

PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO HIPOCAMPO: INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL NO DESENVOLVIMENTO DE COMPORTAMENTOS ANSIOSOS EM ANIMAIS SUBMETIDOS A ESTRESSE NEONATAL

HIPPOCAMPAL NITRIC OXIDE PRODUCTION: INVESTIGATION OF THE ROLE OF NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN THE DEVELOPMENT OF ANXIETY-LIKE BEHAVIORS IN ANIMALS SUBJECTED TO NEONATAL STRESS

Roberta Dalle Molle¹, Rachel Krolow³, Rebeca Bosse de Jesus¹,
André Krumel Portella¹, Carla Dalmaz³, Gisele Gus Manfro²,
Patrícia Pelufo Silveira¹

RESUMO

Revista HCPA. 2012;32(1): 42-48

¹Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria. Faculdade de Medicina, HCPA, UFRGS.

³Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS.

Contato:

Roberta Dalle Molle
betinha_dm@yahoo.com
Porto Alegre, RS, Brasil.

Introdução: estudos indicam que o trauma precoce e o sistema serotoninérgico estão relacionados ao desenvolvimento de ansiedade. Esta relação poderia ser mediada pela enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), que tem papel importante no funcionamento dos receptores de serotonina.

Objetivo: investigar, através da mensuração do óxido nítrico (NO) no hipocampo, o possível envolvimento da nNOS no desenvolvimento de ansiedade em um modelo animal de adversidade no início da vida, baseado na qualidade do cuidado materno.

Métodos: ao segundo dia de vida, genitoras Wistar e suas ninhadas foram divididas em dois grupos: intervenção, com redução do material para a confecção do ninho, ou controle. O comportamento materno foi observado do dia 1 ao dia 9 de vida. Na vida adulta, realizaram-se testes comportamentais e determinaram-se os níveis hipocámpais de NO, através da mensuração de seus produtos de degradação.

Resultados: observou-se um maior comportamento do tipo ansioso no grupo intervenção, cujas genitoras apresentaram maior contato de baixa qualidade com seus filhotes. Nos machos, o cuidado materno de baixa qualidade correlacionou-se negativamente com o tempo no braço aberto e a frequência de mergulhos ($r=-0,4$; $p=0,03$) avaliados no labirinto em cruz elevado. O comportamento materno de lamber os filhotes correlacionou-se com a frequência de mergulhos em ambos os sexos ($r=0,5$; $p<0,001$). A quantidade de NO no hipocampo não diferiu entre os grupos.

Conclusão: uma maior atividade da nNOS não parece estar envolvida no comportamento ansioso observado neste modelo animal, no entanto a relação mãe-filhote, alterada por um ambiente neonatal adverso, teve impacto sobre o comportamento ansioso de forma sexo específica.

Palavras-chave: experimentação animal; comportamento materno; ansiedade; óxido nítrico sintase

ABSTRACT

Background: studies have shown that an adverse early life environment and the serotonergic system are related to the development of anxiety. This association could be mediated by neuronal nitric oxide synthase (nNOS), an enzyme that plays an important role in serotonin receptor functioning.

Aim: to investigate the possible role of nNOS in the development of anxiety by measuring hippocampal nitric oxide (NO) in an animal model of neonatal stress, based on the quality of maternal care.

Methods: on the second day of life, Wistar dams and their litters were divided in two groups: intervention, with limited access to nesting material, or control. Maternal behavior was observed from day 1 to 9 of life. In adult life, behavioral tests were performed and hippocampal NO levels were determined by measuring its degradation products.

Results: there was more frequent anxiety-like behavior in the intervention group, whose dams showed low quality contact with their pups more often. In males, low quality maternal care was negatively correlated with time spent in open arms and frequency of head dips ($r=-0.4$; $p=0.03$) assessed using an elevated plus maze. Licking and grooming score was correlated with frequency of head dips in both sexes ($r=0.5$; $p<0.001$). Hippocampal NO levels were not different between groups ($p=0.992$).

Conclusion: a higher nNOS activity does not seem to be involved in anxiety-like behavior observed in this animal model, however the relationship between dam and pup, modified by an adverse early life environment, had a different impact on anxiety behavior between sexes.

