UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**“Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do
comportamento emocional em ratos: o papel do locus coeruleus”**

RAFAEL ALVES CAZUZA

Ribeirão Preto
2017

RAFAEL ALVES CAZUZA

Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do comportamento emocional em ratos: o papel do locus coeruleus.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

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

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2017

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.

Cazuza, Rafael Alves

Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do comportamento emocional em ratos: o papel do locus coeruleus. Ribeirão Preto, 2017.

69 p.: il.; 30 cm

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafael Alves Cazuya

Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do comportamento emocional em ratos: o papel do locus coeruleus.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

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: _____

Dedico,

*A minha mãe, **Maria de Fátima**, que já não se encontra mais entre nós, mas que, como ela mesmo dizia, deixou-me “a maior herança que um pai pode deixar para o filho, a educação”.*

AGRADECIMENTOS

A **minha família**, que me ensinou a importância do conhecimento e da educação, me incentivando sempre a buscar o progresso com humildade e respeito ao próximo.

À **Prof. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi**, minha orientadora, que ofereceu total suporte, parceria e companheirismo para a elaboração e realização deste trabalho. Serei eternamente grato.

Ao **Prof. Marcus Lira Brandão**, pelo acompanhamento e assessoria que possibilitou a melhoria deste trabalho.

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

À **Patrícia Adriana Basile**, pela colaboração e suporte técnico que permitiram a obtenção dos resultados deste trabalho.

À **Prof. Olga Pol** pela parceria e ajuda que foram imprescindíveis na realização e aprimoramento deste trabalho.

Ao **Dr. Wagner Reis**, pela colaboração essencial na coleta e análise dos resultados deste trabalho.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, **Bruna, Daniela, Priscila, Glauce, Amanda, Laís e Sarai**, pela amizade, colaboração e conselhos no dia-a-dia de trabalho. Em especial, ao **Richard**, que se tornou mais que um colega de trabalho, mas um irmão.

À minha companheira, amiga e grande amor, **Flávia**, pelo apoio total e incondicional, amor e carinho. Obrigado por iluminar minha vida.

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 e Antônio Massaro**, pelo cuidado e tratamento constante dos animais experimentais.

A **todos** aqueles que contribuíram com a minha formação profissional.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme oxigenasse	7
Figura 2: Esquema dos protocolos experimentais	13
Figura 3: Fotografias dos procedimentos utilizados no protocolo de estresse	14
Figura 4: Aparato do teste claro-escuro	15
Figura 5: Aparato do teste de labirinto em cruz elevado	17
Figura 6: Efeito do tratamento agudo e crônico com CORM-2 e CoPP no TCE	22
Figura 7: Efeito do tratamento agudo e crônico com CORM-2 e CoPP no LCE	24
Figura 8: Efeito do tratamento agudo e crônico com CORM-2 e CoPP sobre medidas etológicas do LCE	25
Figura 9: Efeito do tratamento crônico e agudo na expressão de HO-1 e HO-2 no LC	27
Figura 10: Figura esquemática da região do locus coeruleus	28
Figura 11: Fotomicrografia da região do LC com imunorreatividade para HO-1	29
Figura 12: Fotomicrografia da região do LC com imunorreatividade para HO-2	30
Figura 13: Efeito do ECV no TCE	32
Figura 14: Efeito do ECV no LCE	34
Figura 15: Efeito do ECV nas medidas etológicas do LCE	35
Tabela 1: Grupos experimentais	12

LISTA DE ABREVIATURAS

BA	Braço aberto
BF	Braço fechado
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CO	Monóxido de carbono
CoPP	Cloreto de cobalto Protoporfirina IX
CORM-2	Doador Tricarbonildiclororutenio (II)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
Fe+2	Íon de Ferro
GCs	Guanilase ciclase solúvel
GMPc	Guanosina 3'5' monofosfato cíclico intracelular
GTP	Guanosina 5' trifosfato
HO	Enzima Heme oxigenasse
HO-1	Enzima Heme oxigenase tipo 1
HO-2	Enzima Heme oxigenase tipo 2
HO-3	Enzima Heme oxigenase tipo 3
i.p.	Intraperitoneal
LC	Locus coeruleus
LCE	Labirinto em cruz elevado
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigênio
ODQ	1h- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3-A] Quinoxaline-1-One
SCA	Sistema cerebral aversivo
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SIC	Sistema de inibição comportamental
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Tempo no braço aberto
TCE	Teste claro-escuro
ZnDPBG	Zinco-Deuteroporphyrin-2,4-Bis Glicol
4V	Quarto ventrículo

RESUMO

CAZUZA, R.A. **Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do comportamento emocional em ratos: o papel do locus coeruleus**. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP – Ribeirão Preto, 2017.

O gás monóxido de carbono (CO) possui diversas funções no sistema nervoso central (SNC) funcionando como neuromodulador, como por exemplo da regulação da temperatura corporal, da nocicepção e mais recentemente, do comportamento emocional. Este neuromodulador gasoso é produzido pela ação da enzima heme oxigenase (HO), a qual é encontrada em diferentes áreas do SNC. Com destaque, esta enzima tem alta expressão no locus coeruleus (LC), o que sugere o envolvimento do CO na modulação de funções desempenhadas por esta estrutura. O LC localiza-se na ponte, sendo a maior origem da inervação noradrenérgica do SNC. Esta estrutura tem participação ativa na modulação das respostas relacionadas ao estresse, em particular, na modulação do comportamento emocional, desde que integra o Sistema de Inibição Comportamental (SIC), o qual inclui ainda o sistema septo-hipocampal e os núcleos da rafe. O SIC é responsável por comandar respostas defensivas de avaliação de risco, alerta e atenção, as quais podem ser eliciadas pela ansiedade. Dentro desta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a ativação sistêmica da via HO-CO pode modular o comportamento emocional de ratos, e se há participação do LC. Assim, este trabalho avaliou se o tratamento sistêmico via intraperitoneal (i.p.) agudo (3 h antes) ou crônico (10 dias/2 vezes ao dia) com um liberador de monóxido de carbono (CORM-2), ou com indutor da enzima HO (CoPP), altera as respostas comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste claro-escuro (TCE) em ratos, bem como a expressão da enzima HO no LC. Em uma segunda etapa foi avaliado se a administração aguda de CORM-2 ou CoPP altera o comportamento avaliado no LCE e no TCE de ratos submetidos ao estresse crônico variado (ECV) por 10 dias. Os resultados mostraram que o CO induzido pela administração aguda ou crônica de CORM-2 ou CoPP possui efeito ansiolítico. Ainda, o tratamento com CORM-2 ou CoPP aumentou a expressão da enzima HO-1 em células localizadas no LC, sem alterar a imunoreatividade à enzima HO-2. Considerando os grupos submetidos ao estresse ECV, nem a ativação da via HO-CO ou o ECV apresentaram efeitos significativos nos comportamentos avaliados nos testes LCE e TCE. Os resultados do presente estudo sugerem que o tratamento sistêmico com drogas que modulam a liberação de CO possui

claro efeito ansiolítico. Assim, é possível que o CO possa ser uma droga com potencial terapêutico para o tratamento de desordens neuropsiquiátricas.

Palavras-chave: HO-1, HO-2, labirinto em cruz elevado, teste claro-escuro, locus coeruleus, estresse crônico variado, estresse agudo.

ABSTRACT

CAZUZA, R.A. **Involvement of carbon monoxide in the emotional behavior in rats: role of the locus coeruleus.** 2017. 69 f. Thesis (Master). Faculty of Philosophy, Science and Letters of Ribeirão Preto, USP – Ribeirão Preto, 2017.

The carbon monoxide gas (CO) has several functions in the central nervous system acting as a neuromodulator, such as in the body temperature regulation, nociception and more recently, in the emotional behavior modulation. This gas is produced by the action of the heme oxygenase enzyme (HO), which is found in different areas of the central nervous system (CNS). It is important to note that this enzyme has high expression in the locus coeruleus (LC), suggesting the involvement of CO in the modulation functions performed by this midbrain structure. LC is located in the pons, being the source of majority of the noradrenergic innervation of the CNS. This structure is intimately involved in the stress modulation responses, particularly in the emotional behavior regulation, since it integrates the Behavioral Inhibition System (BIS), which also includes septum-hippocampal system and raphe nucleus. The BIS is responsible for defensive responses like the risk assessment and alertness triggered by anxiety. Within this perspective, the present study was designed to evaluate whether the systemic HO-CO pathway can modulate emotional behavior of rats, and if the HO enzyme of the neurons located into LC is involved in this response. Thus, this study evaluated whether the acute systemic i.p. treatment (3 hours before) or chronic (10 days / 2 times a day) with a carbon monoxide releaser (CORM-2) or inducer of heme enzyme oxygenase (CoPP), is able to alter the behavioral responses in the elevated plus maze (EPM) and in the light-dark box test (LDB) in rats, and the HO enzyme expression in the LC. Furthermore, the effect of the acute administration of CORM-2 or CoPP was evaluated in the emotional behavior assessed in the EPM and LDB by rats submitted to unpredictable chronic stress (during 10 days). The results showed that the CO induced by acute or chronic administration of CORM-2 or CoPP has an anxiolytic-like effect. Furthermore, treatment with CORM-2 or CoPP promoted an increase of HO-1 enzyme expression in cells located in the LC without altering the immunoreactivity of HO-2 enzyme. Still, considering the rats subjected to stress UCS neither the activation of HO-CO pathway nor the UCS protocol altered the emotional behavior evaluated in the EPM and LDB tests. The results of this study suggest that systemic treatment with drugs that modulate the CO release has anxiolytic effect. Thus, it is possible that CO can be a potential drug therapeutic target for neuropsychiatric disorders.

Keywords: HO-1, HO-2, elevated plus maze, light-dark box test, locus coeruleus, unpredictable chronic stress, acute stress.

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Comportamento emocional	1
1.2 Respostas comportamentais e estresse	4
1.3 Locus coeruleus: modulação emocional e estresse.....	5
1.4 Via HO-CO-GMPc: funções, mecanismo de ação e seu papel no LC	6
2 OBJETIVOS.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Animais e Condições Ambientais.....	11
3.2 Drogas e Tratamento	12
3.3 Estresse crônico variado	13
3.4 Teste de Claro e Escuro (TCE).....	14
3.5 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	16
3.6 Eutanásia.....	17
3.7 Imunohistoquímica para heme-oxigenase	18
3.8 Análise estatística	19
4 RESULTADOS	21
4.1 Teste Claro-Escuro	21
4.2 Teste de labirinto em cruz elevado	23
4.3 Análise de imunofluorescência.....	26
4.4 Efeito do Estresse Crônico Variado (ECV)	31
4.4.1 Teste Claro-Escuro	31
4.4.2 Teste de Labirinto em cruz elevado.....	33
5 DISCUSSÃO	37

5.1	Efeito do CO sobre o comportamento emocional	37
5.2	Efeito do ECV e sua relação com o CO	40
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8	ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento emocional

O conceito de emoção tem sido amplamente debatido ao longo da história, podendo ser definido como um conjunto de funções encefálicas superiores que estão de certa forma relacionadas, em resposta à recompensa ou punição, funcionando como sinais de prazer ou defesa (Roxo et al., 2011; Rolls, 2015). William James e Carl Lange compreendiam emoção como resultado da interpretação de alterações corporais periféricas (James, 1884; Lange, 1885). Essa teoria foi questionada por Walter Cannon e Phillip Bard (1928), que sugeriram que as alterações viscerais seriam independentes da experiência emocional (Cannon, 1987). Desta forma, a ativação do hipotálamo seria responsável pela avaliação emocional dos estímulos ambientais. Por sua vez, as projeções desta estrutura para o tronco encefálico produziriam a expressão emocional, e projeções para áreas corticais mediarão a experiência consciente da emoção (LeDoux, 2003). Atualmente a emoção pode ser entendido como uma experiência subjetiva integral e complexa de mente e corpo que é desencadeada por um estímulo externo ou pensamento, envolvendo reações orgânicas e psicológicas onde a resposta emocional apresenta um comportamento observável (a expressão emocional), uma excitação fisiológica, uma interpretação cognitiva e uma experiência subjetiva (Pinto, 2001).

