oxigenase (Sn-P) administrado subcutaneamente reduziu a fase 1 e 2 do

teste de formalina em camundongos de forma dose-dependente. Por outro lado, a injeção intratecal do inibidor da NOS (L-NAME), e assim, promovendo modulação do GMPc intracelular, reduziu o comportamento nociceptivo promovido pela administração de formalina injetada na pata posterior (Li & Clark, 2001). Estes resultados podem ir ao encontro dos achados do presente estudo que demonstram que a administração i.c.v. do inibidor da enzima GCs, ODC, promove redução do número de sacudidas na Fase 1 e 2 do teste de formalina.

É importante ressaltar que embora não foi observado alteração dos comportamentos nociceptivos no teste da formalina pela administração intra-LC do substrato da via HO-CO (Heme-lisinato), o claro efeito hipernociceptivo promovido pelo inibidor inespecífico da enzima HO, ZnDPBG sugere o envolvimento do neuromodulador gasoso CO, produto da degradação do grupo heme pela enzima HO, na regulação nociceptiva inflamatória, desde que a redução da formação de CO intra-LC, pelo bloqueio da enzima HO, é capaz de promover aumento do número de sacudidas nas fases 1 e 2 da formalina intra-podal.

Contrastando com nossos achados, em meados da década de 90, os primeiros relatos descrevendo a possível participação da via HO-CO em processos nociceptivos, sugeriam que a administração do inibidor da via era um agente promotor de antinocicepção (Meller e cols., 1994; Yamamoto e cols., 1995). Outros autores também demonstraram que a administração sistêmica do inibidor HO seria capaz de reduzir o comportamento de dor, em variados modelos experimentais (Li & Clark, 2000a, 2001a, 2004b).

Diante desta divergência de resultados em relação aos nossos experimentos, é necessário ressaltar que tais achados experimentais foram obtidos por diferentes formas de administração dos fármacos em estudo, ou seja, a ativação, a inibição ou simples ausência de ação demonstrada, foram obtidos em diferentes vias de administração de drogas. Esta possível diferença do efeito do inibidor da via HO em diferentes vias de administração, já foi apresentado por Steiner e cols. (1999) no controle da resposta febril. Neste estudo, os autores demonstraram que o tratamento i.c.v. com ZnDPBG bloqueou a resposta febril desencadeada pelo estresse agudo, enquanto que a administração intraperitoneal da mesma droga, não foi capaz de estimular qualquer tipo de resposta sobre o comportamento febril.

Outra justificativa plausível a se considerar com relação aos efeitos hipernociceptivos do tratamento com ZnDPBG no teste da formalina, e antinociceptivo do Heme-lisinato no teste de retirada de cauda, referem-se aos modelos experimentais utilizados, os quais envolvem mecanismos distintos de dor, associados a resposta inflamatória (administração de formalina ou carragenina intra-plantar) ou exposição a diferentes modelos de dor (incisional, neuropática ou aguda diante de um estímulo térmico nocivo) (Meller e cols., 1994; Li & Clark, 2003; Carvalho e cols., 2011). É importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre nocicepção em roedores utiliza o teste de retirada de cauda assumindo que a resposta nociceptiva seja unimodal. Porém, sabe-se que a dor, como fenômeno polimodal, é bem ilustrada pelas respostas sequenciais observadas após lesão, na qual a injúria aguda resulta em dor tipicamente localizada, resultante da ativação

das fibras A δ , enquanto posteriormente a dor profunda, mais intensa e mais difícil de localizar, é resultante da ativação das fibras C. Além disso, algumas observações merecem destaque em relação ao teste de retirada de cauda. Em geral, os testes fundamentados em estimulação térmica são mais seletivos em estimular receptores cutâneos, dessa forma, categorias específicas de receptores e fibras podem ser excitados (de acordo com intensidades crescentes do estímulo, são ativadas fibras A-beta, A δ e finalmente fibras C). Considerando essas informações, uma fonte de calor radiante de intensidade crescente irá resultar em sequência organizada a ativação de receptores, que consiste primeiramente na ativação de termorreceptores, termorreceptores e nociceptores, e então, somente nociceptores (Le Bars e cols., 2001). Desta maneira, é necessário cautela na avaliação de resultados experimentais obtidos de diferentes modelos nociceptivos considerando o envolvimento do CO na modulação da sensibilidade nociceptiva.

Nascimento & Branco (2007 e 2008) em seus trabalhos discutem que o efeito antinociceptivo do Heme-lisinato, provavelmente resulta da ação do CO na primeira sinapse da medula espinal e/ou no neurônio aferente de segunda ordem, aumentando os níveis intracelulares da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Assim, a ação modulatória da via HO-CO-GMPc pode ser não apenas na atividade ou na liberação de mediadores inflamatórios (Steiner e Branco, 2001; Nascimento e Branco, 2007 e 2009), mas também em nociceptores, nas fibras excitáveis e na sensibilização espinal. Possivelmente a modulação nociceptiva pela atividade da via HO-CO-GMPc é devido ao aumento dos níveis intracelulares de GMPc desde que o tratamento intra-tecal com Heme-lisinato é bloqueado pela pré-administração no mesmo sítio de azul de metileno (inibidor da GCs). Nossos resultados corroboram estes achados, pois o tratamento i.c.v. com ODQ, inibidor específico da GCs, bloqueia a antinocicepção induzida pelo Heme-lisinato intra-LC no teste de retirada de cauda. De fato, evidências experimentais apontam que a atuação do CO em diversos processos biológicos, inclusive os ligados à nocicepção, pode ocorrer pela alteração de GMPc intracelular, sendo esta modulação mediada pela ativação da GCs. Além da ativação da GCs e dos níveis de GMPc, estudos associam a ação do CO à ativação de distintos canais iônicos na membrana celular (Wang & Wu, 1997), em particular da ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio (Williams e cols., 2004, 2008).