Keywords: *Animal experimentation; maternal behavior; anxiety; nitric oxide synthase*

A patogênese dos transtornos de ansiedade tem sido relacionada ao sistema serotoninérgico (5-HT) que é regulado principalmente pelos transportadores e receptores de serotonina (1). Dentre os vários subtipos de receptores de serotonina, a subsensibilização (downregulation) do receptor 5-HT_{1A}, no hipocampo e no lobo temporal, está frequentemente associada à ansiedade e à depressão (2). A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), que produz citrulina e óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina, tem um papel importante na função pós-sináptica dos receptores 5-HT_{1A} e/ou 5-HT_{1B} (3) e estudos têm indicado que a nNOS está envolvida nos comportamentos relacionados à ansiedade (4,5). Além disso, um estudo recente encontrou que a inibição da nNOS produz efeitos ansiolíticos e anula o efeito ansiogênico do antagonista do receptor 5-HT_{1A}, sugerindo que esta enzima está relacionada à regulação dos comportamentos do tipo ansioso (6).

Como o trauma no início da vida parece influenciar o risco para o desenvolvimento de ansiedade e outras psicopatologias na vida adulta (7,8), e sabe-se que existem diferenças na expressão dos comportamentos ansiosos entre os sexos (9-11), é de extrema importância que se desenvolvam modelos para compreender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de ansiedade, abordando os desfechos tanto em machos quanto em fêmeas. Portanto, o objetivo deste estudo é

investigar, através da mensuração do NO no hipocampo, o possível envolvimento da nNOS no desenvolvimento de ansiedade, em ambos os sexos, em um modelo animal de adversidade no início da vida, baseado na qualidade do comportamento materno.

MÉTODOS

Animais

Ratas Wistar prenhas nulíparas, acasaladas na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), permaneceram em caixas-moradia individuais (40 cm x 40 cm x 30 cm) com assoalho de malha metálica (1 cm x 1 cm) distante 2 cm de um coletor móvel para urina e fezes. Durante a gestação, o assoalho das caixas-moradia foi mantido recoberto com maravalha e as genitoras permaneceram em ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 10/14 horas (luzes acendiam às 9:00h e apagavam às 19:00h), temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, limpeza uma vez por semana, água e comida *ad libitum*.

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o Dia 0. No dia 2, as fêmeas e suas ninhadas foram randomizadas para dois grupos (ver abaixo). O comportamento materno foi monitorado do dia 1 ao dia 9 de vida. No dia 10, as fêmeas e seus filhotes foram removidos para uma caixa-moradia padrão (46 cm x 31 cm x 16 cm) com o assoalho recoberto com maravalha e mantidos no mesmo ambiente

controlado citado acima. No dia 21 de vida, os filhotes foram desmamados e separados por sexo em dois ou três por caixa-moradia e mantidos em um ambiente similar ao descrito acima, exceto pelo ciclo claro/escuro (luzes acendiam às 7:00h e apagavam às 19:00h).

Dezessete ninhadas, divididas em duas coortes, foram utilizadas para análise do cuidado materno. Noventa e cinco ratos adultos, de ambos os sexos, foram utilizados para os testes comportamentais iniciados no dia 60 de vida, obedecendo a um intervalo entre testes de no mínimo uma semana. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, número do projeto 09-527). Os testes foram realizados em salas de comportamento aclimatadas na UEA-HCPA.

Modelo de estresse neonatal

Grupo intervenção (ambiente neonatal adverso): restrição do material para a confecção do ninho durante oito dias (do dia 2 ao dia 9 pós-natal), que consiste em remover a maravalha da caixa-moradia e oferecer um total de apenas 2000 cm³ de papel toalha para a confecção de um ninho rudimentar neste período (12). A urina e as fezes dos animais se depositavam no coletor localizado na parte inferior da caixa, e o assoalho de malha metálica era, geralmente, conservado limpo pela genitora.

Grupo controle: genitoras tiveram à sua disposição quantidade suficiente de maravalha para a construção do ninho.