As emoções possuem clara função evolutiva, sendo responsáveis por desencadear respostas protetoras do organismo frente a estímulos ambientais aversivos ou a aproximação daqueles que garantem a reprodução e sobrevivência da espécie (Weisfeld e Goetz, 2013). Dentre as distintas emoções inatas, estudos pioneiros de Darwin (1965) descreveram o caráter evolutivo da expressão das emoções nos homens, sendo observado respostas semelhantes às aquelas expressas por outros animais, em particular, do medo e da raiva. Tal semelhança levou ao estudo aprofundado das respostas comportamentais acionadas pelo medo em animais na busca pela compreensão dos estados emocionais aversivos em seres humanos, os quais podem ser relacionados não apenas com estados emocionais de medo e ansiedade do cotidiano, mas também com desordens psiquiátricas (Campos et al., 2013).

Um dos primeiros relatos sobre as estruturas encefálicas relacionadas com respostas emocionais foram realizados por Klüver e Bucy (1939) onde descreveram que

macacos com ablação bilateral do lobo temporal inferior (incluindo a amígdala) apresentavam redução do medo a estímulos ameaçadores. Achados subsequentes mostraram que a estimulação elétrica de regiões do hipotálamo dorsomedial eliciava aversividade (Hess e Brugger, 1943).

Considerando achados experimentais e neuroanatômicos foi proposto um circuito emocional, denominado por Circuito de Papez, sendo este formado pelo giro parahipocampal, o giro do cíngulo, o giro subcaloso e o córtex piriforme (Papez, 1937). Este circuito foi aprimorado por MacLean (1949; 1952), com a inclusão da amígdala, e vindo a se tornar o que atualmente é conhecido como o sistema límbico. O sistema límbico engloba diversas regiões encefálicas, as quais controlam aspectos diferentes da emoção, não havendo consenso sobre as funções específicas de cada área neste sistema (LeDoux, 2003). De fato, evidências apontam a participação da amígdala, do hipotálamo, do hipocampo, do córtex pré-frontal medial e do cíngulo anterior, bem como de vias serotoninérgicas com origem no núcleo dorsal da rafe e vias dopaminérgicas com origem na área tegmental ventral (Morgane et al., 2005).

Considerando em particular emoções aversivas, relacionadas a agressão ou a comportamentos defensivos, é possível que circuitos singulares sejam acionados para cada resposta comportamental (Blanchard e Blanchard, 1988). Assim, o sistema responsável pelo desencadeamento de respostas de luta-fuga e respostas de agressividade dependeriam da ativação de um conjunto de estruturas que inclui os colículos inferiores e superiores, a substância cinzenta periaquedutal (SCP), a amígdala e hipotálamo constituindo o Sistema Cerebral Aversivo (SCA, Brandão, 2005). Por outro lado, respostas defensivas de avaliação de risco, alerta e atenção dependeriam de regiões do hipocampo, área septal, locus coeruleus (LC) e o núcleo da rafe, estruturas que integram o Sistema de Inibição Comportamental (SIC) (Gray e McNaughton, 1982).

De maneira mais detalhada, a resposta de medo caracteriza-se por alterações neurovegetativas como aumento de pressão arterial e frequência cardíaca, e comportamentais como a resposta de imobilidade defensiva frente a um estímulo nocivo proximal e de defesa (luta-fuga) (Brandão et al., 2003). Diferentemente, a ansiedade caracteriza-se como uma resposta emocional onde se observam comportamentos de evitação a um estímulo nocivo (estado de inibição) concomitante a um estado de excitação comportamental (“*arousal*”) e atenção, sendo desencadeado por estímulos distais ou potenciais novos, sinais de punição ou em situações de conflitos (aproximação-evitação) (Kim e Gorman, 2005). Assim é possível que as respostas de medo sejam moduladas pela

ativação do SCA, onde são processadas respostas incondicionadas de luta e fuga, enquanto o SIC estaria relacionado com a modulação dos comportamentos desencadeados pela ansiedade (McNaughton, 2011).

Em relação ao aspecto etológico do medo e da ansiedade, alguns autores sugerem que estas respostas estejam relacionadas à proximidade de um estímulo ameaçador, podendo ser proximal (pânico), distal/conhecido (medo) ou potencial/desconhecido (ansiedade) (Campos et al., 2013; Graeff e Guimarães, 2012). Assim, a proximidade com um predador (medo) ou um ambiente desconhecido (ansiedade) podem provocar ativação de diferentes circuitos neurais (Moobs e Kim, 2015). É importante ressaltar que as respostas de medo e de ansiedade são respostas emocionais naturais e de alto valor evolutivo, entretanto, em estados crônicos e intensos podem acarretar transtornos de ansiedade, fobia ou depressão (Brain et al., 1991).

As reações comportamentais desencadeadas pelo medo e pela ansiedade são respostas espécie-específicas, e não dependem necessariamente de aprendizado prévio, ou seja, são respostas inatas, podendo estar relacionadas à distância da ameaça e intensidade do estímulo. A exposição ao estímulo presente está relacionada ao medo e a respostas de luta-fuga, enquanto a exposição a um ambiente novo ou reação pós-predador remetem à ansiedade, respostas de avaliação de risco e esquiva. Respostas de roedores a situações aversivas são semelhantes as observadas em seres humanos, seguindo um contínuo filogenético, incluindo excitação autonômica, apreensão e avaliação de risco, sendo possível assim, a utilização de modelos animais para a compreensão de fenômenos relacionados à ansiedade em seres humanos (Blanchard e Blanchard, 1993).

Considerando as respostas relacionadas à ansiedade, observam-se respostas comportamentais de fuga, esquiva ou congelamento em situações de perigo potencial, como ambientes novos ou que provocam alguma estimulação aversiva. Essas são respostas evolutivamente selecionadas, e fazem parte do repertório de roedores em situação de perigo (Blanchard e Blanchard, 1971).

Diversos modelos animais para o estudo da ansiedade têm sido propostos ao longo dos anos (Campos et al., 2013). Dentre eles, os mais utilizados são o labirinto em cruz elevado (Pellow et al., 1985; Cruz et al., 1994; Rodgers e Dalvi, 1997; Wall e Messier, 2001; Albrechet-Souza et al., 2008; Saito e Brandão, 2014) e o teste de claro-escuro (Hascoet et al., 2001; Bourin e Hascoet, 2003). Tais testes possuem como pressuposto básico o modelo de evitação-aproximação de um ambiente novo a ser explorado e ao mesmo tempo aversivo (Ramos et al., 2008). A utilização de ambos os testes em

concomitância é de extrema importância para que se avalie, de maneira mais clara, os comportamentos dos animais estudados (Ramos, 2008).

1.2 Respostas comportamentais e estresse

Considerando uma situação ameaçadora, este contexto promove ativação hipotalâmica, a qual por sua vez, leva a ativação cortical, e liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) estimulando a hipófise a produzir o hormônio adreno-corticotrófico, resultando em liberação hormônios esteroides pela glândula adrenal (corticosterona em roedores e cortisol em seres humanos) (Joels e Baran, 2009). O hormônio corticosterona possui afinidade por receptores glicocorticoides e mineralocorticoides, e sua atividade sobre esses receptores inibem a ativação do eixo, promovendo retroalimentação negativa (de Kloet et al., 2005; Goldstein, 2010).

Além do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), diversos estudos demonstraram que o núcleo locus coeruleus (LC) apresenta aumento de atividade e liberação de noradrenalina na presença de eventos estressores, participando de respostas neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais relacionadas ao estresse (Tsuda et al., 1982; Tanaka et al., 1983; 2000; Gold et al., 2015). Corroborando estes achados, a ativação de receptores glicocorticoides e mineralocorticoides relaciona-se com aumento da ansiedade e com desenvolvimento de transtornos depressivos (Chmielarz, 2013). Além disso, o estresse promoveu aumento do estado de vigília e avaliação de risco (McCall et al., 2015), bem como desencadeou estado de ansiedade (Sun et al., 2015), pela ativação do sistema noradrenérgico do LC via modulação por CRF.

O estresse foi definido inicialmente por Hans Selye em 1927 como uma resposta do organismo frente a um desafio ambiental (Goldstein e Koopi, 2007). A resposta orgânica ao estresse depende de características genéticas do indivíduo, aumentando a resiliência ou a susceptibilidade a desenvolver transtornos emocionais (McEwen, 2016). Eventos estressores podem ser considerados estímulos hostis aversivos que indicam perigo imediato à integridade do organismo e que promovem alterações endócrinas, comportamentais e autonômicas (McEwen, 2016) também podendo ser descritos como causa ou agravante de transtornos psiquiátricos, como a depressão maior e o transtorno de ansiedade (Gold et al., 2015). Dessa forma a resposta fisiopatológica ao estresse é uma tentativa de reestabelecer o equilíbrio das atividades orgânicas alteradas pelo estímulo estressor (manutenção da homeostase), bem como pode caracterizar a fuga de uma estimulação nociva (Gold et al., 2015). Sendo assim, eventos estressores estão intimamente correlacionados com

comportamentos emocionais, em especial às respostas de medo e ansiedade (Goldstein, 2010).

1.3 Locus coeruleus: modulação emocional e estresse

O locus coeruleus é um pequeno núcleo do tronco encefálico localizado na ponte próximo ao assoalho do quarto ventrículo e, em ratos, possuem extensão de aproximadamente 400 μm na direção medial-lateral e 1600 μm na direção rostro-caudal, composto majoritariamente por neurônios noradrenérgicos (Singewald e Phillipu, 1998). Esta estrutura está envolvida na modulação de diferentes funções fisiológicas e comportamentais tais como medo, ansiedade, regulação do processo atencional, modulação do ciclo sono-vigília, comportamento reprodutivo, aprendizagem, memória, bem como respostas a situações de estresse (Berridge e Waterhouse, 2003, Sara e Bouret, 2012).

Em ratos, as células noradrenérgicas são divididas em dois grandes grupos celulares: células multipolares de aproximadamente 35 μm de diâmetro e células fusiformes menores com diâmetro próximo a 20 μm (Schwarz e Luo, 2015). Em seres humanos, essas células possuem aproximadamente o mesmo tamanho (50-75 μm de diâmetro) (Patt e Gerhard, 1993).

Um estudo anterior mostrou que 70% das células do LC possivelmente apresentam imunorreatividade para catecolaminas, além de apresentarem outras características de neurônios noradrenérgicos (Masuko et al., 1986). Além disso, neste mesmo estudo constatou-se que aproximadamente 77% dessas células imunorreativas as catecolaminas são multipolares.

O LC pode ser dividido em uma região anterior, uma dorsal e uma posterior, sendo que cada divisão apresenta características celulares e eferências singulares (Loughlin et al., 1986a). Neurônios noradrenérgicos do LC que se encontram majoritariamente na região anterior enviam projeções para o hipotálamo, enquanto a região posterior do LC para o hipocampo, e por sua vez, a região dorsal para cerebelo, córtex e medula (Loughlin et al., 1986b, Clark e Proudfit, 1990).

As células noradrenérgicas do LC podem exercer tanto ação excitatória por meio da ativação de receptores $\alpha 1$ e β -adrenérgicos, ou inibitória pela ativação de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos (Samuels e Szabadi, 2008). Neurônios multipolares e fusiformes das regiões anteriores e posteriores ativam receptores $\alpha 1$ adrenérgicos nos núcleos centrais e basais da

amígdala e receptores α_1 α_2 -e β -adrenérgicos no hipocampo modulando respostas de ansiedade (Berridge e Waterhouse, 2003, Samuels e Szabaldi, 2008).