Nossos dados reforçam a hipótese de que o GMPc intracelular pode modular a resposta nociceptiva. (Meller & Gebhart, 1993, Duarte & Ferreira, 1992, Nascimento & Branco, 2007 e 2008). No entanto, a alteração dos níveis intracelulares de GMPc pode resultar em efeitos pró ou antinociceptivos, dependendo da magnitude do aumento do GMPc, bem como do local, ou seja, periférico, na medula espinal ou supra-espinal. Desta maneira, tem sido demonstrado que o aumento na medula espinal da atividade do GMPc promove inibição da atividade de neurônios espinhais, principalmente de neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinal (Manjarrez e cols., 2001, Pehl & Schmid, 1997, Hoheisel e cols., 2000). Em contraste, Hoheisel e cols. (2005) demonstraram que o aumento supra-espinal dos níveis de GMPc

promoveu excitação em neurônios localizados no corno da medula espinal, sugerindo provável efeito pró-nociceptivo.

Trabalhos ressaltam que os níveis de GMPc podem ser alterados por diferentes vias e fatores. Considerando que em nossos experimentos o aumento do GMPc foi promovido pela maior ativação da via HO-CO-GMPc, e que a ativação da GCs pelo CO aumenta em pequena proporção (Bustyn e cols., 1995), é possível que também supra-espinal o GMPc possa ter efeito *dual*, ou seja, altos níveis de GMPc tenha efeito pró-nociceptivo (Hoheisel e cols., 2005), enquanto que alteração de menor magnitude dos níveis de GMPc supra-espinal resulte em efeito antinociceptivo, como evidenciado pelo aumento do IARC após administração do Heme-lisinato, sendo tal efeito bloqueado pelo pré-tratamento com ODQ (inibidor seletivo da GCs).

Sabe-se que os gasotransmissores (CO e NO) possuem propriedades semelhantes durante a ativação da GC e regulação de GMPc (Dawson & Snyder, 1994; Maines, 1997; Pong & Eldred, 2009). Ainda, foi demonstrado atuação conjunta dos gasotransmissores, desde que o CO potencialize ou iniba a ativação de GCs mediada pelo NO *in vitro* e assim, influenciar as concentrações endógenas de GMPc (Ingi e cols., 1996). Neste contexto, estudos também apontam que estes gasotransmissores nem sempre funcionam de forma independente, atuando em conjunto, sendo esta associação complexa, dinâmica e adaptável (Pong & Eldred, 2009).

Diante dos dados fornecidos por nosso estudo, podemos sugerir que a neuromodulação pelo CO no LC promove respostas antinociceptivas avaliadas pelo teste de retirada de cauda e teste de formalina. Este achado apresenta novas evidências acerca dos mecanismos envolvidos na modulação da nocicepção, sendo estudo pioneiro sobre a hipótese da possível participação da via HO-CO-GMPc do LC na nocicepção térmica e inflamatória, e possivelmente contribuirá no embasamento de investigações futuras.

CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÃO

Fundamentado nos resultados obtidos neste trabalho podem ser sumarizadas as seguintes conclusões:

- O aumento da produção do neuromodulador gasoso CO no locus coeruleus, pela ativação da via HO-CO-GMPc com Heme-lisinato, promove claro efeito ansiolítico avaliado no teste do labirinto em cruz elevado e no teste de claro escuro, evidenciado pelo aumento do tempo de permanência e pelo aumento do número de entradas nos braços abertos do LCE, e pelo aumento tempo de permanência no compartimento claro do TCE.
- O efeito ansiolítico promovido pela ativação da via HO-CO do LC é dependente da atividade de GMPc intracelular, desde que o tratamento i.c.v. com inibidor específico da enzima GCs bloqueou os efeitos do Heme-lisinato no LCE e no TCE.
- A ativação da via HO-CO-GMPc por meio da administração intra-LC do Heme-lisinato (150, 300 e 600 nmol) promoveu efeito antinociceptivo frente estímulo térmico agudo (teste de retirada de cauda em ratos), sendo este efeito dependente da atividade do GMPc, desde que o pré-tratamento com o inibidor da enzima guanilase ciclase solúvel, ODQ, bloqueou o aumento do IARC.
- O bloqueio da via HO-CO promove efeito hipernociceptivo em modelo de dor inflamatória, desde que o tratamento intra-LC com inibidor inespecífico da HO, ZnDPBG aumenta o número de sacudidas no teste de formalina intra-podal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; MELACK, R.; SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests mediated by different neural systems. **Exp. Neurol.**, 75: 644-665, 1982a.
- ABBOTT, F.V.; MELZACK, R.; LEBER, B.F. Morphine analgesia and tolerance in the tail-flick and formalin tests: dose-response relationships. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 17:1213-1219, 1982b.
- ABBOTT, F.V.; TENG, C.J. The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. **Pain**, 76: 337-347, 1998.
- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, 60: 91-102, 1995.
- ABRAHAM, N.G.; LIN, J.H.C.; SCWARTZMAN, M.L.; LEVERE, R.D.; SHIBAHARA, S. The physiological significance of heme oxygenase. **Int. J. Biochem.**, 20(6): 543-558, 1988.
- ABRAHAM, N.G. Molecular regulation-biological role of heme in hematopoiesis. **Blood Rev.**, 5: 19-28, 1991.
- ABRAHAM, N.G.; KAPPAS, A. Pharmacological and clinical aspects heme oxygenase. **Pharmacol.**, 60: 79-127, 2008.
- ALAM, J.; DEN, Z. Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.**, 267: 21894-21900, 1992.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing, 1994.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.
- APPLEBAUM, P.S. Controlling prescriptions of benzodiazepines. **Hosp. Comm. Psych.**, 43: 12-13, 1992.
- ASHTON, J.C. Neuropathic pain: Na evolutionary hypothesis. **Med. Hypoth.**, 78: 641-643, 2012.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quim. Nova.**, 28: 1046-1054, 2005.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annu. Neurol.**, 4: 451-462, 1978.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Ann. Rev. Neurosci.**, 7: 309-338, 1984.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control mechanisms. In: **Wall e Melzack's textbook of pain**, 2th. ed. Churchill Livingstone, p. 206-227, 1989.