Observações do cuidado materno

O comportamento materno de cada genitora foi observado diariamente em cinco períodos, de 72 minutos cada, do dia 1 ao dia 9 pós-natal, por observadores que receberam treinamento padronizado no grupo de pesquisa para a realização desta tarefa. As observações ocorriam em três períodos durante a fase clara (10:00h, 13:00h, 17:00h) e dois períodos durante a fase escura (07:00h e 20:00h). Em cada período de observação, o comportamento da genitora foi registrado a cada três minutos. Os seguintes comportamentos maternos foram registrados: genitora em contato ou não com seus filhotes, genitora amamentando os filhotes em posição de dorso arqueado ou posição passiva e genitora lambendo (licking and grooming) (LG) qualquer filhote (13). Os escores de cada comportamento foram calculados dividindo a frequência do comportamento pelo número total de observações. O escore do contato puro foi calculado a partir do escore do contato total, subtraindo desse valor o contato no momento da amamentação e o contato no momento da lambida, sendo considerado um contato de baixa qualidade (ou contato sem cuidado).

TESTES COMPORTAMENTAIS

Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado colocando os

animais, por 5 minutos, em uma arena circular, medindo 78 cm de diâmetro, com assoalho dividido em 25 quadrantes, cercada por paredes de acrílico de 36 cm, em dois dias consecutivos (treino e teste - realizados das 9:00h às 13:00h). As filmagens foram, posteriormente, avaliadas com a utilização do software livre OpenFLD v1.0 (disponível em <http://blog.sbnec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>). Os seguintes componentes comportamentais foram analisados: locomoção (número de linhas cruzadas); respostas de orientação (rearing), considerada uma medida de exploração ambiental; e tempo de permanência nos quadrantes centrais, que reflete menor ansiedade (14).

Teste do labirinto em cruz elevado

Todos os animais foram transferidos para a sala observacional, iluminada com luz vermelha, 30 minutos antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Entre 10:00h e 13:00h, machos e fêmeas em diestro (15, 16) foram colocados individualmente por 5 minutos no aparato de madeira, elevado 64 cm do chão, possuindo dois braços opostos abertos (50 x 10 cm) com borda de 0,5 cm de altura, dois braços opostos fechados sem cobertura (50 x 10 x 40 cm), e um quadrado central aberto (10 x 10 cm). Posteriormente, um observador cego para a intervenção neonatal avaliou as filmagens, utilizando o software livre PlusMZ v1.0 (ver disponibilidade acima). Os seguintes componentes foram analisados: o número de entradas/tempo de permanência nos braços abertos e fechados e o número de mergulhos nos braços abertos (16).

Dissecção do cérebro e determinação do óxido nítrico (NO)

Um dia depois do último teste comportamental, os animais foram decapitados, após jejum de 4 horas, com aproximadamente 120 dias de vida. Após a decapitação, o cérebro foi rapidamente removido e congelado, através de imersão no isopentano, e armazenado a -80°C. Posteriormente, os cérebros foram descongelados até -20°C e foram realizados cortes para a retirada de punches do hipocampo com o auxílio de um atlas da estrutura cerebral do rato (17).

Para analisar a produção de NO no hipocampo, o tecido foi homogeneizado (1:10) com tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,4), contendo 1mM de EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação protéica por BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) e para determinar a produção de NO através da mensuração dos metabólitos nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂) (18). De forma simplificada, 85 µL de cloreto de vanádio foi misturado a 85 µL do sobrenadante para redução completa do nitrato a nitrito. Depois, 85 µL do reagente de Griess (contendo N-1-naftiletilenodiamino