O locus coeruleus, integra o sistema de inibição comportamental (Gray e McNaughton, 1982), bem como participa da modulação do eixo HHA (Ziegler et al., 1999). Assim, sugere-se que o LC atue como área integrativa de ativação por CRF e noradrenalina, modulando a resposta emocional ao estresse (Valentino et al., 1993; Koob, 1999; Sved et al., 2002). De fato, diversos estudos têm mostrado que o sistema noradrenérgico do LC, além de estar intimamente relacionado com o estresse, está envolvido na modulação da ansiedade e do medo (Redmond et al., 1976, Redmond e Huang, 1977, Charney e Redmond, 1979) por meio de conexões com a amígdala e o hipotálamo (Tanaka, 2000).

Estudos anteriores de Redmond et al. (1976) mostraram que a estimulação elétrica do LC de macacos “stump-tailed” produzia comportamentos que poderiam ser entendidos como indícios de ansiedade. Posteriormente, estudos mostraram que antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos como a ioimbina e piperóxano produziam ansiedade em humanos enquanto o agonista de receptores α_2 -adrenérgicos clonidina, assim como antagonista de receptores β -adrenérgicos propranolol, são capazes de reduzir a ansiedade em humanos (Redmond e Huang, 1979; Charney e Redmond, 1983). Ainda, as vias eferentes noradrenérgicas do LC são responsáveis pela modulação do estado de atenção-vigília em situações de estresse desencadeado pela ansiedade (Berridge, 2008).

Evidências adicionais sugerem que a atividade das células do LC pode ser influenciada pela liberação local de monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO) (Pineda et al., 1996; Xu et al., 1998), resultando em modulação das funções desempenhadas por esta estrutura (Ravanelli e Branco, 2008; Carvalho-Costa et al., 2016).

1.4 Via HO-CO-GMPc: funções, mecanismo de ação e seu papel no LC

Nos anos 1970 foi descoberto que os gases CO e NO não exerciam apenas efeitos tóxicos ao organismo, mas também faziam parte de mecanismos fisiológicos importantes, tais como a dilatação de vasos sanguíneos e a contração muscular (Mancuso, 2010). Atualmente, estes dois gases são considerados importantes neuromoduladores em diferentes circuitos do sistema nervoso central (Navarra et al., 2001, Maines, 1993).

Os gases biologicamente ativos CO e NO são encontrados em diversas regiões encefálicas (Maines, 1993), e sua produção depende da atividade das enzimas heme-oxigenase (HO) e óxido nítrico sintase (NOS), respectivamente. Estes neuromoduladores

possuem mecanismo de ação semelhante, com a ativação da guanilato ciclase solúvel intracelular (GCs), o que por sua vez aumenta os níveis de guanilato monofosfato cíclico (GMPc) e ativa a via que envolve a proteína quinase G (PKG), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamina e adenina (NADPH) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Baraño e Snyder, 2001; Fan et al., 2008; Fan et al., 2009). Portanto, tanto o CO como o NO atuam como segundos mensageiros em uma variedade de sistemas que envolvem a ativação da GCs, e produção de GMPc.

Considerando especificamente o CO, sua formação ocorre a partir do catabolismo do grupamento heme pela enzima HO, a qual quebra a molécula de heme na presença de oxigênio molecular e do citocromo P-450 redutase, e transfere elétrons do NADPH (Figura 1, Maines, 1992).

Figura 1: Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme-oxigenase para formação de moléculas biologicamente ativas. (Adaptada de Maines, 1992).

A enzima HO pode ser encontrada em diferentes tecidos e órgãos e três diferentes isoformas são identificadas: HO-1, HO-2 e HO-3. A HO-1, é a forma induzível, sendo que sua produção é aumentada por diferentes estímulos, tais como: choque térmico, estresse oxidativo, hipóxia, citocinas inflamatórias, presença de óxido nítrico e prostaglandinas (Ryter et al., 2002; Stocker, 1990). Esta isoforma pode ser expressa em distintas áreas encefálicas participando ativamente da homeostase celular e da modulação frente a respostas adaptativas (Foresti e Motterlini, 1999). Diferente da HO-1, a HO-2 é uma enzima constitutiva e está envolvida na regulação da função celular. Esta enzima pode ser encontrada em várias regiões do SNC, dentre elas na medula espinhal, nos núcleos da base, no tálamo, hipocampo e no tronco encefálico (Ewin e Maines, 2006, Fan et al., 2008, Fan et al., 2009). Além disso, a HO-3 também considerada constitutiva, apresenta baixa

atividade biológica, sendo expressa em áreas encefálicas (McCoubrey et al., 1997; Barañano e Snyder, 2001).

A produção de CO, a partir da ação da HO, resulta em aumento dos níveis plasmáticos de GMPc por meio da ativação de GCs, regulando a expressão de proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Como ação biológica, o neuromodulador gasoso CO, está envolvido em diferentes mecanismos, tais como relaxamento muscular não-adrenérgico e não-colinérgico (Wu e Wang, 2005), na resposta inflamatória, na resposta ao estresse, na regulação da temperatura corporal (Ravanelli e Branco, 2008; Soriano et al., 2012), na nocicepção (Carvalho et al., 2011; Carvalho-Costa et al., 2014; Negrete et al., 2014), e mais recentemente, com a modulação do comportamento emocional (Carvalho-Costa et al., 2016). Em particular, um estudo prévio demonstrou que a liberação de CO está relacionada com a regulação da temperatura corporal durante septicemia induzida por endotoxina (Ravanelli et al., 2006). Estudo subsequente mostrou que a ação do CO na modulação da hipotermia induzida pelo estresse pode ocorrer via LC desde que a administração intracerebroventricular de ODQ (inibidor seletivo da GCs) reduziu o efeito da microinjeção de heme-lisinato (substrato para a enzima HO) no LC, sendo o CO única molécula produzida pela ação da HO e formação de GMPc (Ravanelli e Branco, 2008).

É importante destacar que o LC apresenta elevada expressão da enzima HO-2, e pouca expressão de NOS (Maines, 1992), o que sugere o envolvimento do CO na modulação das funções desta estrutura. De fato, Pineda (1996) mostrou que ativação da enzima HO no LC modula a atividade de neurônios noradrenérgicos locais, promovendo abertura de canais não seletivos de cátions, gerando aumento da frequência dos disparos. Dentro desta perspectiva, Soriano et al. (2012) mostraram que a atividade do CO no LC está envolvida na manutenção da febre induzida por lipopolissacarídeo, sendo este efeito dependente da interação dos gases CO-NO. Ainda, estudos sugeriram que a via HO-CO-GMPc do LC possa ativar e neurônios hipotalâmicos, via sinalização noradrenérgica durante situações de estresse (Soriano et al., 2012; Sved et al., 2002; Ravanelli e Branco, 2008). De fato, a ativação de células hipotalâmicas pelo CO resultou em liberação do fator liberador de corticotropina (CRF) (Navarra et al., 2000). É possível que a neurotransmissão gasosa, realizada pelo CO no LC esteja intimamente relacionada com as atividades desta estrutura, em particular, com a modulação das respostas ao estresse (Berridge e Waterhouse, 2003; Mancuso, 2010). Assim as conexões do sistema noradrenérgico do LC com o hipotálamo (Tanaka et al., 1981; Tanaka et al. 1983; Pacak et al., 1995), estejam envolvidas no controle de reações a agentes estressores (Mancuso, 2010). Estudo anterior

(Ravaneli e Branco, 2008) mostrou o envolvimento do CO no LC na modulação da febre induzida por estresse agudo, entretanto, em situações persistentes, tal como o estresse crônico, ainda é necessário elucidar o envolvimento do LC e do CO, sendo possível que esse gás exerça papel também sobre as respostas comportamentais induzidas pelo estresse crônico.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se obter avanços na compreensão da modulação do comportamento emocional considerando os mecanismos envolvendo neurotransmissão pelo monóxido de carbono. Ressalta-se que à semelhança do óxido nítrico, o monóxido de carbono pode modular sistemas fisiológicos, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda necessitam ser elucidados.

2 OBJETIVOS

Com base na literatura descrita, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se o tratamento agudo ou crônico com liberador de monóxido de carbono (CORM-2), ou com indutor da enzima heme-oxigenase (CoPP) altera o comportamento emocional de ratos, ou a expressão da enzima HO no locus coeruleus. Em adição, foi analisado se o tratamento agudo i.p. com CORM-2 ou CoPP em animais submetidos ao estresse crônico variado de 10 dias poderia alterar a resposta emocional.

Para tanto, este trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da administração aguda periférica (i.p.) do CoPP ou do CORM-2 em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e ao teste do claro-escuro.
2. Avaliar o efeito do tratamento crônico (10 dias, i.p.) com CoPP ou do CORM-2 em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e ao teste do claro-escuro.
3. Avaliar a imunorreatividade à enzima heme-oxigenase 1 (HO-1) e heme-oxigenase-2 (HO-2) no locus coeruleus de ratos submetidos ao tratamento agudo ou crônico com CORM-2 ou CoPP.
4. Avaliar se o tratamento agudo com CoPP ou CORM-2 altera o comportamento emocional de ratos submetidos ao estresse crônico variado por 10 dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Condições Ambientais

Para o presente estudo, foram utilizados 90 ratos machos (200 g no início dos procedimentos), procedentes do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Durante os experimentos, os ratos foram mantidos em salas climatizadas com temperatura controlada entre $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com iluminação controlada para ciclo de 12 horas de claro-escuro (com início às 7h) e receberam ração e água filtrada *ad libitum*, exceto durante a realização dos experimentos propostos.

Inicialmente, por uma semana, os ratos foram mantidos em grupo ($n = 4$), em caixas acrílicas com dimensão de 41 x 34 x 16 cm para habituação no Biotério I da FORP. Na segunda semana, após a habituação, os ratos foram separados em distintos protocolos experimentais, sendo submetidos ou não ao estresse crônico variado.

Nos protocolos 1 e 2, os ratos não foram submetidos ao estresse crônico e foram tratados de forma aguda (3 horas antes dos testes comportamentais) ou crônica (durante 10 dias/2 vezes ao dia) com as drogas em estudo, CORM-2, CoPP ou veículo (grupo Controle). No protocolo 3, os ratos foram submetidos ao estresse crônico variado durante 10 dias. No 11º dia os ratos foram divididos em 3 distintos grupos que receberam o tratamento agudo (3 h antes dos testes comportamentais) com CORM-2, CoPP ou veículo. A Tabela 1 apresenta os diferentes grupos experimentais realizados neste trabalho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Legislação Brasileira para Uso de Animais em Experimentação, e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, protocolo 2015.1.531.58.4. (data da aprovação 17/06/2015, Anexo 1).

Tabela 1: Grupos experimentais.

Grupos Experimentais			
Tratamento		Fármaco	N de animais
Protocolo 1	Agudo (3 h antes)	Veículo	10
		CORM-2	10
		CoPP	10
Protocolo 2	Crônico (10 dias/2 x dia)	Veículo	10
		CORM-2	10
		CoPP	10
Protocolo 3	Agudo (3 h antes)	Veículo	10
		CORM-2	10
		CoPP	10

3.2 Drogas e Tratamento

Neste estudo foram utilizados as seguintes drogas, liberador de monóxido de carbono, CORM-2 (Tricarbonildiclororutenio (II), Sigma-Aldrich) e um indutor da enzima heme-oxigenase, CoPP (Cobalto protoporfirina IX, Frontier Scientific). Estes fármacos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (1%, DMSO) e em solução salina (NaCl, 0,9% estéril), a qual foi utilizada como controle do veículo. As doses utilizadas foram de 5 mg/kg para o CORM-2 e 2,5 mg/kg para CoPP. Estas doses foram fundamentadas em estudos prévios de Hervera et al. (2012) e Negrete et al. (2014). As administrações foram realizadas via intraperitoneal em volume final de 10 ml/kg de veículo-salina.