- BAUMANN, T.J.; STRICKLAND, J. Pain Management. In: DIPIRO, J.T.; TALBERT, R.L.; YEE, C.G.; POSEY, L.M. **Pharmacotherapy “A Pathophysiologic Approach”**. 7th ed. The Macgraw-Hill Companies: USA, 2008, p.989.
- BEITZ, A.J.; CLEMENTS, J.R.; ECRLUND, L.J.; MULLET, M.M. The nuclei of origin of brainstem enkephalin and cholecystokinin projections to the spinal trigeminal nucleus of the rat. **Neuroscience**, 20: 409-425, 1987.
- BEITZ, A.J.; CLEMENTS, J.R.; MULLET, M.A.; ECRLUND, L.J. Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. **J. Comp. Neurol.**, 250: 498-509, 1986.
- BERRIDGE, C.W.; WATERHOUSE, B.D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of a behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Res. Rev.**, 42: 33-84, 2003.
- BODNAR, R.J. Supraspinal circuitry mediating opioid antinociception: antagonist and synergy studies in multiple sites. **J. Biomed. Sci.**, 7(3): 181-94, 2000.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive- recuperative model of fear and pain. **Behav. Brain Sci.**, 3: 291-323, 1980.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. of Pharm.**, 463: 55-65, 2003.
- BOUWKNECHT, J.A.; PAYLOR, R. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains. **Behavioral Brain Res.**, 136: 489-501, 2001.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Rev. of Psychol.** 39: 43-68, 1988.
- BLANCHARD, D.C. Stimulus and environmental control of defense behaviors. In: BOUTON, M.; FANSELOW, M. eds. The functional behaviorism of Robert C. Bolles: Learning, motivation and cognition. Washington, DC: **American Psychological Association** p. 283-305, 1997.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 25: 205-218, 2001.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Eur. J. Pharmacol.**, 463: 97-116, 2003.
- BRANDÃO, M. L.; VIANNA, D. M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 25(2): 36-41, 2003.
- BRITO, G.A.C.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.L.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, S.H.; RIBEIRO, R. A. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine/NO/CGMP/PKG/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Eur. J. Neurosci.**, 24: 1175-1181, 2006.

- BURSTYN, J.N.; YU, A.E.; DIERKS, E.A.; HAWKINS, B.K.; DAWSON, J.H. Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II) sGC and Fe(II) sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme. **Biochemistry**, 34: 5896-5903, 1995.
- CABLE, E.E.; GILDEMEISTER, O.S.; PEPE, J.A.; LAMBRECHT, R.W.; BONKOVSKY, H.L. Mechanism of induction of heme oxygenase by metalloporphyrins in primary chick embryo liver cells: evidence against a stress-mediated response. **Mol. Cell. Biochem.**, 169: 13-20, 1997.
- CANTERAS, N.S. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 25(II): 21-24, 2003.
- CAO, L.; BLUTE, T.A.; ELDRED, W.D. Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. **Res. Neurosci.**, 17: 319-329, 2000.
- CARLILE, E.D.; SHIRACHI, D.Y.; QUOCK, R.M. An anxiolytic-like effect of hyperbaric oxygen in the mouse light/dark exploration test. **Life Sciences**, 90: 267-271, 2012.
- CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur. J. Pharmacol.**, 463: 235-272, 2003.
- CARTENS, E.; GILLY, H.; SCHREIBER, H.; ZIMMERMANN, M. Effects of midbrain stimulation and iontophoretic application of serotonin, noradrenaline, morphine and GABA on electrical thresholds of afferent C- and A- fibre terminals in cat spinal cord. **Neuroscience**, 21(2): 395-406, 1987.
- CARVALHO, P.G.; BRANCO, L.G.S.; LEITE-PANISSI, C.R.A. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. **Brain Res.**, 1385: 107-113, 2011.
- CASTILHO, V.M.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacology**, 165: 77-85, 2002.
- CHARNEY, D.S. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. **Acta Psych. Scand.**, 108: 38-50, 2003.
- CHEN, F.J.; SARA, S.J. Locus coeruleus activation by foot shock or electrical stimulation inhibits amygdala neurons. **Neuroscience**, 144: 472-481, 2007.
- CLARK, F.M.; PROUDFIT, H.K. The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulate nociception. **Brain Res.**, 616: 200-210, 1993.
- COBURN, R.F.; WILLIAMS, W.I.; KAHN, S.B. Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. **J. Clin. Investig.**, 45: 460-468, 1966.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, 96: 440-447, 2009.