e sulfonamida) foram adicionados e incubou-se em banho-maria por 1h a 37°C em uma sala escura. O resultado do pigmento rosa foi determinado por espectrofotometria a 540nm. A curva padrão foi feita utilizando nitrato de sódio e cada ponto da curva passou pelos mesmos passos realizados com o sobrenadante. Os resultados foram calculados como nmol de nitratos e nitritos (resultantes da degradação do NO) por mg de proteína. As determinações de NO foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia do Estresse do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados foram digitados e analisados no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Para comparar os grupos experimentais com relação a uma variável quantitativa foram realizados os seguintes testes: ANOVA de uma via, utilizando como fator o grupo e como co-variável o tamanho da ninhada (cuidado materno); ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo (teste do labirinto em cruz elevado, teste do campo aberto e quantidade de NO). Para comparar os grupos experimentais com relação a uma variável qualitativa foi utilizado o teste do Qui-Quadrado (comportamento de Grooming). Para correlação entre o cuidado materno e as variáveis do teste do labirinto em cruz elevado utilizou-se a correlação de Pearson. O tamanho da amostra variou conforme o experimento, sendo apresentado individualmente na seção Resultados. Em

todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Tempo de contato de baixa qualidade no período neonatal se correlaciona com níveis comportamentais de ansiedade na vida adulta

O teste do labirinto em cruz elevado revelou um maior comportamento do tipo ansioso no grupo intervenção. As análises mostraram interação entre o grupo e o sexo no tempo de permanência nos braços abertos (machos controle $116,1 \pm 39,08$ s; machos intervenção $74,5 \pm 30,93$ s; fêmeas controle $89,5 \pm 41,73$ s; fêmeas intervenção $92,4 \pm 26,59$ s; ANOVA de duas vias; $F(1,57)=5,75$; $p=0,02$), indicando que os machos intervenção permaneceram menos tempo nos braços abertos. Também se observou efeito do grupo ao avaliar a frequência de mergulhos (machos controle $14,2 \pm 4,79$; machos intervenção $10,9 \pm 3,45$; fêmeas controle $12,0 \pm 4,20$; fêmeas intervenção $9,3 \pm 3,84$; ANOVA de duas vias; $F(1,57)=7,94$; $p=0,007$), mostrando que o grupo intervenção realizou menos mergulhos (menor exploração) nos braços abertos.

O contato puro ou de baixa qualidade foi maior no grupo intervenção (controle $5,66 \pm 2,38$; intervenção $7,43 \pm 2,85$; ANOVA de uma via, $F(1,14)=5,30$; $p=0,037$) e correlacionou-se negativamente com o tempo no braço aberto ($r=-0,4$; $p=0,03$) e a frequência de mergulhos ($r=-0,4$; $p=0,03$) somente nos machos. O LG correlacionou-se com a frequência de mergulhos tanto nos machos ($r=0,5$; $p<0,001$) quanto nas fêmeas ($r=0,5$; $p<0,001$) (figura 1).