Para este estudo realizamos dois tratamentos distintos, agudo e crônico. O tratamento agudo foi realizado 3 horas antes da realização dos testes comportamentais (labirinto em cruz elevado e teste do claro-escuro). O tratamento crônico foi iniciado no 1º dia experimental, sendo realizadas 2 administrações diárias, até o 10º dia experimental, onde foram realizados os testes comportamentais, 3 horas após o último tratamento. Estes protocolos experimentais foram modificados a partir de metodologia utilizada em trabalhos prévios (Negrete et al., 2014; Hervera et al, 2013; Carcolè et al., 2014; Gou et al., 2014). A figura 2 ilustra a sequencia experimental dos distintos protocolos utilizados.

Figura 2: Esquema dos protocolos experimentais utilizados. A: Protocolo de tratamento agudo; B: Protocolo de tratamento farmacológico crônico; C: Protocolo estresse crônico variado (ECV).

3.3 Estresse crônico variado

Durante 10 dias consecutivos, os ratos foram submetidos ou não ao estresse crônico variado (ECV), onde o grupo controle foram animais não submetidos ao ECV e tratados com veículo. O estresse crônico variado, foi realizado por meio de diferentes protocolos experimentais, sendo eles: agitação, nado forçado, restrição física, exposição ao frio e privação de água. Cada metodologia experimental foi realizada 2 vezes, cada uma, não de forma consecutiva (Loyola et al., 2016). Os protocolos foram realizados entre às 9h e às 11 h, em sala isolada e com temperatura controlada. A sequência experimental utilizada para o estresse crônico variado foi a seguinte:

Dia 01 e dia 06: Agitação: os ratos foram colocados individualmente em uma caixa plástica sobre uma mesa agitadora durante 15 minutos, com velocidade média de 50 rpm (Figura 4A).

Dia 02 e dia 07: Nado Forçado: realizado em tanque circular com profundidade de 54 cm e 47 cm de diâmetro, preenchido com água até a altura de 40 cm, evitando contato do rato com o chão ou com a borda superior quando este permanece em livre movimentação na posição vertical. A temperatura da água foi controlada e mantida à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, trocada para cada animal. O tempo do nado forçado foi de 15 minutos (Figura 4B).

Dia 03 e dia 08: Exposição ao frio: os ratos foram expostos à temperatura de 4°C , estando em caixas plásticas individuais pelo período de 30 minutos (Figura 4C).

Dia 04 e dia 09: Restrição Forçada: realizada em aparato metálico ajustado ao corpo, o qual restringe os movimentos, promovendo completa imobilização, mas sem outro tipo de desconforto, com ventilação adequada (Gamaro et al., 1998), pelo período de 2 horas (Ferretti et al., 1995) (Figura 4D).

Dia 05 e dia 10: Privação de Água: removido o bebedouro por 18 horas (Figura 4E).

Figura 4: Fotografia ilustrando os procedimentos utilizados no protocolo de estresse crônico variado. A: Estresse por agitação; B: Nado forçado; C: Estresse por exposição ao frio; D: Estresse por restrição; E: Privação de água. Fonte: autoria própria.

3.4 Teste de Claro e Escuro (TCE)

Para a realização do TCE foi utilizada uma câmara construída de material plástico dividida em dois compartimentos: uma área clara, em que a parte superior é destampada, e

recebe a incidência da luz a 100lux da sala experimental, e uma área escura (com a parte superior coberta, impedindo a penetração da luz da sala experimental para o interior do compartimento).

Os compartimentos possuem as seguintes dimensões: 50 x 80 x 60 cm, e são interconectados por uma abertura (15 x 10 cm) que permite a livre circulação do animal (Figura 5).

Para dar início ao teste o animal foi posicionado no compartimento claro da câmara, com a face voltada para a abertura que liga ao compartimento escuro. Os comportamentos emitidos pelos ratos foram filmados e gravados utilizando o programa Total Media 5.0 por um período de 5 minutos.

Os parâmetros utilizados para avaliar a atividade exploratória foram: o número de transições entre os dois compartimentos, latência para o primeiro de cruzamento, tempo total no compartimento claro e tempo total no compartimento escuro (Bouwknicht e Paylor, 2002; Bourin e Hascoet, 2003). Para ser considerado dentro de um determinado compartimento, foi considerado quando as quatro patas tenham ultrapassado a abertura comunicante entre as áreas.

Ao final de cada teste, a câmara foi limpa com um pano umedecido em solução de álcool 70%.

Figura 5: Aparato utilizado para o Teste de Claro e Escuro. Fonte: autoria própria.

3.5 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é uma plataforma em forma de cruz, elevado 50 cm acima do solo, constituído de 2 braços abertos e 2 braços fechados, com dimensões de 50 x 10 cm, nestes, as paredes são elevadas com altura de 40 cm e os braços abertos apresentam bordas de acrílico com altura de 1 cm (Pellow et al., 1985) (Figura 6).

Para o início do teste, o animal foi posicionado no centro da cruz, com a face voltada para o braço fechado. O teste teve duração total de 5 minutos, e este período foi filmado e gravado e os dados foram analisados utilizando o programa Total Media 5.0.

Cinco parâmetros tradicionais foram utilizados para avaliar a atividade exploratória do animal no LCE:

- 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 por meio 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 *et al.*, 1985).
- Percentual de tempo nos braços abertos: obtido pela relação entre o tempo gasto nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 min):

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

tempo total do teste LCE

Observação: BA indica braços abertos e BF braços fechados.

Além das medidas clássicas, a atividade exploratória do animal foi analisada através de categorias etológicas, descritas em Albrechet-Souza et al. (2008):

- Esquadrinhamento (*Scanning*): número de movimentos horizontais de cabeça incluindo farejar o chão dos braços abertos.
- Exploração de extremidade (*end arm exploration*): número de vezes que o animal alcança o fim dos braços abertos.

- Levantamento (*rearing*): número de levantamentos parciais ou totais que o animal emite em braço fechado com apoio nas patas traseiras.
- Mergulho de cabeça (*head-dipping*): número de movimentos exploratório de cabeça/membros anteriores nas laterais ou extremidades do labirinto, em direção ao “precipício”;
- Espreitamento (*peeping out*): número de projeções da cabeça/ombros dos braços fechados para o centro, sendo que as quatro patas permanecem no braço fechado;
- Esticamento (*stretched-attend-posture*): número da emissão de 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.
- Auto-limpeza (*grooming*): número de comportamentos naturais de auto-limpeza.

As categorias: espreitamento, esticamento e rastejamento, foram agrupadas para representar a categoria de “comportamento de avaliação de risco” de acordo com trabalho prévio (Saito e Brandão, 2014).

Figura 6: Fotografia do aparato utilizado para o teste comportamental do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Fonte autoria própria.

3.6 Eutanásia

Após o término dos experimentos, os ratos foram submetidos a eutanásia por sobredose anestésica da associação de xilazina 4% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (225 mg/kg). Os ratos que foram utilizados para análise imunoistoquímica da enzima

HO foram submetidos, após a anestesia profunda, a ruptura do diafragma para perfusão intracardíaca (conforme descrito no item 3.6. Imunoistoquímica para heme-oxigenase).

3.7 Imunohistoquímica para heme-oxigenase

O protocolo utilizado para realização da imunoistoquímica para HO-1 e HO-2 foi fundamentado na técnica descrita em trabalho prévio de Reis et al. (2012; 2016).

Após o término dos experimentos, os ratos foram anestesiados com sobredose anestésica da associação de xilazina 4% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (225 mg/kg) e realizou-se a perfusão intracardíaca com tampão fosfato-salina (PBS) em temperatura 20°C, seguido de paraformaldeído 4% (PFA 4%). A seguir o encéfalo foi removido e conservado, “overnight”, em solução PFA 4% para pós-fixação. No dia seguinte, o encéfalo foi crioprotégido em solução de sacarose a 30%, tendo permanecido nesta solução até que submergisse completamente, indicando saturação do tecido. Após isso, o tecido encefálico foi rapidamente congelado em isopentano resfriado em gelo seco e armazenado em freezer -80°C até o momento da realização dos cortes em criostato.

Foram realizados cortes flutuantes livres de 40 µm de espessura, os quais foram lavados em PBS por 3 vezes (5 min cada). Os cortes foram incubados com hidreto de boro a 1% em PBS por 10 min. A seguir, o material foi bloqueado em soro de cabra normal a 10% (NGS, Sigma, St. Louis, MO, USA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma) em PBS por 20 minutos. A seguir, os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal Anti-HO-1 (ab13243, Abcam, 1:1000) ou com o anticorpo primário policlonal anti-HO-2 (ab90515, Abcam, 1:1000) em PBS com Triton X 0,5% (TX; Sigma; PBS+TX) por 24h. A seguir, foram lavados 3 vezes (5 min cada) em PBS e incubados por 90 min com anticorpo de cabra-anticoelho fluorescente (Goat Anti-Rabbit igG H&L AlexaFluor 488, ab150077, Abcam, 1:750) em PBS+TX. Finalizada a incubação, os cortes foram transferidos para as lâminas gelatinizadas com auxílio de pincéis e em seguida procedeu-se a montagem em lamínulas sobre as lâminas com a solução de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Inc).

Neste estudo, a área encefálica que foi analisada restringiu-se ao lócus coeruleus, estrutura que possui uma das maiores concentrações da enzima heme-oxigenase no encéfalo (Maines, 1997). Para identificação anatômica da estrutura investigada foi utilizado o Atlas de Paxinos e Watson (1998). Em adição, em algumas secções coronais foi realizada

coloração histológica por técnica de hematoxilina/eosina para identificação anatômica da área.

3.8 Análise estatística

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 seguinte fórmula:

$$\%TBA = 100 \times [TBA / (TBA + TBF)], \text{ onde TBA: Tempo despendido nos braços abertos e TBF: Tempo despendido nos braços fechados.}$$

Além das medidas clássicas foram analisadas também categorias etológicas, de acordo com trabalho de Saito e Brandão (2014): média do número de mergulhos de cabeça, média de levantamentos, média de esquadrinhamentos, média de auto-limpezas, média de explorações de extremidade e média do número de comportamentos de avaliação de risco (espreitamento, esticamento e rastejamento). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para cada parâmetro analisado.

Para o teste claro-escuro, foram calculados o tempo de permanência no compartimento claro ou escuro e a média do número de transições entre os dois compartimentos. Além disso, foi avaliada a latência para a primeira transição para o compartimento escuro. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para cada parâmetro analisado.

Para análise estatística do LCE e do TCE foi utilizada a análise de variância de duas vias, onde os fatores considerados foram: tempo (crônico ou agudo) e tratamento (veículo, CORM-2, CoPP). Foi utilizado para comparação o pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Na avaliação da imunorreatividade à HO-1 e à HO-2 as secções de tecido foram analisadas em microscópio ZEISS e as imagens capturadas por meio da utilização de um sistema de análise de imagem (Axio Vision 4 AC). A análise da densidade neuronal positivamente marcada e intensidade de fluorescência para HO-1 e HO-2 foi realizada com auxílio do programa Image J. Foi realizada contagem arbitrária do número de células com marcação

positiva na região determinada e limitada do tecido nervoso, considerando as referências anatômicas da região a ser investigada, o locus coeruleus (Paxinos e Watson, 1998). A média da intensidade de fluorescência na região demarcada (LC) foi calculada de acordo com metodologia descrita em Reis et al. (2012). Os resultados foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias para comparar os grupos veículo, CORM-2 e CoPP nos dois parâmetros analisados (intensidade de fluorescência e número de células imunorreativas às enzimas HO-1 e HO-2).