- CROW, T.J.; DEAKIN, J.F.W.; FILE, S.E.; LONGDEN, A.; WENDLANDT, S. The locus coeruleus noradrenergic system-evidence against a role in attention, habituation, anxiety and motor activity. **Brain Res.**, 155: 249-261, 1978.
- CRUZ, A.P.M.; JÚNIOR, H.Z.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Animal Models of Anxiety: Implications for the Screening of Anxiety Drugs. **Psicol: Teor. Pesq.**, 13(3): 269-278, 1997.
- 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 model anxiolytic agents. **Trend Pharmacol. Sci.**, 16: 33-36, 1995.
- DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, 14: 5147-5159, 1994.
- DE OLIVEIRA, C.L.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 56: 55-59, 1997.
- DE PAULIS, A.; MORGAN, M.M.; LIEBESKIND, J.C. GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. **Brain Res.**, 436: 223-228, 1987.
- DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanism of defense. **J. Psychopharm.**, 5(4): 305-315, 1991.
- DOSTROVSKY, O.J.; CRAIG, A.D. Ascending projection system. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds.). **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th ed. Churchill Livinstore: Elsevier, 2006, p.187.
- DUARTE, I.D.G.; FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesic induced by morphine or carbachol and the L-arginine-oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 221:171-174, 1992.
- DUBUISSON, P.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4: 161-174, 1977.
- DUNN, R.W.; REED, T.A.; COPELAND, P.D.; FRYE, C.A. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. **Neuropharmacology.**, 37: 899-904, 1998.
- FAN, W.; DONG, W.; LENG, S.; LI, D.; CHENG, S.; LI, C.; QU, H.; HE, H. Expression and colocalization of NADPH-diaphorase and heme oxygenase-2 in trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. **J. Mol. Histol.**, 39: 427-433, 2008.
- FAN, W.; HUANG, F.; DONG, W.; GAO, Z.; LI, C.; ZHU, X.; LI, D.; HE, H. Distribution of heme oxygenase-2 and NADPH-diaphorase in the spinal trigeminal nucleus of the rat. **J. Mol. Histol.**, 39:427-433, 2009.
- FAN, W.F.; HUANG, F.; WU, Z.; ZHU, X.; LI, D.; HE, H. Carbon monoxide: a gas that modulates nociception. **J. Neurosc. Res.**, 89: 802-807, 2011.

- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A; BANDLER, R. (Eds.). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. New York: Plenum Press, 151-173, 1991.
- FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. **Brain. Res.**, 306: 105-123, 1984.
- FARIA, M.S.; MUSCARÁ, M.N.; MORENO-Jr, H.; TEIXEIRA, S.A.; DIAS, H.B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F.G.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur. J. Pharmacol.**, 323: 37-43, 1997.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. P. 125-142.
- FILE, S.E.; DEAKIN, J.F.W.; LONGDEN, A.; CROW, T.J. An investigation of the role of the locus coeruleus in anxiety and agonistic behaviors. **Brain Res.**, 169: 411-420, 1979.
- FILE, S.E. Animal anxiety and the effects of benzodiazepines. IN: *Pharmacology of Benzodiazepines*, edited by Usdln, P.; Skolnick, J. F.; Tallman, D.; Greenblatt, S. M.; London Macmillan, 1992, p. 355-364.
- FILHO, R.F; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 46: 265-271, 2000.
- FOOTE, S.L.; BLOOM, F.E.; ASTON-JONES, G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. **Physiol. Rev.**, 63(3): 884 - 914, 1983.
- FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. **Free Rad. Res.**, 31: 459-475, 1999.
- GALBRAITH, R. Heme oxygenase: Who needs it? **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 222: 299-305, 1999.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48: 184-188, 1995.
- GRAEFF, F.G. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 29(I): S3-6, 2007.
- GRAEFF, F.G. Brain defense 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. Serotonina, matéria cinzenta periaqueductal e transtorno do pânico. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 25(2): 41-45, 2003.
- GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.L.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M.W. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, 58: 123-131, 1993.
- GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, J.R.H. Animals models of anxiety. In: D'HAENEN.; DEN BOER, J.A.; WILLER, P. Eds. *Biolog. Psychiatr.* John Wiley & Sons Ltd. 2002. P. 1-15.

- GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. Neurobiologia. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.107-132.
- GRAY, J.A. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system. New York: Oxford University Press, 1982.
- GRAY, J.A.; MC NAUGHTON, N. The neurophysiology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system. 2nd ed. Oxford University Press, London, 2000.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of α 2-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behavior. **Arch. Pharmacol.**, 327: 1-5, 1984.
- HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol.**, 29: 129-138, 1993.
- HASCOËT, M.; BOURIN, M. A new approach to the light/dark procedure in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 60: 645-653, 1998.
- HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B.A. The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* **Biol. Psychiatry.**, 25: 141-166, 2001.
- HAYASHI, S.; OMATA, Y.; SAKAMOTO, H.; HIGASHIMOTO, Y.; HARA, T.; SAGARA, Y.; NOGUCHI, M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. **Gene**, 336: 241-250, 2004.
- HEINRICHER, M.M.; INGRAM, S.L. The brainstem and nociceptive modulation. In: BUSHNELL, M.C.; BASBAUM, A.I. (Ed.). **The senses, a comprehensive reference. Pain**. Academic Press: San Diego, 2008. 5.v. p. 593-626.
- HENTALL, I.D.; MESIGIL, R.; PINZON, A.; NOGA, B.R. Temporal and spatial profiles of pontine-evoked monoamine in the rat's spinal cord. **J. Neurophysiol.**, 89: 2943-2951, 2003.
- HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. A block of spinal nitric oxide synthesis leads to increased background activity predominantly in nociceptive dorsal horn neurons in the rat. **Pain**, 88: 249-257, 2000.
- HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: Different spinal and supraspinal action of enzyme blockers on rat dorsal horn neurons. **Pain**, 117: 358-367, 2005.
- 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.
- INGI, T.; CHENG, J.; RONNET, G.V. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. **Neuron.**, 16: 835-842, 1996.
- ITOI, K.; JIANG, Y.Q.; IWASSAKI, Y.; WATSON, S.J. Regulatory mechanisms of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. **J. Neuroendocrinol.**, 16: 348-355, 2004.