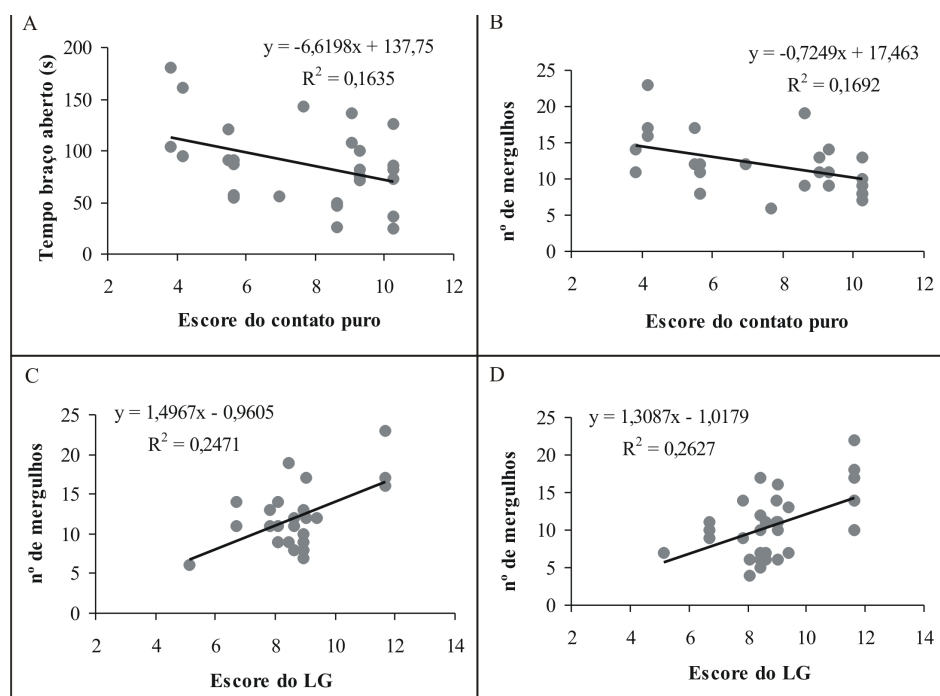


Figura 1 - Correlações entre o cuidado materno e o comportamento do tipo ansioso na vida adulta em (A, B e C) machos e (D) fêmeas.

Teste do campo aberto

Ao analisar as variáveis do segundo dia do campo aberto (dia do teste), não se observou efeito do grupo nem interações, apenas efeito do sexo no tempo de permanência na região central [$F(1,55)=9,27$, $p=0,004$] e na frequência de respostas de orientação [$F(1,55)=7,30$, $p=0,009$], indicando que os machos permaneceram menos tempo no centro do aparato e também realizaram menos respostas de orientação (menos exploração) (tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis analisadas no teste do campo aberto, conforme sexo e grupo.

Variável	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=8)	Intervenção (n=19)	Controle (n=18)	Intervenção (n=14)
tempC	22,9 19,25 ^a	24,3 13,96 ^a	34,3 20,04 ^b	41,9 16,30 ^b
tempP	277,1 19,25 ^a	275,7 13,95 ^a	265,8 20,03 ^b	258,1 16,31 ^b
freqCruz	132,75 38,07	139,4 30,17	146,4 28,84	158,1 24,38
freqRear	8,0 5,58 ^a	7,5 4,22 ^a	13,8 7,02 ^b	11,4 8,61 ^b
FezGroom*	4 (50%)	5 (26,3%)	4 (22,2%)	4 (21,4%)

ANOVA de duas vias; valores expressos em média $\pm$ DP; a, b, letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ($p<0,05$).

*Teste do Qui-Quadrado ($p>0,05$). tempC: tempo de permanência na região central (s); tempP: tempo de permanência na periferia (s); freqCruz: número total de cruzamentos; freqRear: número de rearings; FezGroom: realizaram grooming durante o teste.

Óxido nítrico (NO)

Ao analisar a quantidade de óxido nítrico no hipocampo, não se encontrou efeito do grupo [$F(1,21)=0,0001$, $p=0,992$], nem efeito do sexo [$F(1,21)=0,89$, $p=0,335$]. Também não foi observada interação entre as variáveis [$F(1,21)=0,07$, $p=0,787$] (Figura 2).

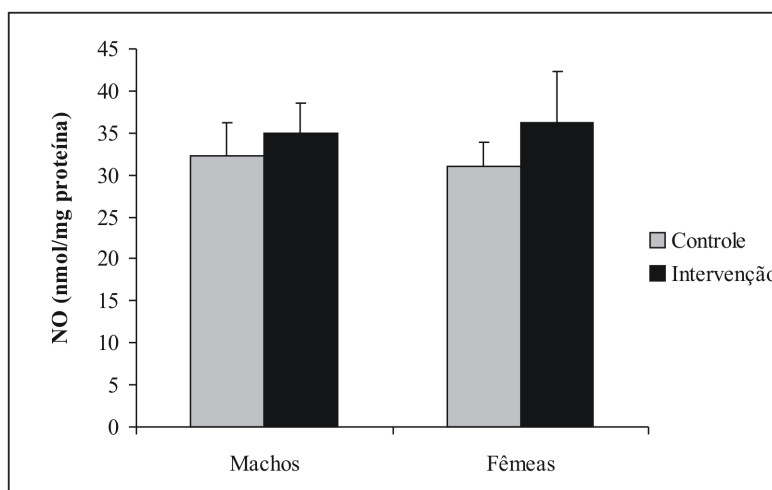


Figura 2 - Quantidade de NO no hipocampo nos machos controle (n=5), machos intervenção (n=6), fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=6). Dados expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias não mostrou efeitos, nem interação.

DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a redução do material disponível para a confecção do ninho, do dia 2 ao dia 9 de vida dos filhotes, impactou sobre o cuidado materno e esteve associada ao desenvolvimento de ansiedade na vida adulta. No entanto, a nNOS hipocampal não parece ser um mecanismo em potencial envolvido no comportamento do tipo ansioso observado neste modelo animal.

A restrição do material para a confecção do ninho aumentou o tempo em que as genitoras do grupo intervenção permaneceram em contato com seus filhotes. Entretanto, uma análise profunda do cuidado materno revelou que esse aumento do tempo de contato aconteceu porque as genitoras-intervenção ficaram mais tempo com seus filhotes sem realizar nenhum outro cuidado (alimentar ou lambendo). Esse comportamento materno peculiar observado, intitulado contato puro, pode ser caracterizado como um cuidado de baixa qualidade, visto que as genitoras estavam com seus filhotes, mas não os estavam amamentando e/ou lambendo. De acordo com a literatura (19-21), observou-se que os comportamentos maternos exibidos pela genitora no período neonatal estiveram relacionados ao desenvolvimento de ansiedade na vida adulta dos animais. Destaca-se que, conforme demonstrado pelas correlações, o comportamento materno impactou em machos e fêmeas de forma diferente. Nos machos tanto o contato puro quanto o LG mostraram-se importantes para determinar o perfil comportamental de expressão de ansiedade (menos tempo nos braços abertos e menos mergulhos). Por outro lado, nas fêmeas, que demonstraram um comportamento do tipo ansioso diferente (apenas menos mergulhos), somente o LG correlacionou-se a esse tipo de comportamento ansioso. Portanto, em ambos os sexos o comportamento materno esteve associado a um maior comportamento do tipo ansioso, porém o perfil comportamental de expressão de ansiedade foi diferenciado, o que concorda com as diferenças observadas em homens e mulheres com relação à prevalência, comorbidades e curso dos transtornos de ansiedade (9,10).

Utilizaram-se também outras medidas de ansiedade, mensuradas através do teste do campo aberto. No entanto, não foi encontrada diferença entre os grupos, apenas um efeito do sexo no qual os machos permaneceram mais tempo na periferia e apresentaram menos respostas de orientação quando comparados às fêmeas. Segundo Martinez-Pereda et al. (11), machos apresentam uma maior reatividade emocional do que fêmeas quando testados no campo aberto. Apesar de não ter sido encontrada diferença entre os grupos no teste do campo aberto, essa falta de diferença comprova que os animais não eram incapazes ou mais lentos para se locomoverem, visto que este teste também avalia a locomoção ou nível de atividade dos animais (22,23). De forma interessante, este achado reforça

que, no labirinto em cruz elevado, os animais ficaram mais tempo nos braços fechados devido ao medo (ansiedade) de se expor a um ambiente aberto e não por dificuldades de locomoção.

Na tentativa de elucidar um possível mecanismo envolvido com o maior comportamento do tipo ansioso encontrado no presente estudo, investigou-se o papel da nNOS no hipocampo dos animais, através da mensuração dos produtos da degradação do NO (nitratos e nitritos), cuja produção depende da atividade dessa enzima. Como não foram encontradas diferenças entre os grupos com relação à produção de NO, acredita-se que a quantidade/atividade da enzima foi semelhante entre os grupos. Ao contrário, a literatura mostra que a inibição da nNOS tem efeito ansiolítico em camundongos machos alojados em grupos (5,24), e também que camundongos knock-out para nNOS apresentam uma latência menor para se alimentar em um teste de novidade alimentar, sugerindo um fenótipo menos ansioso (6). Porém esses estudos que mostram associação da nNOS com o comportamento do tipo ansioso não testaram esse mecanismo em modelos de intervenções neonatais. Sendo assim, os resultados encontrados indicam que uma maior atividade da nNOS não parece ser um mecanismo em potencial envolvido no comportamento do tipo ansioso observado em animais submetidos a um ambiente neonatal adverso que afeta o cuidado materno. Entretanto, ressalta-se que este achado baseou-se na mensuração de um dos produtos da nNOS e não na quantificação e/ou expressão gênica da enzima, sendo esta uma limitação deste estudo.

Concluindo, revelou-se que a relação mãe-filhote, alterada por um ambiente neonatal adverso, teve impacto persistente sobre o comportamento do tipo ansioso de forma sexo específica, ressaltando como ponto positivo as correlações moderadas observadas. Apesar deste achado, não se conseguiu comprovar, através da mensuração do NO, uma possível relação entre o nNOS hipocampal e o desenvolvimento de ansiedade na vida adulta neste modelo animal, sendo necessário investigar outros potenciais mecanismos envolvidos no desenvolvimento de ansiedade em modelos animais envolvendo intervenções neonatais.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado por: PRONEX 2009, FAPERGS/CNPq 10/0018.3, Projeto IVAPSA – Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Adulto; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – 14/2009; Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – (R. Dalle Molle, bolsa de mestrado).

REFERÊNCIAS

1. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(1):13-25.
2. Gross C, Santarelli L, Brunner D, Zhuang X, Hen R. Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biol Psychiatry*. 2000;48(12):1157-63.
3. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):1277-81.
4. Miguel TT, Nunes-de-Souza RL. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Res*. 2008;1240:39-46.
5. Workman JL, Trainor BC, Finy MS, Nelson RJ. Inhibition of neuronal nitric oxide reduces anxiety-like responses to pair housing. *Behav Brain Res*. 2008;187(1):109-15.
6. Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci*. United States 2010. p. 2433-41.
7. Manfro GG, Otto MW, McARDLE ET, Worthington JJ, 3rd, Rosenbaum JF, Pollack MH. Relationship of antecedent stressful life events to childhood and family history of anxiety and the course of panic disorder. *J Affect Disord*. 1996;41(2):135-9.
8. Horesh N, Amir M, Kedem P, Goldberger Y, Kotler M. Life events in childhood, adolescence and adulthood and the relationship to panic disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 1997;96(5):373-8. Epub 1997/12/12.
9. Vesga-Lopez O, Schneier FR, Wang S, Heimberg RG, Liu SM, Hasin DS, et al. Gender differences in generalized anxiety disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *J Clin Psychiatry*. 2008;69(10):1606-16. Epub 2009/02/05.
10. McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res*. 2011;45(8):1027-35.
11. Martinez-Pereda JA, Castander FJ, Labrador P, Cardenas R. [Analysis of sexual differences in emotional reactions in rats]. *Rev Esp Fisiol*. 1989;45(3):239-43. Epub 1989/09/01. Analisis de las diferencias sexuales sobre la reactividad emocional en la rata.
12. Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*. 2008;154(3):1132-42.
13. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*. 2003;79(3):359-71.
14. Lima DC, Vale TG, Arganaraz GA, Varella PP, Frussa-Filho R, Cavaleiro EA, et al. Behavioral evaluation of adult rats exposed in utero to maternal epileptic seizures. *Epilepsy Behav*. United States: 2010 Elsevier Inc; 2010. p. 45-9.
15. Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*. 2001;74(4-5):435-40.
16. Severino GS, Fossati IA, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav*. 2004;81(3):489-98.
17. Swanson L. Brain maps: Structure of the rat brain. 2a edição ed: Elsevier; 1998.
18. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71.
19. Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry*. 2002;159(8):1265-83. Epub 2002/08/03.
20. Cirulli F, Berry A, Alleve E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1-2):73-82.
21. Macri S, Chiarotti F, Wurbel H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res*. Netherlands 2008. p. 227-34.
22. Jacobson-Pick S, Richter-Levin G. Differential impact of juvenile stress and corticosterone in juvenility and in adulthood, in male and female rats. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):268-76. Epub 2010/06/22.
23. Hrubá L, Schutova B, Slamberova R. Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following prenatal and postnatal methamphetamine exposure in adult rats. *Physiol Behav*. 2012;105(2):364-70. Epub 2011/09/03.
24. Pokk P, Vali M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002;26(2):241-7.

Recebido: 13/02/2012

Aceito: 10/03/2012