4 RESULTADOS

4.1 Teste Claro-Escuro

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o tratamento agudo i.p. com CORM-2 ou CoPP, não alterou os parâmetros avaliados no TCE (Figuras 6A, 6B e 6C). Entretanto, o tratamento sistêmico crônico (10 dias) promoveu aumento do tempo de permanência no compartimento claro e aumento da latência da primeira transição (compartimento claro para o escuro) (Figura 6A e 6B), sem no entanto alterar o número de transições entre os compartimentos (Figura 6C). A aplicação da ANOVA de duas vias considerando o tempo de permanência no compartimento claro mostrou diferença em relação ao tratamento ($F_{2,41} = 12,34$, $p < 0,0001$), no tempo ($F_{1,41} = 7,358$, $p = 0,0097$), mas não revelou interação entre tempo e tratamento ($F_{2,41} = 1,863$, $p = 0,1685$). Nos grupos que receberam tratamento crônico com CoPP ou CORM-2 observou-se aumento significativo do tempo de permanência no compartimento claro comparado com o grupo controle (DMSO, teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 6A). Considerando a latência da primeira transição, a análise estatística apontou diferença no fator tratamento ($F_{2,41} = 6,375$, $p = 0,0040$, ANOVA duas vias), e no período ($F_{1,41} = 10,19$, $p = 0,0028$), porém não encontrou interação tempo e tratamento ($F_{2,41} = 2,464$, $p = 0,0979$). O pós-teste de Tukey evidenciou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado os grupos de tratamento crônico CoPP e CORM com o controle (DMSO, Figura 6B).

A aplicação da ANOVA de duas vias considerando o número de cruzamentos não apontou diferença significativa no tratamento ($F_{2,41} = 0,2188$, $p = 0,8044$), no tempo ($F_{1,41} = 0,124$, $p = 0,7266$) nem interação tempo e tratamento ($F_{2,41} = 0,6619$, $p = 0,5216$; Figura 6C).

Figura 6: Efeito do tratamento i.p. agudo (3 h antes) ou crônico (10 dias/2 vezes/dia) com CoPP (2,5 mg/kg; indutor da enzima HO), CORM-2 (2,5 mg/kg liberador de CO) ou veículo (DMSO) no tempo de permanência no compartimento claro (A), no tempo de latência da primeira fuga (B), e no número de transições entre os compartimentos (C) avaliados no TCE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com seu respectivo grupo controle (DMSO). $N = 6-10$ por grupo.

4.2 Teste de labirinto em cruz elevado

Os resultados do teste do labirinto em cruz elevado mostram que o tratamento sistêmico (i.p.) agudo ou crônico com o indutor da enzima HO-1 (CoPP) ou com o liberador do monóxido de carbono (CORM-2) promoveram alterações nos parâmetros comportamentais observados no teste do LCE (Figuras 7 e 8).

A aplicação da ANOVA de duas vias apontou diferença significativa na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TBA), bem como no número de entradas nos braços abertos (EBA) considerando o fator tratamento ($F_{2,39} = 11,91$; $p = 0,0001$, $F_{2,39} = 20,59$; $p = 0,0001$, respectivamente para %TBA e EBA), mas não houve diferença quanto ao período de tratamento (agudo ou crônico) ($F_{2,39} = 2,207$; $p = 0,1466$; $F_{2,39} = 0,2089$; $p = 0,6502$, respectivamente para %TBA e EBA), nem interação entre tempo-tratamento ($F_{2,39} = 0,2235$; $p = 0,8009$, $F_{2,39} = 0,9489$; $p = 0,3959$, respectivamente para %TBA e EBA). O pós-teste de Tukey evidenciou diferença entre os grupos CORM-2 e CoPP (tratamento agudo ou crônico) quando comparado com os respectivos grupos controle (DMSO, $p < 0,05$, Figuras 7A e B). Em adição não há diferença significativa entre CORM-2 e CoPP considerando tratamento agudo ou crônico. Além disso, a análise de variância não demonstrou diferença entre os tratamentos ($F_{2,39} = 2,406$; $p = 0,1045$) ou entre os períodos (agudo ou crônico) ($F_{1,39} = 0,001132$; $p = 0,9159$) nem interação tratamento e período ($F_{2,39} = 0,8247$; $p = 0,4465$) quando considerou-se o número de entradas nos braços fechados (Figura 7C).

Em relação às medidas complementares do LCE, a ANOVA de duas vias mostrou que há diferença significativa no comportamento de avaliação de risco, na média do mergulho de cabeça e no esquadrinhamento considerando o fator tratamento ($F_{2,43} = 30,39$, $p < 0,0001$; $F_{2,43} = 12$, $p < 0,0001$; $F_{2,43} = 15,52$, $p < 0,0001$ para avaliação de risco, mergulho de cabeça e esquadrinhamento respectivamente), tempo ($F_{1,43} = 5,001$, $p = 0,003$; $F_{1,43} = 8,297$, $p = 0,0064$ para avaliação de risco e esquadrinhamento respectivamente), mas não ocorreu interação tratamento-tempo ($F_{2,43} = 1,236$, $p = 0,3006$; $F_{2,43} = 0,01658$, $p = 0,9836$; $F_{2,43} = 0,1793$, $p = 0,8365$ para avaliação de risco, mergulho de cabeça, e esquadrinhamento respectivamente). O pós-teste de Tukey apontou que os grupos CORM e CoPP são diferentes quando comparados com os grupos DMSO no tratamento agudo ou crônico (Figuras 8 A-C). Entretanto, a análise de variância (ANOVA de duas vias) não apontou diferença significativa em relação aos comportamentos de levantamento, auto-limpeza e exploração da extremidade dos braços abertos (Figuras 8D-F).

Figura 7: Efeito do tratamento i.p. agudo (3 h antes) ou crônico (10 dias/2 vezes/dia) com CoPP (2,5 mg/kg; indutor da enzima HO), CORM-2 (2,5 mg/kg liberador de CO) ou veículo (DMSO) na porcentagem de tempo nos braços abertos (A), na média de entradas nos braços abertos e (B), e na média de entradas nos braços fechados (C) em ratos avaliados no LCE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com grupo seu respectivo grupo controle (DMSO); # $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com CORM-2 no mesmo período de tratamento. $N = 6-10$ por grupo.

Figura 8: Efeito do tratamento i.p. agudo (3 h antes) ou crônico (10 dias/2 vezes/dia) com CoPP (2,5 mg/kg; indutor da enzima HO), CORM-2 (2,5 mg/kg liberador de CO) ou veículo (DMSO) no comportamento de risco (A), mergulho de cabeça (B), esquadrinhamento (C), na do número de levantamentos (D), comportamento de auto-limpeza (E), e na exploração da extremidade dos braços abertos (F) em ratos avaliados no LCE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com grupo seu respectivo grupo controle (DMSO). $N = 6-10$ por grupo.

4.3 Análise de imunofluorescência

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que tanto o tratamento agudo quanto crônico com CORM-2 (5mg/kg) ou CoPP (2,5mg/kg) foram capazes de induzir o aumento do número de células marcadas positivamente para a enzima HO-1 (Fig. 9A), mas não para HO-2 (Fig. 9B).

A aplicação da ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa do fator tratamento sobre o número de células marcadas para HO-1 ($F_{2, 24} = 49,54$; $P < 0,0001$). O pós teste de Tukey apontou diferença entre o grupo CORM-2 e veículo ($P=0,022$) e entre grupo CoPP e veículo ($P<0,0001$)(Figura 9A).

A análise da densidade neuronal mostrou que somente os tratamentos sistêmicos crônicos (10 dias) com CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5mg/kg) promoveram aumento na intensidade da fluorescência para HO-1 marcada em relação ao background ($F_{2, 25} = 13,56$; $P = 0,0001$). O pós teste de Tukey evidenciou diferença do grupo CORM-2 quando comparado ao veículo ($P = 0,026$) e do grupo CoPP quando comparado ao seu veículo ($P = 0,0008$). O pós teste de Tukey não apontou o mesmo efeito considerando o tratamento agudo com CORM-2 ($P = 0,52$) ou CoPP ($P = 0,22$) em relação ao grupo veículo. O pós teste de Tukey apontou diferença significativa também entre os tratamentos com CoPP e CORM-2 em relação ao aumento do número de células marcadas positivamente tanto com uma única dose ($P = 0,0176$) quanto com tratamento sistêmico por 10 dias ($P = 0,0304$).

Com destaque, a análise do número de células imunorreativas para enzima HO-2 não apresentou alterações em nenhum dos grupos avaliados ($F_{2, 20} = 1,251$; $P = 0,3077$, Figura 9B), bem como não apresentou diferenças quanto a intensidade da fluorescência marcada ($F_{2, 22} = 0,1698$; $P = 0,8449$, Figura 9D).

A figura 10 apresenta uma fotomicrografia da região do locus coeruleus para localização anatômica da área. As figuras 11 e 12 mostram as fotomicrografias da região do LC com a presença de células marcadas positivamente para as enzimas HO-1 e HO-2, respectivamente. Fotomicrografias com HO-2 positivamente marcadas tiveram de receber tratamento de destaque de background somente para melhor visualização, entretanto, as análises foram realizadas utilizando mesmos parâmetros de luminosidade e contraste.

Figura 9: Efeito do tratamento agudo e crônico com CORM-2 (5mg/kg), CoPP (2,5mg/kg) ou veículo sobre o número de células marcadas positivamente para as enzimas HO-1 (A) e HO-2 (B), assim como a intensidade da fluorescência em unidades arbitrárias para células imunorreativas para HO-1 (C) e HO-2 (D). * $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com seu respectivo controle (DMSO); ** $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com (CORM-2) no mesmo período de tratamento.

Figura 10: A) Fotomicrografia com coloração de Hematoxilina-Eosina da região do LC em aumento 5x, bregma 9,72mm; B) Esquema representativo da região do locus coeruleus analisada neste trabalho. SubCD: núcleo subcoeruleus dorsal; SUBCV: núcleo subcoeruleus ventral; 4V: quarto ventrículo. Adaptado de Paxinos e Watson (1998). LC: locus coeruleus.

Figura 11: Imunorreatividade para enzima HO-1 na região do locus coeruleus (LC). (A) Fotomicrografia da região do LC de animal representativo da administração sistêmica (i.p.) aguda (3 h antes, A) ou crônica (durante 10 dias, B) de DMSO, ou CORM-2 (tratamento agudo, C; ou crônico, D) ou CoPP (tratamento agudo, E; ou crônico, F). Aumento em objetiva de 10x. A barra representa escala de 100 µm. Bregma 9,72mm.

Figura 12: Imunorreatividade para enzima HO-2 na região do lócus coeruleus (LC). (A) Fotomicrografia da região do LC de animal representativo da administração sistêmica (i.p.) aguda (3 h antes, A) ou crônica (durante 10 dias, B) de DMSO, ou CORM-2 (tratamento agudo, C; ou crônico, D) ou CoPP (tratamento agudo, E; ou crônico, F). Aumento em objetiva de 10x. A barra representa escala de 100 μ m. Bregma -9,72mm.

4.4 Efeito do Estresse Crônico Variado (ECV)

4.4.1 Teste Claro-Escuro

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que nem protocolo ECV nem tampouco o tratamento dos animais submetidos ao ECV com CORM-2 e CoPP não produziram alterações significativas no tempo no compartimento claro (Figura 13A), no tempo de latência (Figura 13B) e no número total de cruzamentos entre os compartimentos (Figura 13C) no TCE. Ainda, embora a análise de variância de duas vias (ANOVA) ter apontado diferenças significativas no tempo de permanência no compartimento claro ($F_{1,55} = 7,191$; $P = 0,0097$), o pós-teste de Tukey não evidenciou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados no TCE (Figura 13).