- ITOI, K.; SUGIMOTO, N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. **J. Neuroendocrinol.**, 22: 355-361, 2010.
- JESSEL, T.M.; IVERSEN, L.L. Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. **Nature.**, 268: 549-551, 1977.
- JOBÉ, P.C.; MISHRA, P.K.; BROWNING, R.A.; WANG, C.; ADAMS-CURTIS, L.E.; KO, K.H.; DAILEY, J.W. Noradrenergic abnormalities in the genetically epilepsy-prone rats. **Brain Res. Bull.**, 35: 493-540, 1994.
- JONES, S.L. Descending noradrenergic influences on pain. **Prog. Brain Res.**, 88: 381-394, 1991.
- JOHNSON, R.A.; LAVESA, M.; ASKARI, B.; ABRAHAM, N.G.; NASJUTTI, A. A heme oxygenase product, presumable carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. **Hypertension**, 25: 166-169, 1995.
- JOHNSON, R.A.; KOZMA, F.; COLOMBARI, E. Carbon monoxide: from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32: 1-14, 1999.
- JONES, S.L.; GEBHART, G.F. Quantitative characterization of coeruleospinal inhibition of nociceptive transmission in the rat. **J. Neurophysiol.**, 56: 1397-1410, 1986.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular Mechanisms of Nociception. **Nature.**, 413: 203-210, 2001.
- JULOU, L.; BLANCHARD, J.C.; DREYFUS, J.F. Pharmacological and clinical studies of cyclopyrroclones: zopiclone and suriclone. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 23: 653-659, 1985.
- KING, E.W.; AUDETTE, K.; ATHMAN, G.A.; NGYEN, H.O.; SLUKA, K.A.; FAIRBANKS, C.A. Transcutaneous electrical nerve stimulation activates peripherically located alpha-2A adrenergic receptors. **Pain**, 115: 364-373, 2005.
- KLEMM, W.R. Behavioral arrest: in search of the neural control system. **Prog. Neurobiol.**, 65: 453-471, 2001.
- KWIAT, G.C.; BASBAUM, A.I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosen. Mot. Res.**, 9: 157-173, 1992.
- LABBÉ, R.F.; UREMAR, H.J.; STEVENSON, D. Zinc Protoporphyrin: A metabolite with a mission. **Clin. Chem.**, 45: 2060-2072, 1999.
- LANDAW, S.A.; CALLAHAN, E.W.; SCHMID, R. Catabolism of heme in vivo: comparison of the simultaneous production of bilirubin and carbon monoxide. **J. Clin. Invest.**, 49: 914-925, 1970.
- LÄNDESMÄKI, J.; SALLINEN, J.; MACDONALD, E.; KOBILKA, B.K.; FAGERHOLM, V.; SCHEININ, M. Behavioral and neurochemical characterization of α_2 A-adrenergic receptor knockout mice. **Neuroscience**, 113: 289-299, 2002.
- LAPIZ, M.D.; MATEO, Y.; DURKIN, S.; PARKER, T.; MARSDEN, C.A. Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behavioral of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze. **Psychopharmacology**, 155: 251-259, 2001.

- LE BARDS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, 53: 597-632, 2001.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; RODRIGUES, C.L.; BRENTGANI, M.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. **Braz. J. Med. Biol.**, 34: 245-250, 2001.
- LENT, R. Os sentidos do corpo: Estrutura e função do sistema somestésico. In: LENT, R. (Ed.). **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 209-239.
- LI, X.; CLARK, J.D. Heme-oxygenase type 2 plays a role in formalin-induced nociception. **Pain**, 86: 75-80, 2000a.
- LI, X.; CLARK, J.D. Heme-oxygenase inhibitors reduce formalin-induced Fos expression in mouse spinal cord tissue. **Neuroscience**, 105: 949-956, 2001a.
- LI, W.; ZHAO, Z.Q. Yohimbine reduce inhibition of lamina X neurons by stimulation of the locus coeruleus. **Neuroreport**, 4: 751-753, 1993.
- LI, X.; CLARK, J.D. Heme oxygenase type 2 participates in the development of chronic inflammatory and neuropathic pain. **J. Pain**, 4: 101-107, 2003.
- LI, X.; CLARK, J.D. Alterations in spinal cord gene expression after hindpaw formalin injection. **J. Neurosci Res.**, 78: 533-541, 2004b.
- LI, S.; QUOCK, R.M. Effects of a nitric donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. **Eur. J. Pharmac.**, 447: 75-78, 2002.
- LI, S.; CHUNG, E.; QUOCK, R.M. Role of cyclic GMP in nitrous oxide-induced anxiolytic-like behavior in the mouse light/dark exploration test. **Beh. Neurosci.**, 118: 648-652, 2004.
- LI, S.; DOSS, J.C.; HARDEE, E.J.; QUOCK, R.M. Involvement of cyclic GMP-dependent protein kinase in nitrous oxide-induced anxiolytic-like behavior in the mouse light/dark exploration test. **Brain Res.**, 1038: 113-117, 2005.
- LIANG, D.Y.; CLARK, J.D. Modulation of the NO/CO/cGMP signaling cascade during chronic morphine exposure in mice. **Neurosci. Lett.**, 365: 73-77, 2004.
- LYONS, W.E.; FRITSCHY, J.M.; GRZANNA, R. The noradrenergic neurotoxin DSP-4 eliminates the ceruleospinal projection but spares projections of the A5 and A7 groups to the ventral horn of the rat spinal cord. **J. Neurosci.**, 9: 1481-1489, 1989.
- MAINES, M.D. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **Fasep J.**, 2: 2557-2568, 1988.
- MAINES, M.D. **Heme oxygenase: Clinical Applications and Functions**. Florida, CRC Press, 1992.
- MAINES, M.D. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 517-54, 1997.