Figura 13: Efeito do tratamento i.p. agudo (3 h antes) com CoPP (2,5 mg/kg; indutor da enzima HO), CORM-2 (5 mg/kg liberador de CO) ou veículo (DMSO) no tempo despendido no compartimento claro (A), tempo de latência do primeiro cruzamento (B) e total cruzamentos (C), em ratos submetidos ao ECV e avaliados no TCE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. N = 6-10 por grupo.

4.4.2 Teste de Labirinto em cruz elevado

Os resultados obtidos mostraram que o protocolo ECV não produziu efeitos significativos nos parâmetros comportamentais do LCE (Figuras 14 e 15). Foi realizada uma ANOVA de duas vias que mostrou que animais submetidos ao estresse crônico variado de 10 dias não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (sem estresse) no percentual de tempo nos braços abertos ($F_{1, 55} = 0,666$; $P = 0,4178$, Figura 14A), total de entradas nos braços abertos ($F_{1, 57} = 7,924$; $P = 0,0067$, Figura 14B) e total de entradas nos braços fechados ($F_{1, 63} = 1,068$; $P = 0,3055$, Figura 14C). Os tratamentos com CORM-2 e CoPP nas doses de 5mg/kg e 2,5mg/kg respectivamente, apresentaram efeito nos grupos de animais não estressados, considerando o percentual de tempo nos braços abertos ($F_{2, 55} = 12,68$; $P < 0,0001$, Figura 14A), total de entradas nos braços abertos ($F_{2, 57} = 9,792$; $P = 0,0002$, Figura 14B), avaliação de risco ($F_{2, 60} = 10,21$; $P = 0,0002$, Figura 15A) mergulhos de cabeça ($F_{2, 56} = 6,016$; $P = 0,0043$, Figura 15B) e esquadrinamento ($F_{2, 53} = 12,37$; $P < 0,0001$, Figura 15E).

Figura 14: Efeito do tratamento i.p. agudo (3 h antes) com CoPP (2,5 mg/kg; indutor da enzima HO), CORM-2 (5 mg/kg liberador de CO) ou veículo (DMSO) no percentual de tempo despendido nos braços abertos (A), total de entradas nos braços abertos (B) e total de entradas nos braços fechados (C), em ratos submetidos ao ECV e avaliados no LCE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com grupo seu respectivo grupo controle (DMSO). N = 6-10 por grupo.

Figura 15: Efeito do tratamento i.p. agudo (3 h antes) com CoPP (2,5 mg/kg; indutor da enzima HO), CORM-2 (5 mg/kg liberador de CO) ou veículo (DMSO) no comportamento avaliação de risco (A), mergulho de cabeça (B), esquadrinhamento (C), na do número de levantamentos (D), comportamento de auto-limpeza (E), e na exploração da extremidade dos braços abertos (F). em ratos submetidos ao ECV e avaliados no LCE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com grupo seu respectivo grupo controle (DMSO). $N = 6-10$ por grupo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeito do CO sobre o comportamento emocional

Os resultados do presente trabalho mostram que o tratamento sistêmico agudo ou crônico (durante 10 dias) com o indutor da enzima heme-oxigenase (CoPP) ou com um fármaco liberador de monóxido de carbono (CORM-2) promoveu aumento do número de entradas nos braços abertos do LCE, bem como do tempo de permanência no compartimento claro no TCE (Figs. 7A e 6A). Estes dados sugerem que a ativação da via HO-CO-cGMP promove efeito ansiolítico, sem alterar a atividade locomotora, desde que não se observa aumento do número de cruzamentos entre os braços fechados no teste do LCE (Fig. 7C), nem aumento do número de cruzamentos no TCE (Fig. 6C). Ainda, foi observado aumento da imunorreatividade à enzima HO-1 na região do locus coeruleus, após o tratamento agudo ou crônico, com CoPP ou CORM-2, sugerindo envolvimento de células desta região na modulação do comportamento emocional avaliado nos testes do LCE e TCE.

De fato, nossos resultados corroboram estudo prévio (Carvalho-Costa et al., 2016) onde a administração do substrato da via HO-CO-GMPc intra-LC em ratos promoveu efeito ansiolítico observado nos testes LCE e TCE. Entretanto, este trabalho acrescenta que a modulação da ansiedade pelo monóxido de carbono ocorre provavelmente via aumento da expressão da enzima HO-1 em células do LC. Porém, ainda é necessário investigar se estas células são noradrenérgicas ou não-noradrenérgicas.

É importante destacar que a utilização de múltiplos testes de ansiedade para avaliação emocional, tais como o labirinto em cruz elevado e a caixa de claro-escuro é de grande importância para obtenção de resultados consistentes e confiáveis (Ramos, 2006). Nestes estudo, ambos os testes aqui utilizados (LCE e TCE) possuem como base a avaliação do conflito aproximação-evitação, compartilhando de princípios comuns, mas com sensibilidades diferentes a drogas ansiolíticas (Ramos et al., 2008). Os resultados deste estudo mostraram que o neuromodulador gasoso CO é capaz de promover efeito ansiolítico nos dois testes utilizados, possivelmente via aumento da enzima HO-1 em células da região do LC.

Considerando o tratamento sistêmico crônico com CoPP ou CORM-2 observa-se que além do aumento do percentual de tempo no compartimento claro do TCE ocorreu aumento da latência para o primeiro cruzamento do claro para o escuro (Figura 6B). Trabalhos anteriores mostraram que o fumarato de cetotifeno, fármaco ansiolítico

comparado ao diazepam, promoveu aumento da latência de primeira transição do compartimento claro para o escuro e sugerem que esse comportamento de redução da aversividade ao ambiente iluminado seja um comportamento desinibitório acompanhado de redução da ansiedade (Costall, et al., 1990; 1993 Barnes et al., 1990). Bourin e Hascoet (2003) apontam para duas hipóteses sobre a avaliação deste parâmetro, podendo ser entendido como redução de ansiedade ou sedação. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas no número de transições entre compartimentos ou número de entradas nos braços fechados do LCE, parâmetros de análise do comportamento locomotor do animal (Hascoet e Bourin, 1998; Rodgers et al., 1997), o que fortalece a hipótese do efeito ansiolítico.

Destaca-se que as medidas etológicas apresentam-se como importantes informações complementares sobre a ansiedade do animal avaliado no LCE ou no TCE (Cruz, Frei & Graeff, 1994; Carobrez & Bertoglio, 2005). Em particular no teste do LCE, o aumento dos seguintes parâmetros: exploração da extremidade do braço aberto; mergulho de cabeça e esquadrinamento indicam redução da ansiedade (Saito e Brandão, 2014). Os nossos resultados mostraram que tanto o CoPP como o CORM-2 produziram aumento destes três parâmetros comportamentais, evidenciando o efeito ansiolítico do CO. Ainda, este tratamento reduziu o comportamento de avaliação de risco, outra medida etológica importante que indica redução de ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005).

É importante destacar que os resultados comportamentais observados foram acompanhados do aumento da expressão da enzima HO-1, mas não de HO-2, no locus coeruleus, verificado em análise de imunofluorescência, sugerindo envolvimento desta enzima no efeito ansiolítico encontrado. Os animais tratados com CORM-2 e CoPP apresentaram aumento da expressão da enzima HO-1, entretanto, não ocorreram alterações significativas na expressão de HO-2. De fato, a isoforma HO-2 tem característica constitutiva, diferentemente da HO-1 que é considerada induzível. Além disso, nossos resultados mostraram baixo nível basal da enzima HO-2 no LC, o que difere de resultados prévios descritos por Maines (1997). Também é importante ressaltar que a enzima HO-1 foi imunorreativa tanto a células multipolares grandes quanto fusiformes pequenas do LC, sugerindo possivelmente envolvimento de neurônios majoritariamente noradrenérgicos (Loughlin et al., 1986). Ainda, os resultados mostraram que há aumento da intensidade de fluorescência reativa à enzima HO-1 em animais tratados cronicamente com CoPP e CORM-2 (Figura 9C).

O sistema noradrenérgico faz parte da resposta ao estresse e está associado ao controle do comportamento emocional (Berridge e Waterhouse, 2003). A exposição a situações de medo condicionado (estressor) é capaz de aumentar a liberação de NE no LC (Cassens et al., 1981), assim como aumenta a frequência de disparos dos neurônios do LC (Abercrombie e Jacobs, 1987). Ainda, a administração de ioimbina, um antagonista de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos, pode exacerbar sintomas relacionados aos transtornos de ansiedade pela inibição desses receptores pré-sinápticos e aumento da liberação de NE do LC, enquanto o agonista desses receptores, clonidina, é efetivo no tratamento de pacientes com transtornos de ansiedade (Charney et al., 1984; Charney, 2003). Em contraponto, Khoshbouei et al. (2002) mostraram que a ioimbina pode ter efeito ansiolítico quando administrada antes do estressor, e sugerem que esse efeito possa se dar pelo recrutamento de neurônios imunorreativos à galanina na amígdala central por meio de eferências noradrenérgicas originárias do do LC. Adicionalmente, estudo anterior mostrou que a ativação dos receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos do LC promove modulação cortical que medeia os efeitos antidepressivos e ansiolíticos da desipramina administrada sistemicamente (Mateo et al., 1998).

Um estudo posterior demonstrou que neurônios noradrenérgicos do LC tratados com doadores de NO e CO foram capazes de aumentar a frequência de disparos, efeito revertido por inibidores de GMPC, mostrando a participação dessa via no controle de neurônios do LC, e sugerindo efeito pós-sináptico na regulação tônica dos disparos do LC (Pineda, 1996). Ainda, Carvalho-Costa et al. (2016) mostraram que a microinjeção de heme-lisinato, substrato do CO, promoveu efeitos ansiolíticos em roedores nos testes LCE e TCE e sugeriram que esse efeito possa se dar pela ativação de regiões corticais e amigdaloides promovida pelo aumento de disparos dos neurônios do LC.

Na avaliação comparativa do efeito promovido pelos dois fármacos utilizados neste estudo, CoPP e o CORM-2, pode-se observar que o tratamento agudo com o indutor da HO-1, CoPP promoveu maior aumento no número de entradas nos braços abertos no teste do LCE (Figura 7B), bem como maior aumento de células marcadas positivamente para a enzima HO-1 (Figura 9A) quando comparado com os efeitos promovidos pela administração aguda de CORM-2. Embora os dois fármacos utilizados possuem sua ação biológica via ativação da via HO-CO-GMPC, o CORM-2 possui como característica degradação rápida pela alta reatividade ao oxigênio (Motterlini et al., 2002). Além disso, é possível que o CO liberado pela ação sistêmica do CORM-2 tenha sido absorvido por outros tecidos antes de atravessar a barreira hematoencefálica (Nobre et al., 2016), enquanto que

o CoPP, por ter ação específica na indução da enzima HO promoveu maior imunorreatividade à HO-1 em células do LC do que o CORM-2.

Em suma, corroborando a hipótese inicial, a administração sistêmica de indutores da via HO-CO-GMPc mostrou-se um importante mecanismo na regulação do comportamento emocional, promovendo consistente efeito ansiolítico. Dessa forma, é possível que o CO possa ser uma potencial intervenção farmacológica no tratamento de transtornos psiquiátricos relacionados à ansiedade.

5.2 Efeito do ECV e sua relação com o CO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o ECV não alterou os parâmetros comportamentais avaliados no LCE e no TCE 3 horas após o término do último estressor (Figuras 13, 14 e 15). Ainda o tratamento sistêmico agudo com CoPP ou CORM-2 não alterou o comportamento dos animais submetidos ao ECV.