- MANCUSO, C.; PREZIOSI, P.; GROSSMAN, A.B; NAVARRA, P. The role of carbon monoxide in the regulation of neuroendocrine function. **Neuroimmunodul.**, 4: 225-229, 1997.
- MANJARREZ, E.; ROCHA, T.; ROJAS-PILONI, G.; MENDEZ, I.; FLORES, A. Nitric oxide modulates spontaneous cord dorsum potentials in the cat spinal cord. **Neurosci. Lett.**, 309: 5-8, 2001.
- MANNING, B.H.; FRANKLIN, K.B.J. Morphine analgesia in the formalin test: reversal by microinjection of quaternary naloxone into the posterior hypothalamic area or periaqueductal gray. **Behav. Brain Res.**, 92: 97-102, 1998.
- MARILENA, G. New physiological importance of two classical residual products: carbon monoxide and bilirubin. **Biochem. Molec. Med.**, 61:136-142, 1997.
- MARKS, G.S. Does carbon monoxide have a physiological function? **Trend Pharmacol Sci.**, 12: 185-188, 1991.
- MASON, S.T.; FIBIGER, H.C. Current concepts. I. Anxiety: the locus coeruleus disconnection. **Life Sci.**, 25: 2141-2147, 1979.
- MCCOUBREY, W.; HUANG, T.J.; MAINES, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the cat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur. J. Biochem.** 247: 725-732, 1997.
- MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu. Rev. Neurosci.**, 27, 1-28, 2004.
- MEINTJES, R.A. An overview of the physiology of pain for the veterinarian. **The Veter. Journal.**, 193: 344-348, 2012.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, 52: 127-36, 1993.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.L.; GEBHART, G.F. Investigations of the possible role for carbon monoxide (CO) in thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuroreport.**, 5: 2337-2341, 1994.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Sci.**, 150: 971-979, 1965.
- MELZACK, R.; WALL, P. The challenge of pain. Londres, Penguin Books. 2nd Ed. 1991.
- MERSKEY, H. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain.**, 3: S1-S225, 1986.
- MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. p.3.
- MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. **Brain Res.**, 1076: 42-48, 2006.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, New York, 57:1-164, 1999.

- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, New York, 66: 355-474, 2002.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 48: 254-260, 1955.
- MORILAK, D.A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D.J.; GARCIA, A.S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C.O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Prog. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psych.**, 29: 1214-1224, 2005.
- MORITA, T.; PERRELLA, M.A.; LEE, M.E.; KOUREMBANAS, S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92: 1475-1479, 1995.
- MORSE, D.; SETHI, J.; CHOI, A.M.K. Carbon monoxide-dependent signaling. **Crit. Care Med.**, 30: S12-S17, 2002.
- MUDGE, A.W.; LECMAN, S.F.; FISCHBACH, G.D. Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 76: 526-530, 1979.
- NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Role of the peripheral heme oxygenase-carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: Evidence for a cGMP signaling pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 556: 55-61, 2007.
- NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Role of the spinal cord heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociceptive response of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 581: 71-76, 2008.
- NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Antinociception synergy between the peripheral and spinal sites of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 42: 141-147, 2009.
- NICHOLS, D.S.; THORN, B.E.; BERNTSON, G.G. Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, 22(4): 717-24, 1989.
- OLDS, M.E.; OLDS, J. Approach escape interaction in rat brain. **Am. J. Physiol.**, 203: 803-810, 1962.
- PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr. Rev.**, 22: 502-548, 2001.
- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. **Behav. Brain Sci.**, 5: 407-467, 1982.
- PARO, F.M.; STEINER, A.A.; PAULA, P.M.; BRANCO, L.G.S. Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway in the control of breathing under normoxia and hypoxia. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 130: 151-160, 2002.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. Acad. Press, San Diego, USA, 2007.
- PEHL, U.; SCHMID, H.A. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. **Neurosci.**, 77: 563-73, 1997.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; 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.
- PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Prog. Neurobiol.**, 80: 53-83, 2006.
- PINEDA, J.; KOGAN, J.H.; AGHAJANIAN, G.K. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. **J. Neurosci.**, 16(4): 1389-1399, 1996.
- PIRNIK, Z.; MRAVEC, B.; KUBOVCAKOVA, L.; MIKKELSEN, J.D.; KISS, A. Hypertonic saline and immobilization induce Fos expression in mouse brain catecholaminergic cell groups: colocalization with tyrosine hydroxylase and neuropeptide. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 1018, 398-404, 2004.
- POL, O. The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation. **Curr. Med. Chem.**, 14: 1945-55, 2007.
- PONG, W.W.; ELDRED, W.D. Interactions of the gaseous neuromodulators nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the salamander retina. **J. Neurosci. Res.**, 87: 2356-2364, 2009.
- POKK, P.; VÄLI, M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behavior of small-platform-stressed mice in the plus-maze. **Prog. Neuro-Psychopharm. Biolog. Psych.**, 26: 241-247, 2002.
- PUIG, S.; SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, 64: 345-355, 1996.
- PRADO, W.A.; FAGANELLO, F.A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. **Pain**, 88(2): 169-76, 2000.
- PROUDFIT, H.K.; CLARK, F.M. The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. **Prog. Brain Res.**, 88: 123-141, 1991.
- QUOCK, R.M.; NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. **Life Sci.**, 51: PL 255-260, 1992.
- RADLEY, J.J.; WILLIAMS, B.; SAWCHENKO, P.E. Noradrenergic innervations of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. **J. Neurosci.**, 28: 5806-5816, 2008.
- RAFFAINI, M.S.; DIAS, M.B.; BRANCO, L.G.S. Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway participates in the lipopolysaccharide-induced tolerance in rats. **Brain Res.**, 1111: 83-89, 2006.
- RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G.C.; WEHRMEISTER, T.D. IZÍDIO, G.S. Integrating the open Field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behav. Brain Res.**, 193: 277-288, 2008.
- RASMUSSEN, K.; JACOBS, B.L. Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cats. II. Conditioning and pharmacology studies. **Brain Res.**, 371: 335-344, 1986.