É importante destacar que o efeito do ECV sobre comportamentos tipo-depressivo está bem estabelecido em testes de interação social, consumo de sucrose e comportamento sexual (Willner et. al., 1992; Forbes et. al., 1996, Gronli et al., 2005), entretanto seu efeito sobre o comportamento tipo ansioso permanece não esclarecido e ambíguo (Kompagne et. al., 2008). Um estudo de Matuszewich et. al. (2007) mostrou que o ECV de 10 dias não apresentou efeito no comportamento tipo ansioso, verificado através do teste de LCE e TCE, sendo observado apenas efeito latente de 7 e 14 dias após estresse sobre teste de enterrar. Um estudo anterior mostrou que o ECV de 14 dias apresentou efeito ansiolítico avaliado no LCE (D'Aquila, et. al., 1994). Mineur et al. (2006) avaliaram o comportamento de animais submetidos a ECV de média intensidade em 7 testes comportamentais: ECV, TCE, teste de campo aberto, teste de suspensão pela cauda, reflexo de sobressalto, nado forçado e teste de limpeza e verificaram que de maneira geral o ECV pode aumentar comportamentos tipo depressivo nos testes de sobressalto, nado forçado, suspensão pela cauda e auto-limpeza enquanto os testes LCE, TCE e campo aberto, testes que avaliam ansiedade, não diferiram do grupo controle em sua maioria, apresentando efeito do sexo e linhagem dos animais. Neste estudo, o protocolo de ECV de 10 dias com apresentação do estímulo uma vez ao dia não alterou o comportamento nos parâmetros de ansiedade analisados no LCE e TCE.

Alguns autores mostram que o ECV, diferentemente do modelo de estresse repetido crônico, exerce pouco efeito sobre neurônios piramidais da área CA3 do hipocampo (responsável pelo feedback negativo em resposta ao estresse) e promove atrofia somente em neurônios bipolares da amígdala basolateral, não produzindo efeitos do tipo ansioso em testes como LCE e TCE, enquanto o estresse repetido produziu atrofia em neurônios do hipocampo, aumentou a arborização de neurônios da amígdala e produziu efeitos ansiogênicos (Vyas et. al., 2002, 2004). Evidências adicionais apontam para o componente genético da reatividade ao ECV de média intensidade, sugerindo que alguns animais seriam mais suscetíveis a apresentar comportamentos de tipo ansioso e depressivo (Mineur et. al., 2006). Matuszewich e colaboradores (2007) mostram que também é possível que o efeito do ECV de 10 dias apresente efeito retardado, sendo observado comportamento do tipo ansioso somente 7 e 14 dias após o fim do estresse.

O tratamento com indutor de HO-1 e liberador de CO não mostraram diferença em animais submetidos ao ECV mesmo que esses não apresentassem comportamento tipo ansioso. É possível que animais submetidos a esse protocolo apresentem essa alteração em testes como consumo de sucrose e interação social (Forbes et. al., 1996). Dessa forma, a via HO-CO-GMPc não participaria da modulação dos comportamentos tipo depressivo, mas sim relacionados à ansiedade.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados pode-se concluir que a via HO-CO, ao menos em parte, está envolvida na modulação emocional desempenhada pelo LC. Entretanto, apesar da administração de indutor da enzima HO-1 e liberador de CO terem reduzido ansiedade em animais não estressados essa via parece não participar da modulação emocional em animais submetidos ao estresse crônico.

Além disso a ativação dessa via tanto reduziu a ansiedade como aumentou a expressão de HO-1 no LC, sem alterar a expressão de HO-2. Sendo assim, pela primeira vez demonstramos a expressão de HO-1 no LC, sugerindo efeito de HO-1 sobre a ansiedade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, E. D., & Jacobs, B. L. (1987). Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli. *J Neurosci*, 7(9), 2837-2843.
- Albrechet-Souza L ; Borelli, K. G. ; Brandão, M. L. (2008). Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 169, p. 109-118.
- Barañano, D. E., & Snyder, S. H. (2001). Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 10996-11002.
- Bard, P. (1928). "A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system". *American Journal of Physiology*. 84: 490-516.
- Barnes, N. M., Costall, B., Kelly, M. E., Onaivi, E. S., & Naylor, R. J. (1990). Ketotifen and its analogues reduce aversive responding in the rodent. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37(4), 785-793.
- Berridge, C. W. (2008). Noradrenergic modulation of arousal. *Brain research reviews*, 58(1), 1-17.
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, 42(1), 33-84.
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1971). Defensive reactions in the albino rat. *Learning and Motivation*, 2(4), 351-362.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual review of psychology*, 39(1), 43-68.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., & Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural brain research*, 58(1), 155-165.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, 463(1), 55-65.
- Bouwknicht, J. A., Olivier, B., & Paylor, R. E. (2007). The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(1), 41-59.
- Brain, P.F., Kusumorini, N., Benton, D. (1991) 'Anxiety' in laboratory rodents: a brief review of some recent behavioural developments. *Behavioural Process*, 25, 71-80.
- Brandão, M. L., Vianna, D. M., Masson, S., & Santos, J. (2003). Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. *Rev Bras Psiquiatr*, 25(Supl II), 36-41.
- Brandão, M. L. (2005). As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência.

- Campos, A. C.; Fogaça, M. V.; Aguiar, D. C. e Guimarães, F. S. (2013) Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatr. [online]*., vol.35, suppl.2, pp.S101-S111.
- Cannon, W. B. (1987). The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. *The American journal of psychology*, 100(3/4), 567-586.
- Carcolé, M., Castany, S., Leáñez, S., & Pol, O. (2014). Treatment with a Heme Oxygenase 1 Inducer Enhances the Antinociceptive Effects of μ -Opioid, δ -Opioid, and Cannabinoid 2 Receptors during Inflammatory Pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351(1), 224-232.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205.
- Cassens, G., Kuruc, A., Roffman, M., Orsulak, P. J., & Schildkraut, J. J. (1981). Alterations in brain norepinephrine metabolism and behavior induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Behavioural brain research*, 2(3), 387-407.
- Chanana, P., & Kumar, A. (2016). Possible Involvement of Nitric Oxide Modulatory Mechanisms in the Neuroprotective Effect of *Centella asiatica* Against Sleep Deprivation Induced Anxiety Like Behaviour, Oxidative Damage and Neuroinflammation. *Phytotherapy Research*.
- Charney, D. S., & Redmond, D. E. (1983). Neurobiological mechanisms in human anxiety evidence supporting central noradrenergic hyperactivity. *neuropharmacology*, 22(12), 1531-1536.
- Charney, D. S., Heninger, G. R., & Breier, A. (1984). Noradrenergic function in panic anxiety: effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Archives of General Psychiatry*, 41(8), 751-763.
- Charney, D. S. (2003). Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 108(s417), 38-50.
- Chmielarz, P., Kuśmierczyk, J., Parlato, R., Schütz, G., Nalepa, I., & Kreiner, G. (2013). Inactivation of glucocorticoid receptor in noradrenergic system influences anxiety-and depressive-like behavior in mice. *PloS one*, 8(8), e72632.
- Cintra, L., Di, S., Kemper, T., & Morgane, P. J. (1982). Nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain research*, 247(1), 17-28.
- Costall, B., Kelly, M. E., Onaivi, E. S., & Naylor, R. J. (1990). The effect of ketotifen in rodent models of anxiety and on the behavioural consequences of withdrawing from treatment with drugs of abuse. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 341(6), 547-551.
- Costall, B., Domeney, A. M., Kelly, M. E., Tomkins, D. M., Naylor, R. J., Wong, E. H., ... & Eglen, R. M. (1993). The effect of the 5-HT₃ receptor antagonist, RS-42358-197, in animal models of anxiety. *European journal of pharmacology*, 234(1), 91-99.

- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1), 171-176.
- Darwin, C. The expression of emotions in man and animals. Chicago & London: The University of Chicago Press. (Reeditado em 1965).
- De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463-475.
- Ewing, J. F., & Maines, M. D. (2006). Regulation and expression of heme oxygenase enzymes in aged-rat brain: age related depression in HO-1 and HO-2 expression and altered stress-response. *Journal of neural transmission*, 113(4), 439-454.
- Fan, W., Dong, W., Leng, S., Li, D., Cheng, S., Li, C. & He, H. (2008). Expression and colocalization of NADPH-diaphorase and heme oxygenase-2 in trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Journal of molecular histology*, 39(4), 427-433.
- Fan, W., Dong, W., Leng, S., Li, D., Cheng, S., Li, C. & He, H. (2008). Expression and colocalization of NADPH-diaphorase and heme oxygenase-2 in trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Journal of molecular histology*, 39(4), 427-433.
- Ferretti, C., Blengio, M., Gamalero, S. R., & Ghi, P. (1995). Biochemical and behaviour changes induced by acute stress in a chronic variate stress model of depression: the effect of amitriptyline. *European journal of pharmacology*, 280(1), 19-26.
- Forbes, N. F., Stewart, C. A., Matthews, K., & Reid, I. C. (1996). Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiology & Behavior*, 60(6), 1481-1484.
- Foresti, R., & Motterlini, R. (1999). The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free radical research*, 31(6), 459-475.
- Gamaro, G. D., Xavier, M. H., Denardin, J. D., Pilger, J. A., Ely, D. R., Ferreira, M. B. C., & Dalmaz, C. (1998). The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiology & behavior*, 63(4), 693-697.
- Gao, S. F., Lu, Y. R., Shi, L. G., Wu, X. Y., Sun, B., Fu, X. Y., ... & Bao, A. M. (2014). Nitric oxide synthase and nitric oxide alterations in chronically stressed rats: A model for nitric oxide in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 47, 136-140.
- Gold, Philip W., Frederick K. Goodwin, and George P. Chrousos. "Clinical and biochemical manifestations of depression: Relations to the neurobiology of stress." *The New England Journal of Medicine* (1988).
- Gold, P. W., Machado-Vieira, R., & Pavlatou, M. G. (2015). Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. *Neural plasticity*.
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2), 109-120.
- Goldstein, David S. (2010). Adrenal responses to stress. *Cellular and molecular neurobiology* 30.8: 1433-1440.

- Gou, G., Leáñez, S., & Pol, O. (2014). The role of gaseous neurotransmitters in the antinociceptive effects of morphine during acute thermal pain. *European journal of pharmacology*, 737, 41-46.
- Gou, Gemma, Sergi Leáñez, and Olga Pol. (2014). The role of gaseous neurotransmitters in the antinociceptive effects of morphine during acute thermal pain. *European Journal of Pharmacology*. 737: 41-46.
- Graeff, F.G., Guimarães, F.S. (2012). Fundamentos de Psicofarmacologia. Ed. ATHENEU 2ª Edição.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (1982). The neuropsychology of anxiety. *Oxford Univ. Press, New York*, 25, 320-341.
- Grønli, J., Murison, R., Fiske, E., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Portas, C. M., & Ursin, R. (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiology & behavior*, 84(4), 571-577.
- Grzanna, R., & Molliver, M. E. (1980). The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience*, 5(1), 21-40.
- Hascoët, M., Bourin, M., & Dhonnchadha, B. Á. N. (2001). The mouse light-dark paradigm: a review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(1), 141-166.
- Hervera, A., Gou, G., Leáñez, S., & Pol, O. (2013). Effects of treatment with a carbon monoxide-releasing molecule and a heme oxygenase 1 inducer in the antinociceptive effects of morphine in different models of acute and chronic pain in mice. *Psychopharmacology*, 228(3), 463-477.
- Hervera, A., Leáñez, S., Negrete, R., Motterlini, R., & Pol, O. (2012). Carbon monoxide reduces neuropathic pain and spinal microglial activation by inhibiting nitric oxide synthesis in mice. *PloS one*, 7(8), e43693.
- Hess, W.R, Brügger M.. (1943) Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta* ;1:33-52.
- James, W. (1884). II.—What is an emotion?. *Mind*, (34), 188-205.
- Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 459-466.
- Kalouda, T., & Pitsikas, N. (2015). The nitric oxide donor molsidomine induces anxiolytic-like behaviour in two different rat models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 138, 111-116.
- Khoshbouei, H., Cecchi, M., Dove, S., Javors, M., & Morilak, D. A. (2002). Behavioral reactivity to stress: amplification of stress-induced noradrenergic activation elicits a galanin-mediated anxiolytic effect in central amygdala. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(3), 407-417.
- Kim, J., & Gorman, J. (2005). The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 4(5), 335-347.