- RATNER, E.M. The method of physiological assessment of local climate on the basis of its effect on the thermal status of man. **Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.**, 5: 446-451, 1967.
- RAVANELLI, M.I.B.; ALMEIDA, M.C.; BRANCO, L.G.S. Role of the locus coeruleus carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. **Eur. J. Physiol.**, 453: 471-6, 2006.
- RAVANELLI, M.I.B.; BRANCO, L.G.S. Role of locus coeruleus heme oxygenase-carbon monoxide cGMP pathway during hypothermic response to restraint. **Brain Res. Bull.**, 75: 526-532, 2008.
- REDMOND, D.E.JR.; HUANG, Y.H.; SNYDER, D.R. MAAS, J.W. Behavioral effects of stimulation of the locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. **Brain Res.**, 116: 502-510, 1976.
- RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.**, 60: 404-415, 2001.
- RODGERS, P.A.; SEIDMAN, D.S.; WEI, P.L.; DENNERG, P.A.; STEVENSON, D.R. Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. **Pediatr. Res.**, 39: 1041-1049, 1996.
- RYTER, S.W.; OTTERBEIN, L.E.; MORSE, D.; CHOI, A.M.K. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. **Molec. Cell. Biochem.**, 234: 246-263, 2002.
- RYTER, S.W.; OTTERBEIN, L.E. Carbon monoxide in biology and medicine. **Bioessays**, 26: 270-280, 2004.
- SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/ protein kinase G/ ATP –sensitive K⁺ channel pathway. **PNAS**, 101: 3680-3685, 2004.
- SARA, S.J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nat. Rev. Neurosci.**, 10: 211-223, 2009.
- SCHATER, B.A. Heme catabolism by heme oxygenase: physiology, regulation, and mechanism of action. **Semin. Hematol.**, 25: 349-369, 1988.
- SCHMIDT, H.H. NO, CO and OH endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. **FEBS Lett.**, 307(1): 102-107, 1992.
- SCHWEITHER, M.H.; MARSHALL, M.; CARRON, K.; BOHLE, D.S.; BUSSE, S.C.; ARNOLD, E.V.; BARNARD, D.; HORNER, J.R.; STARKEY, J.R. Heme compounds in dinosaur trabecular bone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94: 6291-6296, 1997.
- SJÖSTRAND, T.A. A preliminary report on the in vitro formation of carbon monoxide in blood. **Acta Physiol. Scand.**, 22: 142-143, 1951a.
- SJÖSTRAND, T.A. Endogenous formation of carbon monoxide. **Acta Physiol. Scand.**, 22: 137-141, 1950.
- SJÖSTRAND, T.A. Endogenous formation of carbon monoxide: the CO concentration in the inspired and expired air of hospital patients. **Acta Physiol. Scand.**, 22: 137-141, 1951b.
- SJÖSTRAND, T.A. The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. **Acta Physiol. Scand.**, 26: 338, 1952.

- SNYDER, S.H.; JAFFREY, S.R.; ZAKHARY, R. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. **Brain Res. Rev.**, 26: 167-175, 1998.
- SORIANO, R.N.; RAVANELLI, M.I.; BATALHÃO, M.E.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G.S. Propyretic role of the locus coeruleus nitric oxide pathway. **Experim. Physiol.**, 95: 669-677, 2010.
- STEINER, A.A.; COLOMBARI, E.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. **Am. J. Physiol.**, 277: R499-R507, 1999.
- STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action: evidence for a cGMP signaling pathway. **J. Physiol.**, 280: R448-R457, 2001.
- STEINER, A.A.; RESTE, G.; BRANCO, L.G.S. Role of the brain heme oxygenase-carbon monoxide pathway in stress fever in rats. **Neurosci. Lett.**, 341: 193-196, 2003.
- STEVENS, C.F.; WANG, Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. **Nature.**, 364: 147-149, 1993.
- STIMMEL, B. Pain, Analgesia and Addiction: **The Pharmacology of Pain**. New York: Raven Press, p. 1-2, 1983.
- STOCKER, R. Induction of heme oxygenase as a defense against oxidative stress. **Free Radic. Res. Commun.**, 9: 101-112, 1990.
- SUEMATSU, M.; GODA, N.; SANO, T.; KASHIWAGI, S.; EGAWA, T.; SHINODA, Y.; ISHIMURA, Y. Toxic waste or hormone? Carbon monoxide as a regulator of sinusoidal tone. **Hepatology**, 24(5): 1319-1321, 1996.
- TANAKA, M.; KOHNO, Y.; NAKAGAWA, R.; IDA, Y.; LIMORI, K.; HOAKI, Y.; TSUDA, A.; NAGASAKI, N.; Time-related differences in nor-adrenaline turnover in rat brain regions by stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 16: 315-319, 1982a.
- TANAKA, M.; KOHNO, Y.; NAKAGAWA, R.; IDA, Y.; LIMORI, K.; HOAKI, Y.; TSUDA, A.; NAGASAKI, N.; Naloxone enhances stress-induced increases in noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. **Life Sci.**, 30: 1663-1669, 1982b.
- TANAKA, M.; KOHNO, Y.; NAKAGAWA, R.; IDA, Y.; TAKEDA, S.; NAGASAKI, N.; NODA, Y.; Regional characteristics of stress-induced increases in brain noradrenaline release in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 19: 543-547, 1983b.
- TANAKA, M.; KOHNO, Y.; TSUDA, A.; IDA, Y.; LIMORI, K.; HOAKI, Y.; NAGASAKI, N.; Differential effects of morphine on noradrenaline release in brain regions of stress and non-stressed rats. **Brain Res.**, 275: 105-115, 1983a.
- TANAKA, M.; TSUDA, A.; IDA, Y.; USHIJIMA, I.; TSUJIMARU, S.; NAGASAKI, N.; Methionine-Enkephalin inhibits stress-induced increases in noradrenaline turnover in brain regions of rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, 37: 117-119, 1985a.

- TANAKA, M.; TSUDA, A.; IDA, Y.; USHIJIMA, I.; TSUJIMARU, S.; NAGASAKI, N.; Attenuating effects of opioid peptides on stress-induced increases in noradrenaline release in rat brain regions. **Annu. Rep. Pharmacopsychiat. Res. Found.**, 16: 80-93, 1985b.
- TANAKA, M. Neurochemical basis of stress and anxiety-involvement of brain noradrenaline system. **Auton. Nerv. Syst.**, 29: 199-216, 1992.
- TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; EMOTO, H.; ISHII, H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. **Eur. J. Pharmacol.**, 405: 397-406, 2000.
- TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 61: 748-755, 1968.
- TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da dor aguda e crônica. In: TEIXEIRA, M.J. (Ed.). **Dor: manual para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2006. P. 9-24.
- TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 61: 748-755, 1968.
- TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, 224: 6388-6394, 1969.
- TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. **J. Lab. Clin. Med.**, 75: 410-421, 1970.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5-17, 1992.
- TOOD, A.J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th ed. Elsevier: Churchill Livingstone, 2006. p. 73-90.
- TSURUOKA, M.; MAEDA, M.; NAGASAWA, I.; INOUE, T. Spinal pathways mediating coeruleospinal antinociception in the rat. **Neurosci. Lett.**, 362: 236-239, 2004.
- VERMA, A.; HIRSCH, D.J.; GLATT, C.E.; RONNETT, G.V.; SNYDER, S.H. Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science**, 259: 381-384, 1993.
- VINCENT, S.R.; DAS, S.; MAINES, M.D. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric synthase are co-localized in select neurons. **Neuroscience**, 63: 223-231, 1994.
- VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KOKS, S.; BOURIN, M.; MANNISTO, 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.
- WANG, R.; WU, L. The chemical modification of K_{Ca} channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, 272: 8222-8226, 1997.

- WATANABE, M.; PINTO, C.F.; DEZOTI, C.; ANDRADE, S.C.; VATTIMO, M.F.F. Acute renal failure: The heme oxygenase system. **J. Bras. Nefrol.**, 4: 179-183, 2005.
- WEBER, C.M.; EKE, B.C.; MAINES, M.D. Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. **J. Neurochem.**, 63: 953-962, 1994.
- WEINSHENKER, D.; SZOT, P. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. **Pharmacol. Ther.**, 94: 213-233, 2002.
- WEISS, J.M.; STOUT, J.C.; AARON, M.F.; QUAN, N.; QUENS, M.J.; BUTLER, P.D.; NEMEROFF, C.B. Depression and anxiety: Role of the locus coeruleus and corticotrophin-releasing factor. **Brain Res. Bull.**, 35: 561-572, 1994.
- WILEY, J.L.; CRISTELLO, A.F.; BALSTER, R.L. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in a elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 294: 101-107, 1995.
- WILLIAMS, S.E.; WOOTTON, P.; MASON, H.S.; BOULD, J. ILES, D.E.; RICCARDI, D.; PEERS, C.; KEMP, P.J. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. **Science**, 306: 2093-2097, 2004.
- WILLIAMS, S.E.; WOOTTON, P.; MASON, H.S.; BOULD, J. ILES, D.E.; RICCARDI, D.; PEERS, C.; KEMP, P.J. A structural motif in the C-terminal tail of slo1 confers carbon monoxide sensitivity to human BK Ca channels. **Pflugers Arch.**, 456: 561-572, 2008.
- WILLIS, D.; MOORE, A.R.; FREDERICK, R.; WILLOUGHBY, D.A. Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. **Natl. Med.**, 2: 87-90, 1996.
- WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, 14(1): 2-31, 1997.
- YAMAMOTO, T.; NOZAKI, T. Zinc protoporphyrin IX, an inhibitor of the enzyme that produces carbon monoxide, blocks spinal nociceptive transmission evoked by formalin injection in the rat. **Brain Res.**, 704: 256-262, 1995.
- YEOMANS, D.C.; CLARK, F.M.; PAICE, J.A.; PROUDFIT, H.L. Antinociception induced by electrical stimulation of spinally projecting noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group of the rat. **Pain**, 48 (3): 449-461, 1992.
- ZIEGLER, D.R.; CASS, W.A.; HERMAN, J.P. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis response to stress. **J. Neuroendocrinol.**, 11: 361-369, 1999.
- ZHUO, M.; SMALL, S.A.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. **Science**, 260: 1946-1950, 1993.