- Klüver, H., & Bucy, P. C. (1939). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 42(6), 979-1000.
- Kompagne, H., Bárdos, G., Szénási, G., Gacsályi, I., Hársing, L. G., & Lévy, G. (2008). Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behavioural brain research*, 193(2), 311-314.
- Koob, G. F. (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biological psychiatry*, 46(9), 1167-1180.
- Lange, C. G. (1885). Om sindsbevaegelser; et psyko-fysiologisk studie. Lund.
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*, 23(4-5), 727-738.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L., & Bloom, F. E. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience*, 18(2), 291-306.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L., & Grzanna, R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience*, 18(2), 307-319.
- Loyola, B. M., Nascimento, G. C., Fernández, R. A. R., Iyomasa, D. M., Pereira, Y. C. L., Leite-Panissi, C. R. A., ... & Iyomasa, M. M. (2016). Chronic stress effects in contralateral medial pterygoid muscle of rats with occlusion alteration. *Physiology & Behavior*, 164, 369-375.
- MacLean, P. (1949). Psychosomatic disease and the "visceral brain". *Journal of Psychosomatic Medicine*. 11, 338-353.
- MacLean, P. D. (1952). Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 4(4), 407-418.
- Maines, M. D. (1992). Heme oxygenase: clinical applications and functions. CRC Press.
- Maines, M. D. (1993). Carbon monoxide: an emerging regulator of cGMP in the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 4(5), 389-397.
- Maines, Mahin D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37.1: 517-554.
- Mancuso, Cesare, Pierluigi Navarra, and Paolo Preziosi. (2010). Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Journal of Neurochemistry*. 113.3: 563-575.
- Masuko, S., Nakajima, Y., Nakajima, S., & Yamaguchi, K. (1986). Noradrenergic neurons from the locus ceruleus in dissociated cell culture: culture methods, morphology, and electrophysiology. *The Journal of neuroscience*, 6(11), 3229-3241.

- Mateo, Y., Pineda, J., & Meana, J. J. (1998). Somatodendritic $\alpha 2$ -Adrenoceptors in the Locus Coeruleus Are Involved in the In Vivo Modulation of Cortical Noradrenaline Release by the Antidepressant Desipramine. *Journal of neurochemistry*, 71(2), 790-798.
- Matuszewich, L., Karney, J. J., Carter, S. R., Janasik, S. P., O'Brien, J. L., & Friedman, R. D. (2007). The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. *Physiology & behavior*, 90(4), 674-681.
- McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., & Bruchas, M. R. (2015). CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron*, 87(3), 605-620.
- McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemo- protein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 72.
- McEwen, B. S. (2016). In pursuit of resilience: stress, epigenetics, and brain plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- McNaughton, N. (2011). Fear, anxiety and their disorders: Past, present and future neural theories. *Psychology & Neuroscience*, 4(2), 173.
- Mineur, Y. S., Belzung, C., & Crusio, W. E. (2006). Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural brain research*, 175(1), 43-50.
- Mitra, R., Vyas, A., Chatterjee, G., & Chattarji, S. (2005). Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. *Neuroscience letters*, 383(3), 278-283.
- Mobbs, D., & Kim, J. J. (2015). Neuroethological studies of fear, anxiety, and risky decision-making in rodents and humans. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 5, 8-15.
- Morgane, P. J., Galler, J. R., & Mokler, D. J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in neurobiology*, 75(2), 143-160.
- Motterlini, R., Clark, J. E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Mann, B. E., & Green, C. J. (2002). Carbon monoxide-releasing molecules characterization of biochemical and vascular activities. *Circulation research*, 90(2), e17-e24.
- Navarra, P., Dello Russo, C., Mancuso, C., Preziosi, P., & Grossman, A. (2000). Gaseous neuromodulators in the control of neuroendocrine stress axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 638-646.
- Negrete, R., Hervera, A., Leáñez, S., & Pol, O. (2014). Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule inhibits chronic inflammatory pain in mice: nitric oxide contribution. *Psychopharmacology*, 231(5), 853-861.
- Negrete, R., Hervera, A., Leáñez, S., & Pol, O. (2014). Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule inhibits chronic inflammatory pain in mice: nitric oxide contribution. *Psychopharmacology*, 231(5), 853-861.

- Nobre, L. S., Jeremias, H., Romão, C. C., & Saraiva, L. M. (2016). Examining the antimicrobial activity and toxicity to animal cells of different types of CO-releasing molecules. *Dalton Transactions*, 45(4), 1455-1466.
- Pacak, K., Palkovits, M., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (1995). Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Frontiers in neuroendocrinology*, 16(2), 89-150.
- Papez, J. W. (1937). A proposed mechanism of emotion. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 38(4), 725-743.
- Paolo, S. D., Brain, P., & Willner, P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & behavior*, 56(5), 861-867.
- Patt, S., & Gerhard, L. (1993). A Golgi study of human locus coeruleus in normal brains and in Parkinson's disease. *Neuropathology and applied neurobiology*, 19(6), 519-523.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Gulf Professional Publishing.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.
- Pineda, Joseba, Jeffrey H. Kogan, and George K. Aghajanian. (1996). Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *The Journal of neuroscience* 16.4: 1389-1399.
- Pinto, A. C. (2001). *Psicologia Geral*. Lisboa: Universidade Aberta. Nº 227. (340 páginas). ISBN: 972-674-339-7. DL: 164485/01
- Pol, Olga. (2007). The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Current Medicinal Chemistry* 14.18: 1945-1955.
- Proudfit, H. K., & Clark, F. M. (1991). The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. *Progress in brain research*, 88, 123-141.
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. *Trends in pharmacological sciences*, 29(10), 493-498.
- Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D., & Izídio, G. S. (2008). Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural brain research*, 193(2), 277-288.
- Ravanelli, M.I.B., and Branco, L.G.S (2008). Role of locus coeruleus heme oxygenase–carbon monoxide–cGMP pathway during hypothermic response to restraint. *Brain Research Bulletin* 75.5: 526-532.

- Redmond, D. E., Huang, Y. H., Snyder, D. R., & Maas, J. W. (1976). Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. *Brain research*, 116(3), 502-510.
- Redmond, D. E., & Huang, Y. H. (1979). II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life sciences*, 25(26), 2149-2162.
- Reis, W. L., Biancardi, V. C., Son, S., Antunes-Rodrigues, J., & Stern, J. E. (2012). Enhanced Expression of Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide Excitatory Effects in Oxytocin and Vasopressin Neurones During Water Deprivation. *Journal of neuroendocrinology*, 24(4), 653-663.
- Reis W.L., Biancardi V.C., Zhou Y., Stern J.E. (2016). A Functional Coupling Between Carbon Monoxide and Nitric Oxide Contributes to Increased Vasopressin Neuronal Activity in Heart Failure rats. *Endocrinology*. 2016 May;157(5):2052-66.
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 801-810.
- Rolls, E. T. (2015). Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. *Cortex*, 62, 119-157.
- Roxo, M. R., Franceschini, P. R., Zubaran, C., Kleber, F. D., & Sander, J. W. (2011). The limbic system conception and its historical evolution. *The Scientific World Journal*, 11, 2427-2440.
- Ryter, S. W., Otterbein, L. E., Morse, D., & Choi, A. M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular and cellular biochemistry*, 234(1), 249-263.
- Saito, V. M., & Brandão, M. L. (2015). The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. *Neuropharmacology*, 88, 180-186.
- Samuels, E. R., & Szabadi, E. (2008). Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Current neuropharmacology*, 6(3), 235-253.
- Sara, S. J., & Bouret, S. (2012). Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron*, 76(1), 130-141.
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Current Biology*, 25(21), R1051-R1056.
- Shi, S. S., Shao, S. H., Yuan, B. P., Pan, F., & Li, Z. L. (2010). Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei medical journal*, 51(5), 661-671.

- Singewald, N., & Philippu, A. (1998). Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Progress in neurobiology*, 56(2), 237-267.
- Soriano, R. N., Kwiatkoski, M., Batalhao, M. E., Branco, L. G. S., & Carnio, E. C. (2012). Interaction between the carbon monoxide and nitric oxide pathways in the locus coeruleus during fever. *Neuroscience*, 206, 69-80.
- Stocker, R. (1990). Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free radical research communications*, 9(2), 101-112.
- Sun, Y., Hunt, S., & Sah, P. (2015). Norepinephrine and corticotropin-releasing hormone: partners in the neural circuits that underpin stress and anxiety. *Neuron*, 87(3), 468-470.
- Sved, A. F., Cano, G., Passerin, A. M., & Rabin, B. S. (2002). The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiology & behavior*, 77(4), 737-742.
- Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Takeda, S., Nagasaki, N., & Noda, Y. (1983). Regional characteristics of stress-induced increases in brain noradrenaline release in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 19(3), 543-547.
- Tanaka, M., Yoshida, M., Emoto, H., & Ishii, H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European journal of pharmacology*, 405(1), 397-406.
- Tsuda, A., Tanaka, M., Kohno, Y., Nishikawa, T., Iimori, K., Nakagawa, R., ... & Nagasaki, N. (1982). Marked enhancement of noradrenaline turnover in extensive brain regions after activity-stress in rats. *Physiology & behavior*, 29(2), 337-341.
- Valentino, R. J., Foote, S. L., & Page, M. E. (1993). The Locus Coeruleus as a Site for Integrating Corticotropin-Releasing Factor and Noradrenergic Mediation of Stress Responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697(1), 173-188.
- Vyas, A., Mitra, R., Rao, B. S., & Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6810-6818.
- Vyas, A., Pillai, A. G., & Chattarji, S. (2004). Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128(4), 667-673.
- Wall, P. M., & Messier, C. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 275-286.
- Weisfeld, G. E., & Goetz, S. M. (2013). Applying evolutionary thinking to the study of emotion. *Behavioral Sciences*, 3(3), 388-407.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134(4), 319-329.

- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93(3), 358-364.
- Wu, Lingyun, and Rui Wang. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological reviews* 57.4: 585-630.
- Xu, Z. Q. D., De Vente, J., Steinbusch, H., Grillner, S., & Hökfelt, T. (1998). The NO-cGMP pathway in the rat locus coeruleus: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies. *European Journal of Neuroscience*, 10(11), 3508-3516.
- Ziegler, D. R., Cass, W. A., & Herman, J. P. (1999). Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *Journal of neuroendocrinology*, 11(5), 361-370.

8 ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 060/2015

Ribeirão Preto, 17 de junho de 2015.

Ref. processo nº 2015.1.531.58.4

Senhora Pesquisadora,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 29ª Sessão, realizada em 17/06/2015, **aprova** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do comportamento emocional em ratos submetidos ao estresse crônico", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 30/11/2017**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado. Atenciosamente,

Profa. Dra. Andriara de Rossi Daldegan
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ílma. Sra.

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

./cfc

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Possível envolvimento do monóxido de carbono na modulação do comportamento emocional em ratos submetidos ao estresse crônico”, Protocolo nº 2015.1:531.58.4, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em reunião de 17/06/2015.

Vigência do Projeto	01/08/2014 a 31/10/2017
Espécie/Linhagem	Rato / Wistar
Nº de animais	192
Peso/Idade	200-250 g / 2 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 17 de junho de 2015.

Profa. Dra. Andíara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled "**Possible involvement of the carbon monoxide in the modulation of emotional behavior in rats submitted to chronic stress**" Protocol 2015.1.531.58.4 under the responsibility of Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 17/06/2015.

Duration of the Project	01/08/2014 a 31/10/2017
Species/Lineage	Rat / Wistar
Nº of animals	192
Weight / age	200-250 g / 2 weeks
Gender	Male
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, June 17th, 2015.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP