

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PARTICIPAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSO-LATERAL NA MODULAÇÃO DO EFEITO ANSIOGÊNICO DO
PENTILENOTETRAZOL EM RATOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Cláudia Anzini

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis, SC

2005

*“Nunca é tarde para procurar um Mundo mais novo.
Minha meta é navegar além do pôr do sol.
O que somos, somos, uma boa índole e corações heróicos.
Fortes na vontade de lutar, procurar, achar... e não ceder.”
(Autor desconhecido)*

*Aos meus pais, Isabel e Eugênio,
minha eterna gratidão por todo amor, carinho,
companheirismo, preocupação e incentivo
dedicados a mim em todos os momentos!
Ao meu irmão, Rodrigo, obrigada pela amizade!*

*Ao meu noivo, Adilson,
por estar sempre ao meu lado trazendo-me alegrias,
muito obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pelo incentivo constante ao ensino e a pesquisa durante esses anos de orientação e convívio, pela amizade e por ter acreditado no meu potencial.

Aos professores membros da banca examinadora Francisco S. Guimarães e Gina S. Morato, como titulares, e Thereza C.M. de Lima Nogueira, como suplente, pela contribuição para a minha formação científica.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pelo apoio e contribuição à minha formação científica.

Aos funcionários e amigos da Coodenadoria Especial de Farmacologia.

Aos colegas da turma de mestrado Elisângela, Fabrício, Geison, Giselle, Marcelo, Rafael, pela amizade e, em especial, à Mary (Maria Alcina), pela amizade, companheirismo e pelo apoio em todas as horas.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Comportamental Karina, Patrícia, Nelson, Zuleide, Letícia, Isabella, Danielle, Luciane, Cladis, Grazielle, Rimenez e Juliana, pela colaboração e amizade... Em especial, Leandro, Fabrício e Cilene, que além da amizade contribuíram diretamente com esta dissertação lendo e fazendo comentários para o aprimoramento do texto.

À minha amiga Nara, que pelos últimos dois anos foi a minha família aqui em Floripa, pela convivência, amizade e companheirismo.

A toda minha família e amigos, pela torcida.

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES -----	iii
LISTA DE FIGURAS -----	v
RESUMO -----	vii
ABSTRACT -----	ix
1. INTRODUÇÃO -----	1
1.1. SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL -----	2
1.2. ASPECTOS FUNCIONAIS DA SCP E COMPORTAMENTO	
DEFENSIVO -----	5
1.3. PARTICIPAÇÃO DOS AAE NO COMPORTAMENTO	
DEFENSIVO -----	8
1.4. PARTICIPAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS INIBITÓRIOS NO	
COMPORTAMENTO DEFENSIVO -----	14
1.5. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E COMPORTAMENTO	18
DEFENSIVO -----	
2. OBJETIVOS -----	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	23
3.1. ANIMAIS -----	23
3.2. DROGAS E SOLUÇÕES -----	23
3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA -----	24
3.4. CÂNULAS -----	25
3.5. MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL -----	26
3.6. TESTE COMPORTAMENTAL -----	27
3.7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL -----	27
3.8. ANÁLISE COMPORTAMENTAL -----	29
3.9. PERFUSÃO E HISTOLOGIA -----	30
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	31
4. RESULTADOS -----	33
4.1. ETAPA I. EFEITOS DA INATIVAÇÃO TEMPORÁRIA E	
REVERSÍVEL COM LIDOCAÍNA MICROINJETADA NA	
SCPd1 SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS TRATADOS	
COM PTZ SUBMETIDOS AO LCE -----	33
4.2. ETAPA II. EFEITOS DO MUSCIMOL MICROINJETADO NA	
SCPd1 SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS	
PREVIAMENTE TRATADOS COM PTZ SUBMETIDOS AO LCE	39
4.3. ETAPA III. EFEITOS DO BLOQUEIO DO RECEPTOR	
NMDA DA SCPd1 COM MICROINJEÇÃO DE AP5 SOBRE O	
COMPORTAMENTO DE RATOS PREVIAMENTE TRATADOS	
COM PTZ SUBMETIDOS AO LCE -----	47
5. DISCUSSÃO -----	55
6. CONCLUSÕES -----	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	68

LISTA DE ABREVIações

AAE	Aminoácidos excitatórios
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico
ANOVA	Análise de variância
AP5	Ácido \pm -2-amino-5-fosfonopentanóico
AP7	Ácido \pm -2-amino-7-fosfonoheptanóico
Ca ⁺⁺	Íons cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cl ⁻	Íons cloreto
CS	Colículo superior
DL	Dorso-lateral
DM	Dorso-medial
EBF	Entradas nos braços fechados
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilase
GLU	Glutamato
GLI	Glicina
H	Hora
iGLU	Receptor ionotrópico do GLU
IP	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
L	Lateral
LCE	Labirinto em cruz elevado
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
Mg ⁺⁺	Íons magnésio
MgCl	Cloreto de magnésio
mGLU	Receptor metabotrópico do GLU
Min	Minutos
MUS	Muscimol
Na ⁺	Íons sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaHPO ₄	Fosfato de sódio

NMDA	N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
%EBA	Porcentagem de entradas nos braços abertos
%TBA	Porcentagem de tempo nos braços abertos
PTZ	Pentilenotetrazol
S	Segundos
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SCPd	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCPdl	Substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral
SNC	Sistema nervoso central
V	Ventral
VL	Ventro-lateral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema ilustrando a localização e a organização das subdivisões da SCP ao longo do seu eixo rostro-caudal.	4
Figura 2.	Esquema ilustrativo das subunidades do receptor NMDA e seus diversos sítios de ligação.	10
Figura 3.	Esquema ilustrativo do receptor GABA _A e seus sítios de ligações para diferentes compostos.	16
Figura 4.	Diagrama de cortes mesencefálicos coronais de cérebro de rato mostrando os sítios das microinjeções na SCPdl.	31
Figura 5.	Efeitos da administração intra-SCPdl de lidocaína sobre a atividade nos braços abertos do LCE em ratos pré-tratados com PTZ.	34
Figura 6.	Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a inativação da SCPdl com lidocaína em ratos pré-tratados com salina ou PTZ submetidos ao LCE.	36
Tabela I.	Perfil comportamental de ratos pré-tratados com PTZ IP, que receberam lidocaína na SCPdl ou no CS.	37
Figura 7.	Efeitos da microinjeção de lidocaína na SCPdl de ratos previamente tratados com PTZ IP submetidos ao LCE no número de EBF e avaliação de risco.	38
Figura 8.	Efeitos sobre a atividade nos braços abertos após inativação da SCPdl com muscimol em ratos previamente tratados com PTZ IP submetidos ao teste no LCE.	40
Figura 9.	Efeitos sobre a atividade locomotora após inativação da SCPdl com muscimol em ratos pré-tratados com PTZ IP submetidos ao teste no LCE.	42
Figura 10.	Perfil minuto-a-minuto da %TBA de ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE após inativação da SCPdl com muscimol em ratos pré-tratados com PTZ IP.	44
Tabela II.	Efeitos da administração de muscimol na SCPdl de ratos previamente tratados com PTZ 30 mg/kg sobre os diferentes parâmetros analisados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	46
Figura 11.	Efeitos do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdl com AP5 em ratos previamente tratados com PTZ IP sobre a atividade nos braços abertos de ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	48
Figura 12.	Efeitos do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdl com AP5 em ratos previamente tratados com PTZ IP sobre a atividade locomotora e exploratória de ratos submetidos ao teste no LCE.	50
Figura 13.	Perfil minuto-a-minuto após o bloqueio dos receptores NMDA da SCPdl com AP5 em ratos previamente tratados com PTZ IP sobre a %TBA de ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	52
Tabela III.	Efeitos da administração de AP5 na SCPdl de ratos previamente tratados com PTZ 30 mg/kg sobre os diferentes parâmetros analisados em ratos submetidos ao teste e ao re-teste no LCE.	54

RESUMO

A redução da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) observada em ratos pré-tratados com PTZ é interpretada como um efeito tipo-ansiolítico. Um perfil semelhante de comportamento é observado em ratos submetidos ao LCE após a estimulação química com glutamato da SCPdl. Baseado nesses fatos, o objetivo do presente trabalho foi investigar se a SCPdl participaria da modulação do efeito tipo-ansiolítico do PTZ. Ratos Wistar machos, previamente implantados com cânulas dirigidas à SCPdl, foram submetidos ao LCE 30 min após a injeção intraperitoneal de PTZ 30 mg/kg ou salina e 10 min após a microinjeção na SCPdl de um anestésico local [lidocaína (LIDO; 40 nmol)], de um antagonista do receptor NMDA [AP5 (3,0 ou 6,0 nmol)], de um agonista GABAérgico [muscimol (MUS; 0,25 ou 0,50 nmol)] ou de líquor. A análise estatística confirmou o efeito tipo ansiolítico no grupo PTZ/líquor, com redução na porcentagem de entradas (%EA; de 39 ± 4 para 15 ± 4) e no tempo de permanência (%TA; de 15 ± 2 para 5 ± 1) nos braços abertos. Essa redução da exploração dos braços abertos não foi observada no grupo PTZ/LIDO (%EA: 27 ± 6 ; %TA: 15 ± 4), PTZ/AP5 3,0 nmol (%EA: 36 ± 8 ; %TA: 15 ± 4), PTZ/AP5 6,0 nmol (%EA: 40 ± 7 ; %TA: 18 ± 4), PTZ/MUS 0,25 nmol (%EA: 56 ± 4 ; %TA: 39 ± 7) e PTZ/MUS 0,50 nmol (%EA: 42 ± 8 ; %TA: 26 ± 7). Esses resultados sugerem que uma atividade neural aumentada na SCPdl poderia mediar o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo PTZ administrado sistemicamente em ratos submetidos ao LCE. Esses resultados sugerem também um

~~papel importante da SCD na organização da resposta animal~~

para um medo aumentado, como o produzido pelo PTZ.

ABSTRACT

Systemic administration of pentylentetrazole (PTZ) elicits anxiogenic-like responses in rats submitted to the elevated plus-maze (EPM) task. The involvement of the dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) with fear and anxiety prompted us to investigate whether this PTZ anxiogenic action could be affected by pharmacological inactivation of this brain region. Male Wistar rats were implanted with a guide cannula within dlPAG, and submitted to the EPM 30 min after receiving a systemic injection of PTZ (30 mg/kg) or saline (SAL), and 10 min after receiving an intra-dlPAG injection (0.3 μ l) of artificial cerebral spinal fluid (CSF), lidocaine (LIDO; 40 nmol), a drug which produces a reversible functional deactivation, (\pm)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5; 3.0 and 6.0 nmol) or muscimol (MUS; 0.25 and 0.5 nmol), a NMDA receptor antagonist and a GABA-A receptor agonist, respectively. According to the results, the PTZ/CSF group decreased open arms activity relative to controls. This anxiogenic-like response to PTZ was counteracted by the intra-dlPAG administration of LIDO, AP5 or MUS. These results were observed in the absence of changes in enclosed arms entries, and EPM general exploratory index. The present findings suggest that an enhancement of the dlPAG neural activity, by an enhanced excitatory amino acid and/or by a decreased GABA-A activity, may underlie the anxiogenic-like effect of PTZ, and strengthen the dlPAG role in the organization of the animal

response to an increased fear such as those provided by the PTZ, and by other stimuli as well.

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista histórico, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade se inicia nos relatos de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem. Seus trabalhos, na segunda metade do século XIX, indicavam que o estudo de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem (para revisão ver Brandão *et al.*, 2003).

Somente no início do século XX, na década de 30, o advento da estereotaxia associado à metodologia de estimulação elétrica, permitiram o estudo mais detalhado de estruturas cerebrais, dentre elas a substância cinzenta periaquedutal (SCP).

Na década de 40, Hess e Brugger (1943) demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial de gatos era capaz de produzir um comportamento complexo, caracterizado por uma postura imóvel com o dorso levemente arqueado, exposição dos dentes e garras, retração auricular, silvar, rosnar, piloereção e acentuada midríase, denominado de reação afetiva de defesa.

Posteriormente, Hunsperger (1956) e Fernandez de Molina e Hunsperger (1959; 1962) verificaram que as respostas comportamentais observadas em gatos por Hess e Brugger (1943) eram igualmente obtidas quando a estimulação elétrica era aplicada em uma área que se estendia desde a matéria cinzenta da área pré-óptica até a SCP.

1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal

A SCP refere-se à região que circunda o aqueduto cerebral. A porção mais rostral da SCP se localiza próximo à comissura posterior e à porção mais caudal próxima ao núcleo tegmental dorsal (Behbehani, 1995). Devido às conexões recíprocas entre a SCP e o sistema límbico prosencefálico, a SCP foi postulada como pertencente à chamada área límbica mesencefálica (Nauta, 1958).

A partir da década de 70, a citoarquitetura da SCP passou a ser alvo de muito interesse, e estudos anatômicos passaram a sugerir que esta estrutura poderia ser subdividida em regiões distintas. Vários esquemas têm sido propostos para dividir a SCP em subnúcleos baseados nas suas características citoarquitetônicas (Hamilton, 1973; Laemle, 1977; Beitz and Shepard, 1985; Mantyh, 1982, 1982a; Conti *et al.*, 1988). Prichar e Beitz (1980) e Beitz (1985) sugeriram que a SCP poderia ser subdividida em quatro áreas: 1) medial, composta de pequenos neurônios bipolares, que circundam firmemente o aqueduto; 2) ventrolateral, que contém predominantemente neurônios fusiformes e neurônios multipolares grandes, além de neurônios bipolares pequenos, orientados em ângulo de 100 - 150° em relação ao aqueduto; 3) dorso-lateral, composta predominantemente de células triangulares, pequenos neurônios bipolares e multipolares, orientados em ângulo de 30 - 70° em relação ao aqueduto e, 4) dorsal, constituída por pequenos neurônios bipolares e multipolares sem orientação preferencial.

Na década de 90, Carrive e Bandler (1991), Bandler e colaboradores (1991, 1991a) e Carrive (1993) propuseram uma nova organização para a SCP, baseada na citoarquitetura funcional, utilizando-se de respostas neurovegetativas e comportamentais evocadas pela administração local de aminoácidos excitatórios (AAE). Segundo esses autores, a SCP poderia ser subdividida de forma radial em cinco regiões distintas: dorso-medial, dorso-lateral, lateral, ventro-lateral e ventral, cada uma delas formando uma coluna ao longo do seu eixo rostro-caudal (Figura 1). Atualmente se destacam apenas as primeiras 4 regiões. Estas parecem possuir algumas características distintas entre si, principalmente no que diz respeito à imunorreatividade celular, densidade de receptores, conexões aferentes e eferentes e função (para revisão ver Bandler *et al.*, 1991a; Vianna e Brandão, 2003). Tal subdivisão mostrou não somente a importância de se levar em consideração todas as dimensões (dorso-ventral, medio-lateral e rostro-caudal) da SCP, como também suscitou a necessidade de caracterização da área na SCP estudada nos diferentes laboratórios (Bandler *et al.*, 1985; Beart *et al.*, 1988; Bandler e Depaulis, 1991; Rizvi *et al.*, 1991, 1992; Bandler e Shipley, 1994; Bandler e Keay, 1996; Chen e Aston-Jones, 1996; Valverde-Navarro *et al.*, 1996; Lonstein e Stern, 1997; Walker *et al.*, 1997; Fendt, 1998; De Oca *et al.*, 1998; Vander-Horst *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Adamec, 2001; Omori *et al.*, 2001; Molchanov e Guimarães, 2002).

Atualmente, essa é a subdivisão mais aceita, pois baseia-se em estudos que sugerem que a SCP não é uma estrutura cerebral funcionalmente homogênea.

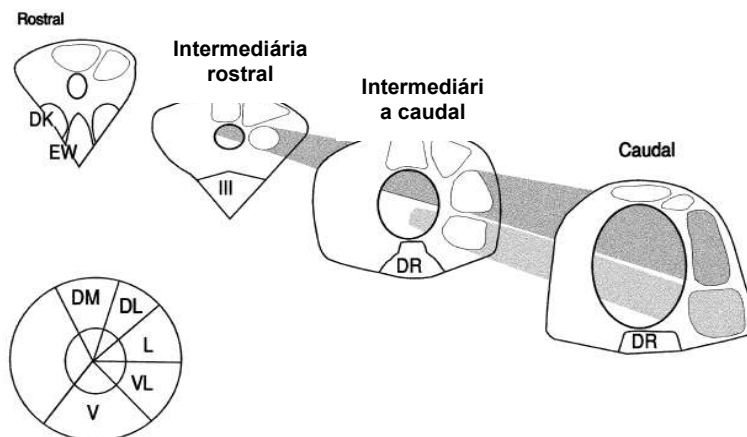


Fig. 1. Drawings illustrating the location and organisation of the PAG subdivisions along its rostrocaudal extent (after Ref. 2).

Figura 1. Esquema ilustrando a localização e a organização das subdivisões da SCP ao longo do seu eixo rostro-caudal (DM=dorsomedial; DL=dorsolateral; L=lateral; VL=ventrolateral; V=ventral). Adaptado de Bandler e Depaulis, 1991.

Nosso laboratório tem trabalhado desde 1983 (Carobrez et al., 1983) com a porção dorsal da SCP (SCPd), que compreende as colunas dorso-medial e dorso-lateral (SCPdl) descritas por Bandler e colaboradores (Bandler et al., 1991, 1991a).

A SCPd parece possuir um conjunto de aferentes e eferentes bastante especial, possuindo conexões recíprocas com estruturas cerebrais anteriores relacionadas com reações de estados emocionais tais como córtex límbico, amígdala e hipotálamo

(Krieger et al., 1979; Beitz, 1982; Meller e Dennis, 1986; Beart et al., 1988; Graeff, 1990; Rizvi et al., 1991, 1992; Canteras e Swanson, 1992; Cameron et al., 1995), sugerindo sua

importância na regulação de estados emocionais, como a ansiedade (Carrive, 1993)

, e com áreas do tronco cerebral tais como ponte, bulbo, cerebelo (Beitz, 1982; Holstege, 1991; Redgrave e Dean, 1991). Além disso, a SCPd possui conexões intrínsecas com outras subdivisões da SCP (Sandkuhler e Herdegen, 1995; Jansen et al., 1998).

Essa interconectividade diversa mantém a SCPd em conexão com diferentes estruturas relacionadas ao sistema motor, sensorial, límbico e autonômico (Beitz, 1982) e é o que provavelmente possibilita a participação desta porção da SCP na mediação do comportamento defensivo.

1.2. Aspectos funcionais da SCP e Comportamento Defensivo

Importantes estudos, durante os últimos anos, têm associado a SCP a cinco funções principais: 1) controle autonômico, 2) lordose reflexa, 3) vocalização, 4) modulação da dor e 5) emoções relacionadas ao medo e ansiedade (para revisão ver Behbehani, 1995). Recentemente, estudos com ratos demonstraram o envolvimento da SCP no comportamento maternal (Miranda-Paiva et al., 2003) e predatório (Comoli et al., 2003).

Desde a década de 60, o entendimento das funções da SCP é alvo de muito interesse. Um dos desencadeadores desse evento foi o relato de Reynolds (1969) de que a estimulação da SCP produzia uma analgesia tão profunda em ratos que uma laparotomia poderia se realizada sem o uso de anestésicos químicos.

Outro trabalho fundamental no entendimento da importância funcional da SCP foi realizado por Nashold e colaboradores (1969), que relataram que a estimulação da SCP em humanos produzia fortes reações emocionais, descritas como sensações de medo e morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas: piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço.

Os comportamentos defensivos parecem ser as reações mais coordenadas e constantes em todos os animais vertebrados, o que é a principal garantia da preservação das espécies (Endler, 1986). Vários investigadores relatam que o tipo de oponente, seu tamanho e proximidade, a existência ou não de vias de fuga determinam as tendências naturais do animal em ameaçar, atacar ou escapar (para revisão ver Bandler, 1988; Graeff, 1990).

Em 1981, Graeff postulou que a amígdala, o hipotálamo e a SCP seriam os principais componentes de um Sistema Cerebral Aversivo, responsável pela elaboração de manifestações fisiológicas e psicológicas de estados motivacionais negativos (para revisão, ver Graeff, 1990). A estimulação elétrica e química destas regiões induzem padrões de comportamento defensivo espécie-específico e também causam manifestações comportamentais e subjetivas que sugerem que o animal em experimento está submetido a uma experiência aversiva (Graeff, 1993).

Estudos com gatos e ratos indicam que a SCP e o tegmento adjacente próximo ao colículo superior contém elementos

neurais que medeiam a expressão coordenada de reação de defesa, seja provocada por estimulação elétrica ou naturalmente (Adams, 1979). Em adição, muitos estudos mostram que lesões que destroem a SCP eliminam ou atenuam drasticamente as reações desencadeadas por estímulo nociceptivo, tanto por confrontação com outro animal, como por estimulação do hipotálamo ou da amígdala, sugerindo assim que a região central mesencefálica seria uma 'via comum' para a reação defensiva, cuja integridade parece ser essencial para a coordenação da reatividade defensiva do animal (Bandler, 1988; Graeff *et al.*, 1988).

Vários estudos têm demonstrado que diferentes formas das reações emocionais são representadas em diferentes regiões da SCP. A reação de defesa, por exemplo, é melhor visualizada em níveis mais caudais da SCP (Bandler *et al.*, 1985). A estimulação química de sítios laterais, próximos ao aqueduto, evoca forte reação de defesa em gatos conscientes ou decerebrados (Carrive *et al.*, 1986), ao passo que os estímulos químicos aplicados em sítios ventrolaterais induzem comportamento caracterizado por uma diminuição da atividade espontânea e completa imobilidade (Zhang *et al.*, 1990). Alterações autonômicas também podem ser observadas nestas regiões. A estimulação química da coluna lateral da SCP intermediária evoca aumento da atividade autonômica simpática e da atividade somatomotora associada a formas específicas de comportamento defensivo. Em contrapartida, este tipo de estimulação na coluna ventrolateral desencadeia efeitos

opostos aos visualizados na coluna lateral (Bandler *et al.*, 1991).

Outro estudo a respeito do papel da SCPd na reação de defesa foi realizado em ratos por Bandler e Depaulis (1991), onde foi verificado que o comportamento defensivo obtido através de estimulação química ao longo do eixo anteroposterior da SCP pode apresentar características distintas, que variam desde recuo defensivo (porção rostral) até esquiva ofensiva (porção caudal).

Em resumo, esses estudos indicam que partes da SCP contêm elementos neurais responsáveis pela expressão coordenada da reação de defesa espontânea ou induzida artificialmente através da estimulação elétrica ou química (Carobrez, 2003).

1.3 Participação dos AAE no Comportamento Defensivo

Curtis e colaboradores (1959; 1960) foram os primeiros pesquisadores a obter evidências concludentes sobre a poderosa ação excitatória do glutamato (GLU) e do aspartato sobre neurônios. Porém, somente a partir da década de 70, o GLU tornou-se amplamente conhecido por ser o principal neurotransmissor excitatório dentro do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados (Meldrum, 2000).

O GLU pode exercer muitos papéis centrais, atuando em diversos receptores específicos para AAE (Collingridge e Lester, 1989). Os receptores do GLU podem ser classificados genericamente como metabotrópicos (mGLU) e ionotrópicos (iGLU) (para revisão, ver Carobrez, 2003). Os receptores mGLU são

acoplados à proteína G e também representam alvos de ação do GLU no SNC (Monaghan *et al.*, 1989)

Enquanto isso, os receptores iGLU foram subsequentemente classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em NMDA (n-metil-d-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) e cainato. Todos esses receptores incorporam canais de íons que são permeáveis à cátions, embora a permeabilidade relativa aos íons Na^+ e aos íons Ca^{2+} varie de acordo com a família e a composição de subunidades do receptor (Meldrum, 2000). Dentre os receptores glutamatérgicos, o subtipo NMDA (Figura 2) tem sido o mais estudado, em virtude da existência de antagonistas altamente seletivos para esse receptor (Leeson, 1993).

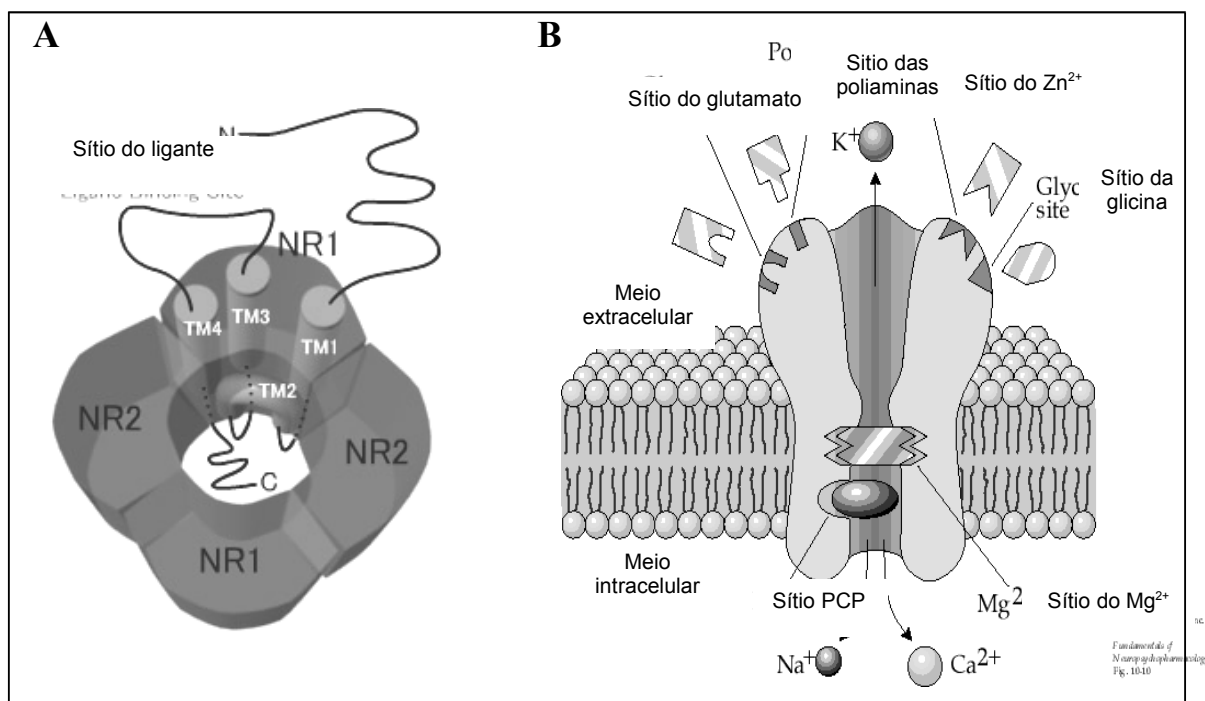


Figura 2. Esquema ilustrativo das subunidades do receptor NMDA (A) seus diversos sítios de ligação (B).

O receptor NMDA é composto pelo agrupamento de quatro ou cinco subunidades (NR_1 , onde se liga a glicina, NR_{2A-D} onde se liga o GLU e NR_{3A-B}), sendo a presença de NR_1 e NR_2 necessária para tornar o receptor funcional (Yamakura e Shimoji, 1999; para revisão ver Carobrez, 2003). A composição de duas subunidades NR_1 e duas NR_2 comporiam os receptores presentes em maior número no SNC (Dingledine *et al.*, 1999) (Figura 2). Nas condições de potenciais de membrana de repouso, os receptores NMDA, que são dependentes de voltagem, estão inativos em decorrência do bloqueio por íons Mg^{2+} , prevenindo assim a corrente de fluxo. No entanto, a despolarização da membrana pós-sináptica pela ativação de outros subtipos de receptores ionotrópicos (por exemplo, os AMPA) removerá o bloqueio ocasionado pelo magnésio, resultando no influxo de cátions monovalentes (principalmente íons Na^+) e divalentes (principalmente íons Ca^{2+}) através do canal presente neste receptor (para revisão, ver Carobrez, 2003).

Outra característica interessante é que esse receptor possui diversos sítios de ligação regulatórios (Figura 2). Além do sítio de ligação para o GLU, há um sítio de reconhecimento para o magnésio, um para o zinco, um para as poliaminas e outro sítio que reconhece concentrações submolares de glicina (GLI; Leeson e Iversen, 1994). A GLI é

um neurotransmissor com papel duplo no SNC, exercendo efeitos inibitórios em receptores sensíveis à estricnina (receptor GLI_A), presentes principalmente na medula (Delorey e Olsen, 1989; McGeer e McGeer, 1989) e efeito estimulatório no receptor NMDA, onde atua como "co-agonista" deste complexo-receptor (Kemp e Leeson, 1993; Leeson e Iversen, 1994), sendo insensível à estricnina (Thomson, 1990).

O complexo do receptor NMDA está envolvido em muitos processos funcionais, tais como: memória, aprendizado, desenvolvimento neuronal e plasticidade sináptica (Morris, 1989; Cotman e Monaghan, 1988; Bliss e Collingridge, 1993; Luján *et al.*, 2005), excitotoxicidade neuronal decorrente de isquemia e hipoglicemia (McCulloch, 1992; Lipton e Rosenberg, 1994; Whetsell, 1996), epilepsia e outros transtornos neurodegenerativos (Meldrum, 1985) dependência e tolerância química (Marek *et al.*, 1991; Rossetti e Carboni, 1995), dor neuropática (Parsons, 2001; Aley e Levine, 2002) e distúrbios afetivos como depressão e ansiedade (Graeff *et al.*, 1988; Graeff, 1991; Matheus *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1995; para revisão ver, Bergink *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, estudos comportamentais destacam o envolvimento dos receptores NMDA na mediação das reações defensivas (Teixeira, 2002; Moreira *et al.*, 2004). De maneira complementar, estudos revelaram que os receptores NMDA estão presentes de forma expressiva na coluna dorsolateral em toda a extensão rostrocaudal da SCP (Albin *et al.*, 1990; Beitz, 1995).

Os estudos pioneiros a respeito da relação entre comportamento defensivo e SCPd foram realizados através de estimulação elétrica (Bandler e Depaulis, 1991). Porém, desde que a estimulação elétrica é incapaz de discriminar axônios de passagem de corpos celulares (Ranck Jr, 1975), Goodchild e colaboradores (1982) sugeriram que a técnica de microinjeção de AAE poderia resolver este problema, pois os AAE estimulam apenas os corpos celulares (e seus processos dendríticos).

Krieger e Graeff (1985) demonstraram que microinjeções de GLU induziam repostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de defesa, o mesmo não ocorrendo quando as microinjeções eram feitas em regiões fora da SCPd.

Desde 1985, nosso laboratório investiga o papel dos AAE no comportamento defensivo (para revisão ver Carobrez, 2003). Os resultados iniciais mostraram que a microinjeção de GLU na SCPd era capaz de evocar o comportamento defensivo em ratos, um efeito que poderia ser bloqueado seletivamente por antagonistas dos AAE (Carobrez, 1987; Graeff *et al.*, 1988; Carobrez, 2003).

Nesse sentido, demais estudos revelaram que injeções de antagonistas do receptor NMDA tanto sistêmicas (Wenger, 1980; Brandão *et al.*, 1980; Bennett and Amrick, 1987; Stephens *et al.*, 1986; Trullas *et al.*, 1989; Kehne, *et al.*, 1991; Blanchard *et al.*, 1992; Cobert e Dunn, 1991; 1993; Kotlinska e Liljequist, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2003) quanto intra-SCPd (Dunn *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1990; Guimarães *et al.*, 1991; 1993; Matheus *et al.*, 1994; Teixeira e Carobrez,

1999; Carobrez *et al.*, 2001; Molchanov e Guimarães, 2002) resultaram em um perfil ansiolítico em diversos modelos animais de ansiedade. Pelo contrário, agonistas da subunidade NR₂ (GLU, NMDA) ou NR₁ (glicina, D-serina) do receptor NMDA produziram efeitos ansiogênicos, quando microinjetados na SCPd (Schmitt *et al.*, 1995; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez *et al.*, 2001). Evidências do envolvimento da SCPd no efeito de compostos ansio-seletivos foram obtidas em um estudo onde microinjeções do antagonista competitivo do sítio da glicina na SCPd aboliram os efeitos ansiogênicos do pentilenotetrazol (PTZ), aplicado intra-peritonealmente (IP). Já as microinjeções de glicina na SCPd reduziram os efeitos ansiolíticos do diazepam, uma droga que facilita a transmissão GABAérgica, injetado pela via sistêmica, sugerindo que a atividade excitatória do receptor glutamatérgico do tipo NMDA/GLI_B na SCPd poderia comprometer o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos (De-Souza *et al.*, 1997; Carobrez, 2003).

Em adição, o fato de que o GLU pode induzir a formação de óxido nítrico (NO) merece ser relatado, pois alguns autores sugerem que o NO pode ter um papel em mediar a fisiologia e a neurotoxicidade do GLU (Dawson *et al.*, 1991). Além disso, o NO parece mediar o aumento de 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que ocorre na ativação dos receptores NMDA (Garthwaite e Boulton, 1995).

1.4. Participação dos Amino Ácidos Inibitórios no Comportamento Defensivo

O ácido γ -Aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de vertebrados tanto pelo número de sinapses, como pela importância funcional (Krnjevic, 1974; DeFeudis, 1977; Hösli e Hösli, 1978; Johnston, 1978; Mehta e Ticku, 1999). O GABA atua em três classes diferentes de receptores: GABA_A, GABA_B e GABA_C (Bowery et al., 1980; Hill e Bowery, 1981; Drew et al., 1984; para revisão, ver Chebib e Johnston, 1999).

Os receptores GABA_A são uma família de proteínas hetero-oligoméricas sinápticas e extra-sinápticas capazes de transduzir o sinal inibitório intrínseco do GABA (Barnard et al., 1998; Korpi et al., 2002a,b; Basile et al., 2004). O receptor GABA_A consiste de cinco subunidades (Figura 3) arrançadas ao redor de um poro central (Haefely et al., 1993). Estas subunidades derivam de sete famílias (α , β , γ , δ , ϵ , θ e ρ) codificadas por 16-19 genes diferentes (Rudolph et al., 2001; Korpi et al., 2002a). Grande parte dos receptores GABA_A é composta pelas subunidades α , β e γ (Barnard et al., 1998), sendo a combinação $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ a que prevalece em cérebros de ratos (McKernan e Whiting, 1996). Demonstrou-se ainda que o GABA liga-se a uma subunidade β , enquanto os benzodiazepínicos e drogas relacionadas ligam-se a uma das subunidades α (Doble, 1999). Quando o GABA liga-se no seu sítio de reconhecimento (Figura 3), o complexo do receptor é ativado, causando a abertura do canal de Cl⁻, seguido do influxo do íons Cl⁻ no neurônio. Este influxo de íons Cl⁻ produz uma corrente pós-

sináptica inibitória que hiperpolariza o neurônio pós-sináptico. A diminuição da atividade neuronal seguida da ativação do complexo do receptor GABA_A pode alterar rapidamente a função cerebral (Basile *et al.*, 2004).

Os receptores GABA_B são acoplados a canais de Ca²⁺ ou K⁺, assim como a sistemas de segundos mensageiros (Chebib e Johnston (1999). Enquanto isso, os receptores GABA_C parecem estar simplesmente ligados à canais de cloreto (Enz e Cutting, 1998).

Figura 3. Esquema ilustrativo do receptor GABA_A e seus sítios de ligação para diferentes compostos.

O diagrama mostra o receptor GABA_A com os seguintes sítios de ligação rotulados:

- Sítio da picrotoxina
- Sítio dos esteróides
- Sítio dos benzodiazepínicos
- Sítio dos barbitúricos

Um grande número de interneurônios GABAérgicos é encontrado em estruturas mesolímbicas envolvidas na modulação do comportamento defensivo, tais como hipocampo, septo lateral, amígdala e SCP (Scheel-Krüger e Petersen, 1982; Sanger, 1985; Shepard, 1986, 1987; Cherrubini e Conti, 2001, Mody, 2001; para revisão, ver Millan 2003). Análises imunocitoquímicas de neurônios contendo GABA ou GAD (glutamato descarboxilase) mostraram que esse aminoácido inibitório está presente, de maneira não uniforme, ao longo de todo eixo rostro-caudal (Barbaresi e Manfrini, 1988; Williams e Beitz, 1990, Beitz, 1995) e, em relação ao plano coronal, na coluna dorsolateral da SCP (Reichling e Basbaum, 1990; Beitz, 1995; Lovick e Paul, 1999; Griffiths e Lovick, 2002).

Relatos obtidos a partir de estudos comportamentais, usando modelos animais de aversão, têm fornecido evidências

consistentes para a interação da ação anti-aversiva de benzodiazepínicos com mecanismos GABAérgicos na SCP.

Estudos mostraram que respostas aversivas evocadas pela estimulação da SCPd de ratos são atenuadas após injeções sistêmica ou intra-SCPd de drogas ansiolíticas como benzodiazepínicos e barbitúricos (Schenberg and Graeff, 1978; Schenberg *et al.*, 1981; Brandão *et al.*, 1982; Clarke and File, 1982; Schenberg *et al.*, 1983; Russo *et al.*, 1993). Em adição, efeitos anti-aversivos foram relatados após a microinjeção de agonistas dos receptores GABA_A (ex: prograbide, muscimol), mas não de receptores GABA_B (baclofen), intra-SCPd (Bovier *et al.*, 1982; Audi e Graeff, 1984; Graeff *et al.*, 1986) e intracerebroventricular, respectivamente, sugerindo que a estimulação dos receptores GABA_A, mas não dos GABA_B, participariam da indução do perfil ansiolítico em ratos (Zarrindast *et al.*, 2001).

Pelo contrário, antagonistas GABAérgicos (como a bicuculina e a picrotoxina) aplicados intra-SCPd desencadeavam o aparecimento das mesmas respostas comportamentais que as induzidas por estimulação elétrica, características de reações de defesa (Brandão *et al.*, 1982; Schenberg *et al.*, 1983; Depaulis e Vergner, 1986; Graeff *et al.*, 1986; Bandler, 1988; Graeff, 1990; Shaikh e Siegel, 1990; Brandão *et al.*, 1999). Nesse contexto, a injeção sistêmica de PTZ, um antagonista do sítio da picrotoxina acoplado no receptor GABA_A (Ramamjaneyulu and Ticku, 1984; Squires *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 2001) (Figura 3), tem demonstrado, em doses subconvulsivantes,

propriedades ansiogênicas em humanos (Rodin, 1958; Rodin and Calhoun, 1970;) e numa variedade de modelos animais (Lal and Emmett-Olglesby, 1983; File e Lister, 1984; File e Pellow, 1985; Corda *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002), incluindo o teste do LCE (Pellow *et al.*, 1985; Lopes-da-Silva *et al.*, 1996; De Souza *et al.*, 1997).

De-Souza e colaboradores (1997) demonstraram que o efeito ansiogênico induzido pelo PTZ em ratos submetidos ao LCE foi revertido pela administração de ácido 7-cloroquinurênico, um antagonista do sítio GLI_B , na SCPd. Em adição, estudos realizados por Rocha e colaboradores (1996) demonstraram que uma única injeção intraperitoneal (IP) de PTZ foi capaz de produzir uma diminuição da ligação de benzodiazepínicos na SCPdl.

Esses dados sugerem que a SCPd tem uma importante participação nos efeitos induzidos pela administração sistêmica de PTZ.

1.5. Labirinto em Cruz Elevado e Comportamento Defensivo

Os modelos animais de ansiedade têm sido amplamente utilizados para estudar os comportamentos de defesa, os diferentes sistemas de neurotransmissão e as diferentes estruturas neurais envolvidas nesse comportamento (Griebel, 1995; De-Souza *et al.*, 1997; Walker e Davis, 1997; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Adamec, 2001; Teixeira, 2002; Nelovkov *et al.*, 2003). A maioria deles é baseada na medida de comportamentos exploratórios em ambientes

novos e aversivos (para revisão, ver Rodgers, 1997). O comportamento exploratório é caracterizado como um balanço entre a busca da novidade e o comportamento de esquivia (Nelovkov *et al.*, 2003). Um teste amplamente utilizado para se avaliar medidas de comportamento exploratório é o LCE (Rodgers, 1997).

O LCE originou-se de observações realizadas por Montgomery (1955), no que diz respeito a relação entre medo e comportamento exploratório dos ratos. Esta relação entre medo e curiosidade, que ocorre quando o rato é colocado em ambientes novos, provoca um conflito característico de aproximação-esquivia. O modelo assenta-se no comportamento exploratório espontâneo de roedores em um ambiente com dois níveis de maior (braços abertos) ou menor (braços fechados) aversividade. Esse fato gera inicialmente um conflito aproximação-esquivia aos braços abertos, resultado da tendência exploratória do roedor e do medo/novidade (Carobrez, 2003). Assim, as proporções das atividades (frequência de entradas e tempo) nos braços abertos do LCE são tidas como índices clássicos de ansiedade (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985). Neste contexto, animais tratados com drogas ansiogênicas diminuem significativamente a atividade exploratória dos braços abertos, quando comparados aos animais controle, enquanto o tratamento com drogas ansiolíticas induz efeitos opostos (Pellow *et al.*, 1985).

Uma característica marcante do LCE é que ele é capaz de evocar aversão/medo "per se" (Teixeira, 1999). Os principais

argumentos para essa proposição são: 1) aversão aos braços abertos do labirinto (Pellow *et al.*, 1985); 2) medo aprendido, sem habituação (Treit *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000); 3) aumento da corticosterona plasmática (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers *et al.*, 1999); 4) analgesia bloqueada por ansiolíticos (Lee e Rodgers, 1990). Em adição, estudos imunohistoquímicos evidenciam uma possível relação entre os comportamentos evocados no LCE, comportamentos de medo/defesa e estruturas cerebrais ativadas. Expressão aumentada de Fos na SCP foi detectada após a exposição ao LCE (Silveira *et al.*, 1993), a um predador (Canteras e Goto, 1999), ao odor de um predador (Dielenberg *et al.*, 2001), ao som ultrassônico aversivo (Beckett *et al.*, 1997), durante sobressalto acústico potencializado pelo medo ("startle") (Campeau *et al.*, 1997), e como resultado de injeção sistêmica de drogas ansiogênicas (Singewald e Sharp, 2000).

Nos últimos anos, a análise dos índices clássicos de ansiedade no LCE tem sido uma ferramenta útil na avaliação dos efeitos ansiogênicos e ansiolíticos de muitas drogas (Pellow *et al.*, 1985; Guimarães *et al.*, 1991; File, 1992; Russo *et al.*, 1991; 1993; Handley e MacBlane, 1993; Treit *et al.*, 1993; Guimarães *et al.*, 1994; Rodgers e Cole, 1994; Schmitt *et al.*, 1995; De-Souza *et al.*, 1997; Molchanov e Guimarães, 2002). No entanto, estudos recentes indicam que a sensibilidade do modelo pode ser incrementada adotando-se uma abordagem mais detalhada, que inclua a análise de parâmetros etológicos (posturas defensivas, reações de congelamento, comportamento

de avaliação de risco e esquiva) e/ou análise minuto a minuto (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Lamprea *et al.*, 2000; Bertoglio e Carobrez, 2002; Teixeira, 2002). Outro aspecto a ser considerado é o efeito da experiência prévia ao LCE. Algumas pesquisas revelaram que uma exposição ao LCE é suficiente para afetar as respostas comportamentais e farmacológicas de roedores numa segunda exposição ao mesmo labirinto (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000; Teixeira, 2002), isso porque o medo ou ansiedade gerados pela exposição inicial ao LCE parecem ser do tipo incondicionado, enquanto na segunda exposição o medo parece ser condicionado (File e Zangrossi, 1993; File *et al.*, 1996) e adquirido ao longo dos minutos da primeira exposição (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os fatos relatados na introdução, nos propusemos a investigar se a SCPdl modularia o efeito ansiogênico induzido pelo PTZ em ratos submetidos ao LCE. Esta análise foi realizada através da manipulação química dessa estrutura cerebral associada a administração de PTZ pela via sistêmica. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

a) verificar a ação da lidocaína microinjetada na região caudal da SCPdl no efeito tipo ansiogênico do PTZ administrado IP em ratos submetidos ao teste do LCE;

b) verificar a ação do muscimol microinjetado na região caudal da SCPdl no efeito ansiogênico do PTZ administrado IP em ratos expostos ao teste, e observar as consequências comportamentais durante o re-teste no LCE;

c) verificar o ação do AP5 microinjetado na região caudal da SCPdl no efeito ansiogênico do PTZ administrado IP em ratos expostos ao teste, e observar as consequências comportamentais durante o re-teste no LCE.

3. MATERIAIS E METODOS

Considerações Éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais que estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências, e que foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (278/CEUA e 23080.006118/2004-36/UFSC). Em adição, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos machos, com 3-4 meses de idade, pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm), em duplas ou trios. Durante todo o período de permanência no biotério, os animais tiveram livre acesso à água e ração, e foram mantidos em ambiente com temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo de luz (12 h claro/escuro) controlados, iniciando o claro às 7 h.

3.2. Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados as seguintes drogas foram utilizadas: xilazina (10 mg/ml; Rompun®, Bayer, Brasil), quetamina (58 mg/ml; Dopalen®, Agribrands, Brasil), pentilenotetrazol (6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazolo-[1,5-a] azepine; Sigma, Alemanha) 30 mg/kg/ml, líquido artificial (NaCl

126,6 mM, NaHCO₃ 27,4 mM, KCl 2,4 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 0,89 mM, MgCl₂ 0,8 mM, Na₂HPO₄ 0,48 mM e glicose 7,1 mM com pH = 7,4), lidocaína (2-dietil-N-[2,6-dietifenil]-acetamida HCl, RBI, EUA) 40 nmol, AP5 (ácido \pm -2-amino-5-fosfonopentanóico, RBI, EUA) 3,0 e 6,0 nmol, muscimol (Tocris, UK) 0,25 e 0,50 nmol e Azul de Evans (Sigma, EUA).

3.3. Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com uma injeção IP de 1,5 ml/kg de uma solução combinada de xilazina (10 mg/ml; Rompun®, Bayer, Brasil) e quetamina (58 mg/ml; Dopalen®, Agribrands, Brasil). Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se a tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal.

Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA), realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então, uma solução de xilocaína com adrenalina (2 %) por via subcutânea, visando a formação de uma pápula, que não só tinha efeito anestésico local e vasoconstritor, como também orientou na retirada de uma pequena área ovalada da pele. Em seguida, realizou-se a raspagem do perióstio, deixando a calota craniana exposta permitindo a visualização da sutura lambdóide e da coronária. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi novamente seco e a calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Os dois

parafusos foram colocados logo atrás da sutura coronária. Para o implante da cânula na SCPdl, as coordenadas obedecidas, segundo Paxinos e Watson (1998), foram as seguintes: antero-posterior = -7,6 mm, em relação ao bregma, médio-lateral = 1,9 mm e dorso-ventral = 2,0 mm a partir da superfície externa do osso craniano, em um ângulo de 22 °. À cânula foi adaptado um mandril nº 30, com o intuito de prevenir o seu entupimento.

Uma vez adaptados, os parafusos, a cânula e o mandril, novamente o osso foi seco e a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico auto-polimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma prótese sólida. Decorridos alguns minutos para a secagem total desta, o animal pôde ser retirado do aparelho estereotáxico.

Após a cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa específica para recuperação, dotada de uma lâmpada de 40 W para evitar a hipotermia conseqüente à anestesia geral. Posteriormente, os animais foram colocados aos pares em gaiolas, com livre acesso à água e comida, onde permaneceram por no mínimo 5 dias, até a data do experimento.

3.4. Cânulas

As cânulas-guia implantadas a fim de possibilitar as microinjeções na SCPdl foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm. Com o auxílio do paquímetro (Mitutoyo - Brasil), as cânulas foram cortadas no comprimento de 13 mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual não permitia

sua total introdução pelo orifício feito previamente com a broca odontológica.

3.5. Microinjeção Intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16,2 mm confeccionadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas por um tubo de polietileno à microseringa (Hamilton, 5 μ l). A seringa foi preenchida com água destilada e as soluções a serem injetadas, separadas por uma bolha de ar. A agulha possuía 3,2 mm a mais do que a cânula-guia, de maneira que as drogas fossem realmente microinjetadas na SCPdl.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado manualmente e foi retirado o mandril adaptado à cânula-guia durante o ato cirúrgico. Com o auxílio de limas odontológicas, cortadas de maneira a não ultrapassar 13 mm de comprimento, a cânula-guia foi limpa. Posteriormente, a agulha foi introduzida pela cânula. Em cada animal foi injetado 0,3 μ l de solução, em 30 s. Em seguida, o animal permaneceu na sua gaiola, até o momento de sua exposição ao LCE.

3.6. Teste Comportamental

Esse equipamento, em forma de cruz, elevado 50 cm do chão, é composto por dois braços fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm) opostos a dois braços abertos (50 x 10 cm), sendo que tais

braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1 cm de altura) para evitar a queda dos animais.

O modelo estava localizado numa sala com luz amarela, cuja intensidade não ultrapassava 44 lux. Após o teste de cada animal, os equipamentos foram limpos com solução de etanol 10 %.

3.7. Protocolo Experimental

O trabalho teve 3 etapas. Com exceção da primeira etapa na qual os animais foram submetidos somente ao teste, todos os outros animais foram submetidos ao teste e re-teste no LCE, durante 5 min cada, num intervalo de 24 h. As duas exposições ao LCE foram gravadas em fitas para leitura posterior.

Na etapa I, foram avaliados os efeitos da microinjeção de lidocaína na SCPdl de ratos previamente tratados com uma injeção IP de PTZ.

Na etapa II, foram avaliados os efeitos da microinjeção de um agonista do receptor GABA_A, muscimol, na SCPdl de ratos previamente tratados com uma injeção IP de PTZ.

Na etapa III, foram avaliados os efeitos da microinjeção de um antagonista do receptor NMDA , AP5, na SCPdl de ratos previamente tratados com uma injeção IP de PTZ.

No dia do teste, os animais eram transferidos para uma sala onde permaneciam por 1 hora para ambientalização. Em seguida, os animais recebiam a injeção IP (salina ou PTZ 30 mg/kg) e, 20 min depois, estes animais eram transferidos isoladamente

para uma ante-sala onde recebiam a microinjeção intra-SCPdl de uma das seguintes soluções:

- a. líquido artificial;
- b. lidocaína (40 nmol);
- c. AP5 (3,0 ou 6,0 nmol);
- d. Muscimol (0,25 ou 0,50 nmol).

Após a microinjeção, o animal era recolocado na sua gaiola onde permanecia por mais 10 min sendo então submetido ao teste.

O animal era transferido para a sala do teste, onde era colocado diretamente na plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento era registrado com uma câmera de vídeo por um período de 5 min, de acordo com o procedimento descrito por Pellow e colaboradores (Pellow *et al.*, 1985). Vinte e quatro h após, os diferentes grupos foram novamente submetidos ao LCE por 5 min, sem administração de drogas.

É interessante salientar que os grupos experimentais e os controles foram realizados em paralelo; todos os experimentos foram realizados entre 13 e 17 h e as doses, assim como os tempos de tratamento, foram selecionados de acordo com dados da literatura (De-Souza *et al.*, 1997; Pandóssio e Brandão, 1999; Pessatti, 1999; Teixeira, 2002).

Após os experimentos, os registros em vídeos foram lidos e os comportamentos anotados minuto-a-minuto.

3.8. Análise Comportamental de ratos submetidos ao LCE

Os parâmetros comportamentais registrados minuto a minuto durante o teste e/ou re-teste foram:

- Freqüência de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;
- Tempo de permanência dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;
- Freqüência de tentativas de entradas nos braços abertos, sendo considerado tentativa, o ato do animal colocar até 3 patas em um dos braços abertos, seguida de retração à posição original. Este parâmetro parece estar relacionado a comportamento de avaliação de risco (Bertoglio e Carobrez, 2000).

Posteriormente calculou-se os índices clássicos de ansiedade: a porcentagem de número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas em qualquer um dos braços (%EBA) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), durante os 5 minutos de exposição ao LCE.

De maneira complementar, foi feita uma análise minuto-a-minuto da %TBA visando fornecer uma avaliação temporal do comportamento de esquiva e traçar um panorama geral sobre o perfil comportamental de ratos submetidos ao teste/reteste no LCE.

3.9. Perfusão e Histologia

Após o teste comportamental, os animais foram novamente anestesiados com a combinação anestésica descrita no item 3.2., por via IP e perfundidos, via intracardíaca, com solução

salina (NaCl 0,9 %), seguida por uma solução de formaldeído (10 %).

Posteriormente, os animais foram decapitados e receberam uma microinjeção de Azul de Evans (0,30 μ l) para determinar o sítio da microinjeção. Seguiu-se a remoção dos cérebros que foram acondicionados em solução formaldeído (10 %), por um mínimo de 3 dias. Os cérebros foram fatiados em um micrótomo de congelamento. Os sítios das injeções podem ser visualizados na Figura 4, os quais foram identificados através da comparação do corte com o diagrama do atlas de Paxinos e Watson (1998). Foram incluídos na análise estatística os animais com histologia positiva, ou seja, com microinjeção na SCPdl. É importante ressaltar que animais cuja microinjeção localizou-se no colículo superior foram considerados como controle "out".

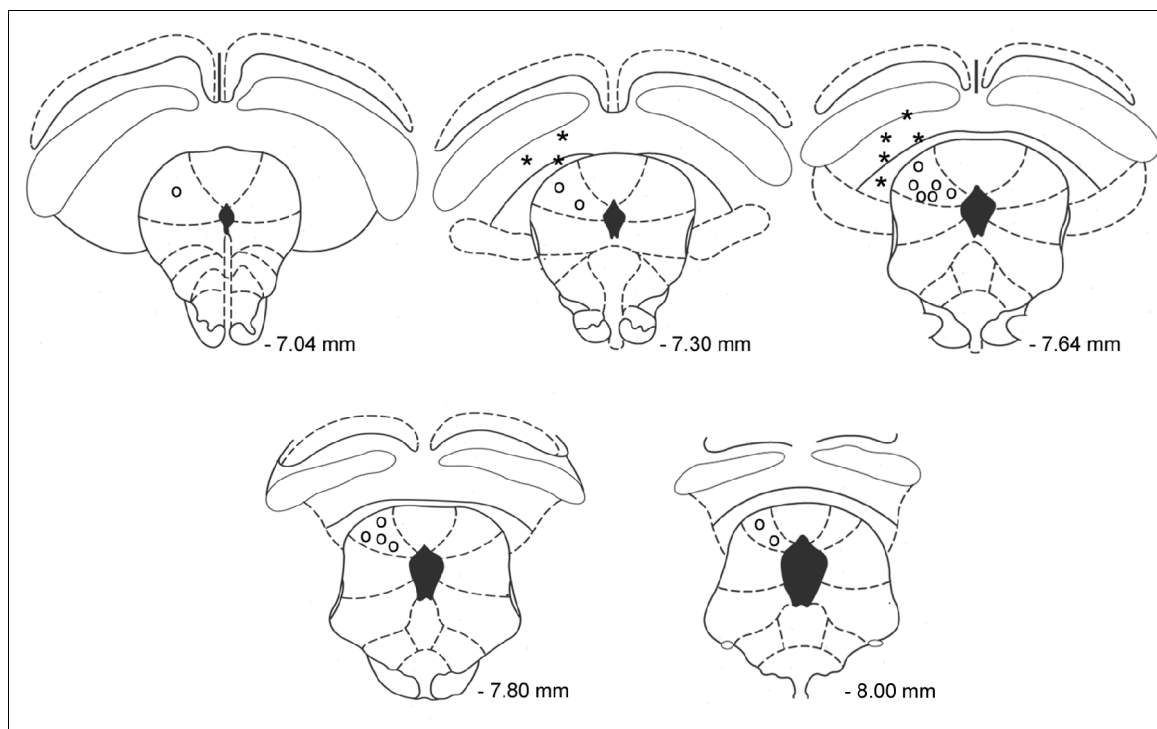


Fig. 4. Diagrama de cortes mesencefálicos coronais de cérebro de rato, ilustrando os sítios das microinjeções, marcados com Azul de Evans, na porção caudal da SCPdl. Os círculos representam os acertos na área de interesse e os asteriscos outros locais, como colículo superior. Os sítios aparecem em número reduzido devido a sobreposição dos mesmos (Adaptado de Paxinos e Watson, 1998).

3.10. Análise Estatística

Os dados do teste e/ou re-teste (sessões de 5 minutos), expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett, para a verificação de homogeneidade das variâncias; os dados %TBA dos grupos AP5 não eram homogêneos, sendo, portanto, transformados pela raiz quadrada, com o objetivo de homogeneizar a amostra.

Todos os parâmetros estudados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias. Os tratamentos IP e intra-SCPdl e o teste/re-teste ou minuto-a-minuto (medida repetida) foram considerados como variáveis independentes; os parâmetros comportamentais observados foram considerados como variáveis dependentes e a histologia positiva foi considerada como condição.

Valores significativos de tratamento e teste/re-teste (ou minuto-a-minuto) indicados pela ANOVA foram submetidos ao teste *post hoc* de Newman-Keuls, de comparação combinada. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ e os valores entre $0,05 < p < 0,1$ foram consideradas como tendências.

4. RESULTADOS

4.1 ETAPA 1. Efeitos da inativação temporária e reversível com lidocaína microinjetada na SCPdl sobre o comportamento de ratos previamente tratados com PTZ submetidos ao LCE.

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 5 a 7 e na Tabela I.

A Fig. 5 mostra os efeitos da interação entre os tratamentos com PTZ sistêmico e microinjeção intra-SCPdl de líquor ou lidocaína. A ANOVA de duas vias mostrou que há uma interação entre o tratamento IP *versus* o tratamento intra-SCPdl para os parâmetros %TBA ($F_{1,48} = 14,42; p < 0,001$) e %EBA ($F_{1,48} = 12,09; p < 0,01$). A análise *post hoc* mostrou que em ratos que receberam líquor, o PTZ (30 mg/kg) reduziu significativamente a atividade nos braços abertos (%TBA e %EBA) do LCE, confirmando a propriedade tipo ansiogênica desta droga. Entretanto, em animais que receberam lidocaína (40 nmol) intra-SCPdl, a injeção sistêmica de PTZ não foi capaz de alterar a atividade nos braços abertos do LCE, quando comparado ao grupo controle microinjetado com líquor (grupo PTZ-líquor).

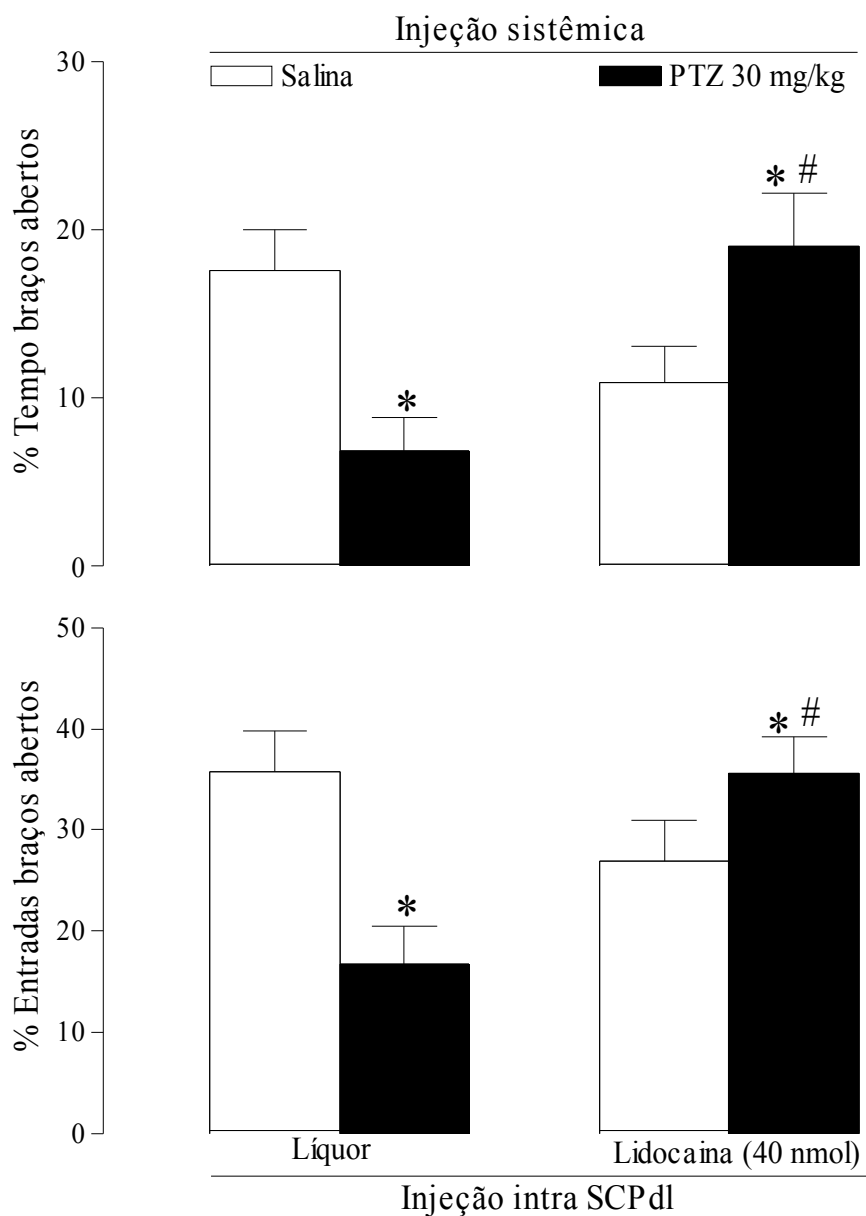


Figura 5. Efeitos da administração intra-SCPdl de lidocaina sobre a atividade nos braços abertos do LCE em ratos pré-tratados com pentilenotetrazol (PTZ; IP). Os dados representam a média \pm EPM (n= 11-15). * $p < 0,05$ diferença significativa entre o PTZ e seu respectivo controle. # $p < 0,05$ diferença significativa entre a lidocaina e seu respectivo controle.

Na Figura 6 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 min de exposição no LCE. Nos animais que receberam salina (Figura 6A), a ANOVA para medidas repetidas detectou efeito marginal do tratamento intra-SCPdl ($F_{1,26} = 3,96$; $p = 0,057$) e da exposição minuto-a-minuto ($F_{4,104} = 4,30$; $p < 0,01$), independente do tratamento intra-SCPdl sobre a %TBA. O teste *post hoc* mostrou que para ambas as curvas referentes ao tratamento intra-SCPdl (líquor e lidocaína) há uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na %TBA ao longo dos 5 min da exposição, isto é, no último min da sessão a %TBA é menor do que nos três primeiros min, sugerindo que há uma aquisição gradual da resposta de esquiva aos braços abertos.

Para o grupo que recebeu PTZ (Figura 6B), a ANOVA para medidas repetidas detectou um efeito significativo tanto do tratamento intra-SCPdl ($F_{1,22} = 10,99$; $p < 0,003$) quanto do tempo ($F_{4,88} = 6,74$; $p < 0,0001$). Em relação ao tratamento intra-SCPdl, o teste *post hoc* mostrou que a administração de lidocaína em ratos previamente tratados com PTZ IP aumentou significativamente ($p < 0,05$) a %TBA quando comparados aos que receberam líquido. Quanto à exposição minuto-a-minuto, o teste *post hoc* mostrou também que há uma diminuição gradativa ($p < 0,05$) ao longo dos 5 min de exposição ao modelo, isto é, a %TBA é menor no 3°, 4° e 5° min quando comparados ao 1° min somente para o grupo lidocaína.

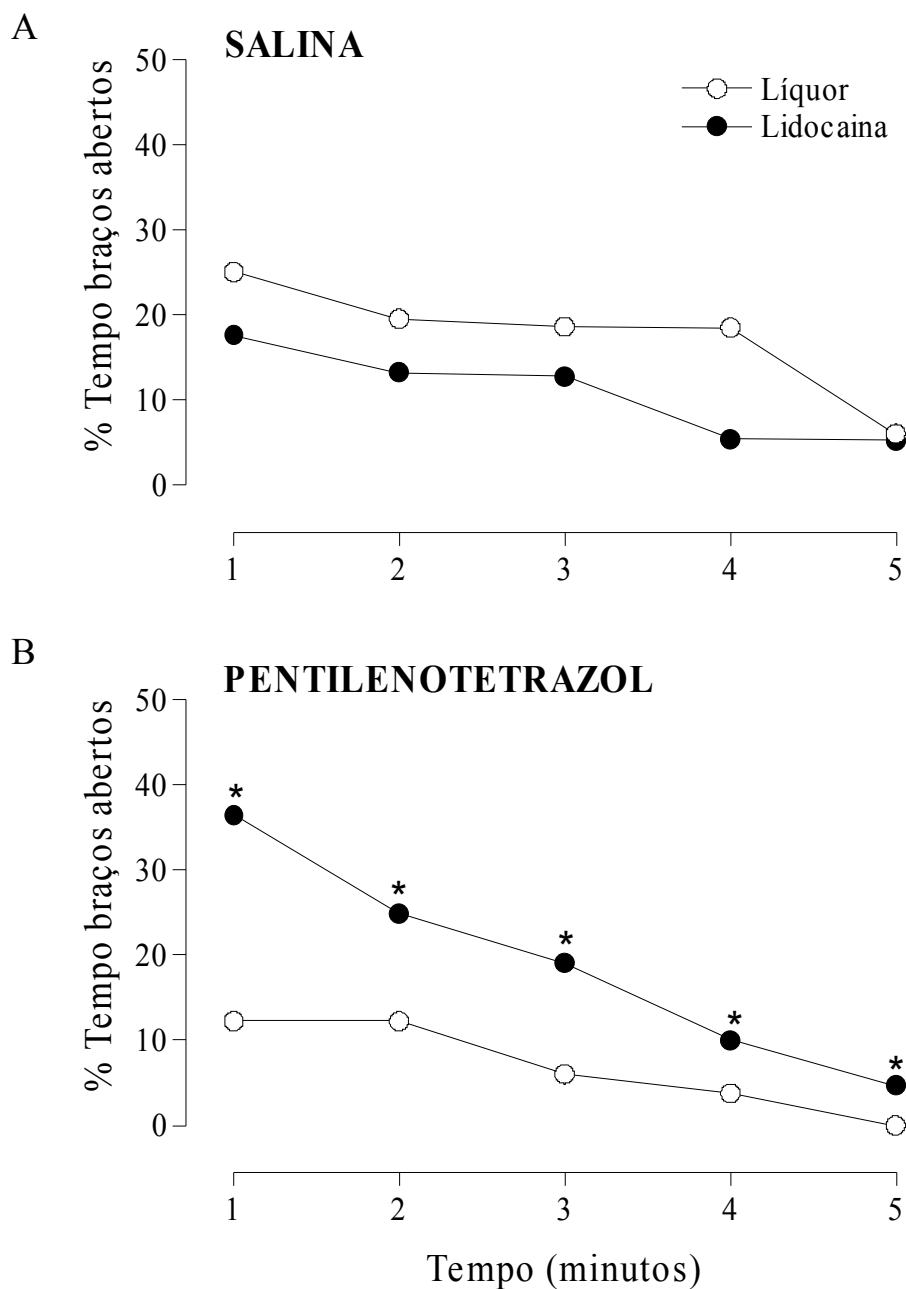


Figura 6. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a inativação da SCPdl com microinjeção de lidocaina 40 nmol, 10 minutos antes, em ratos pré-tratados com SALINA (A) ou PTZ 30 mg/kg (B) 30 minutos antes da exposição ao teste do LCE. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p < 0,05$ diferença significativa entre as curvas.

Por fim, todos esses resultados foram observados na ausência de efeitos sobre a atividade exploratória geral, representada pelo número de EBF (Figura 7A).

A ANOVA mostrou um efeito significativo para o tratamento IP no parâmetro avaliação de risco ($F_{1,48} = 4,77; p < 0,04$). O teste *post hoc* revelou que ratos que receberam PTZ reduziram comportamentos de avaliação de risco independentemente do tratamento intra-SCPdl (Figura 7B).

Na Tabela I podemos observar que o tratamento com lidocaína em outra estrutura cerebral, o colículo superior, não impediu a expressão do efeito ansiogênico do PTZ.

Tabela I. Efeito comportamental da administração IP de PTZ 30 mg/kg em ratos microinjetados com líquor ou lidocaína na SCPdl (n=11-15) ou no colículo superior (CS) (n=6-10).

	SCPdl		CS	
	Líquor	Lidocaina	Líquor	Lidocaina
% TBA	6.9 ± 2.0	19.1 ± 3.2 *	6.5 ± 3.2	6.7 ± 3.1
% EBA	16.7 ± 3.8	35.6 ± 3.6 *	21.7 ± 8.8	18.6 ± 7.0
EBF	5.7 ± 0.7	6.5 ± 0.9	3.3 ± 0.7	3.1 ± 0.7
Avaliação de risco	6.5 ± 0.7	5.2 ± 0.8	4.8 ± 1.3	5.8 ± 1.1

OBS: Os valores representam a média ± EPM. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo líquor.

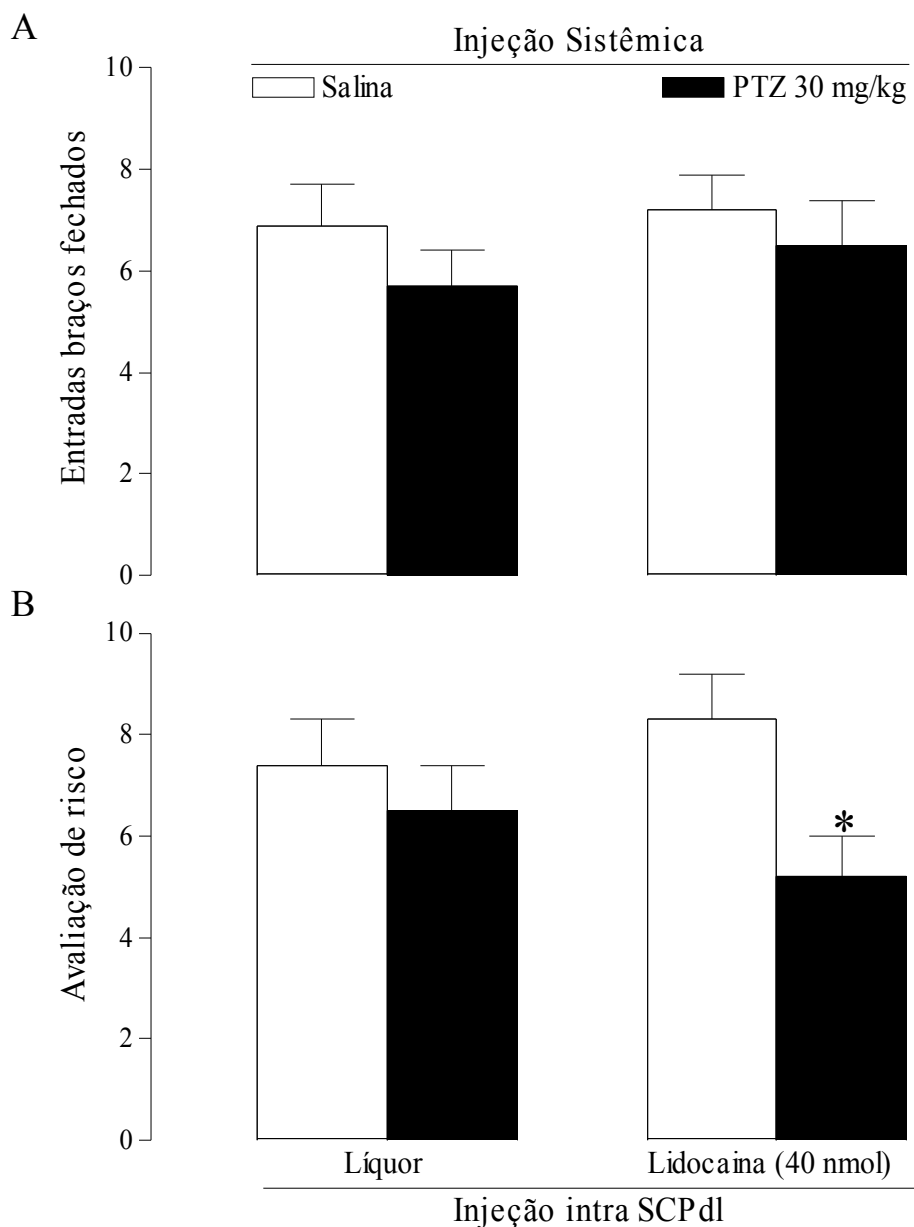


Figura 7. Efeitos da microinjeção (0,3 μ l) de lidocaína 40 nmol na SCPdl em ratos previamente tratados com PTZ IP 30 mg/kg, 10 e 30 minutos antes, respectivamente, da exposição ao LCE, sobre o número de EBF (A) e a avaliação de risco (B). Os dados são expressos na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre tratamentos IP.

4.2 ETAPA 2. Efeitos do muscimol microinjetado na SCPdl sobre o comportamento de ratos previamente tratados com PTZ submetidos ao teste e re-teste do LCE.

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 8 a 10 e na Tabela II.

Na Figura 8 estão representados os dados obtidos após o tratamento com muscimol na SCPdl de ratos previamente tratados com PTZ submetidos ao teste no LCE.

A ANOVA detectou um efeito significativo sobre a %TBA (tratamento intra-SCPdl: $F_{2,47} = 14,57$; $p < 0,001$ e interação entre tratamentos IP versus intra-SCPdl: $F_{2,47} = 4,14$; $p < 0,02$) e sobre a %EBA (tratamento intra-SCPdl: $F_{2,47} = 12,15$; $p < 0,001$ e interação entre tratamentos IP versus intra-SCPdl: $F_{2,47} = 7,20$; $p < 0,001$). O teste *post hoc* mostrou uma diminuição de ambos os parâmetros no grupo PTZ-líquor quando comparado ao grupo salina-líquor, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico provocado pela administração IP de PTZ. Esta redução da atividade nos braços abertos do LCE não foi observada nos grupos PTZ-muscimol 0,25 e PTZ-muscimol 0,50, indicando que a inativação da SCPdl com muscimol promove um bloqueio do efeito tipo-ansiolítico do PTZ. Em relação ao efeito sobre o tratamento intra-SCPdl, o teste *post hoc* revelou que a administração de muscimol 0,5 nmol em ratos previamente tratados com salina aumentou tanto a %TBA quanto a %EBA quando comparado aos animais que receberam líquido, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico desta droga nesta dose.

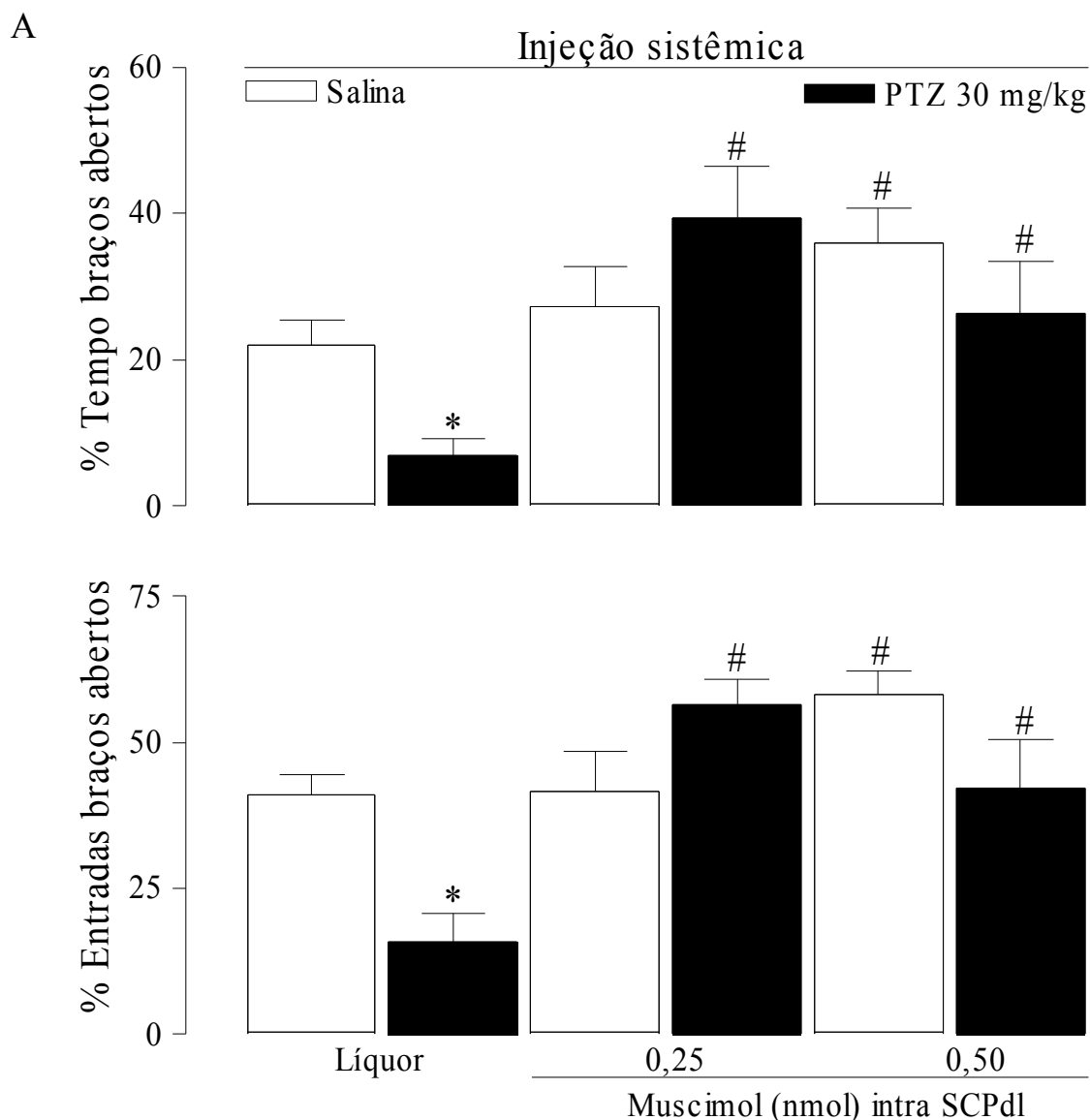
**B**

Figura 8. Efeitos da administração intra-SCPdl de muscimol em ratos previamente tratados com PTZ IP sobre a atividade nos braços abertos do LCE durante o teste. Os dados estão representados como média \pm EPM ($n = 8-12$). * $p < 0,05$ diferentes entre tratamentos IP e seu respectivo controle. # $p < 0,05$ diferentes entre tratamento intra-SCPdl e seu respectivo controle.

Com relação ao número de EBF (Figura 9A), a ANOVA detectou um efeito significativo para o tratamento IP ($F_{1,47} = 7,84$; $p < 0,007$), sendo que o teste *post hoc* mostrou uma diminuição do número de EBF nos grupos tratados com PTZ, quando comparados

aos seus respectivos grupos salina, independentemente do tratamento intra-SCPdl.

Quanto à avaliação de risco (Figura 9B), a ANOVA detectou um efeito significativo do tratamento IP ($F_{1,47} = 7.93$, $p < 0.007$) e do tratamento intra-SCPdl ($F_{2,47} = 15,08$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* mostrou que nos grupos tratados com PTZ houve uma diminuição da avaliação de risco quando comparados aos seus respectivos controles, independentemente do tratamento intra-SCPdl, e que no grupo tratado com muscimol 0,50 nmol também houve uma redução nesse parâmetro, independentemente do tratamento IP.

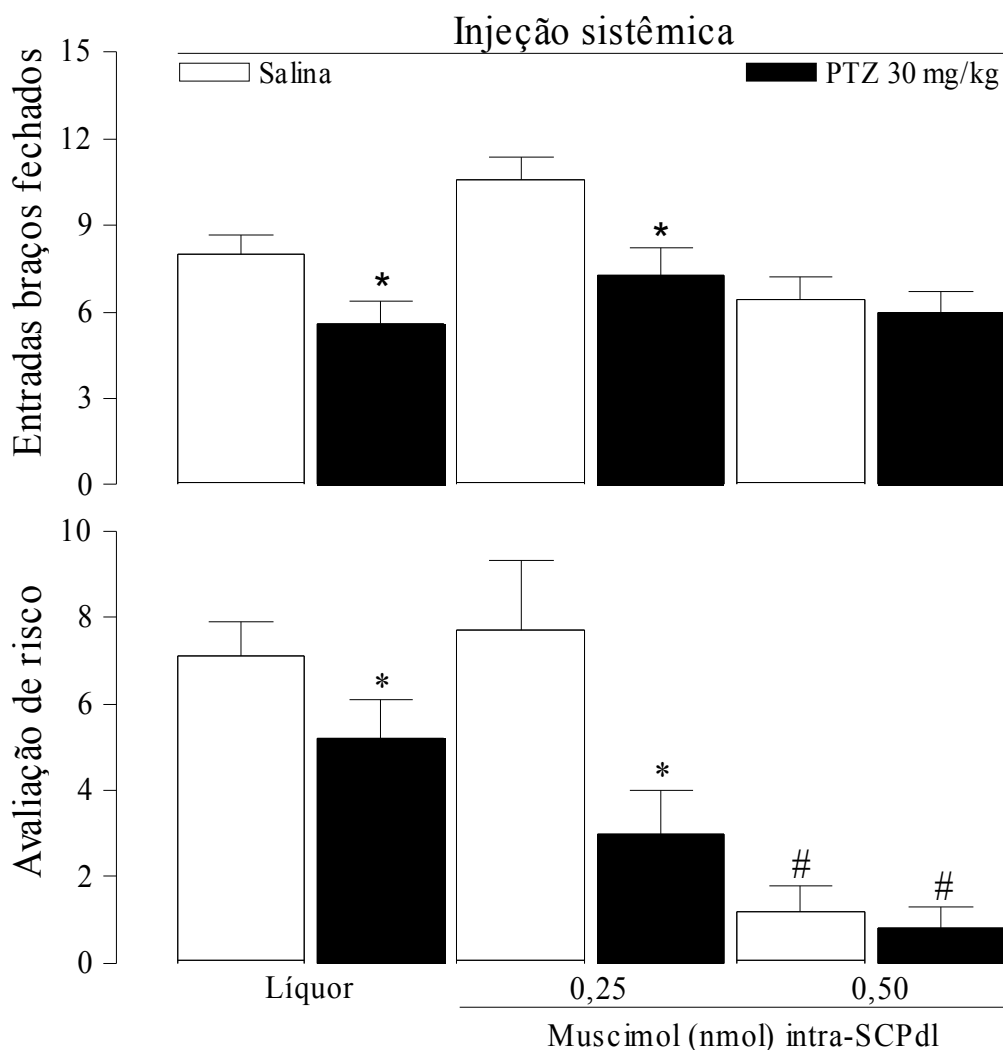
**B**

Figura 9. Efeitos da microinjeção intra-SCPdl de muscimol em ratos previamente tratados com PTZ IP sobre a atividade locomotora e exploratória de animais submetidos ao teste no LCE. Os dados são expressos na forma de médias \pm EPM ($n = 8-12$). * $p < 0,05$ diferente entre tratamento IP e seu respectivo controle. # $p < 0,05$ diferente entre tratamentos intra-SCPdl e seus respectivo controle.

Na Figura 10 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 min de exposição ao teste e ao re-teste. Com relação ao teste, em animais que receberam salina (Figura 9A), a ANOVA detectou um efeito marginal referente ao tratamento intra-SCPdl ($F_{2,28} = 2,81$; $p < 0,07$), um efeito significativo da exposição minuto-a-

minuto ($F_{4,112} = 12,21$; $p < 0,0001$) e uma interação entre o tratamento-intra-SCPdl e a exposição minuto-a-minuto ($F_{8,112} = 2,34$; $p < 0,02$) para %TBA. O teste *post hoc* mostrou que há um decréscimo ($p < 0,05$) da %TBA ao longo dos 5 min de exposição-teste, sendo que o resultado no 1º min é significativamente diferente dos 3º, 4º e 5º min, para todos os grupos, sugerindo que há aquisição gradual da resposta de esquiva aos braços abertos do LCE.

Na Figura 10B podemos observar o perfil minuto-a-minuto dos animais pré-tratados com PTZ e tratados intra-SCPdl com líquor ou muscimol (0,25 e 0,50 nmol). A ANOVA para medidas repetidas detectou um efeito significativo do tratamento intra-SCPdl ($F_{2,19} = 11,28$; $p < 0,001$) e da exposição minuto-a-minuto ($F_{4,76} = 5,99$; $p < 0,001$) na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que as curvas dos animais tratados com muscimol, em ambas as doses, aumentaram significativamente a %TBA quando comparados ao controle, indicando que a inativação da SCPdl com muscimol impediu o aparecimento do efeito ansiogênico do PTZ.

No re-teste não houve diferenças entre os grupos.

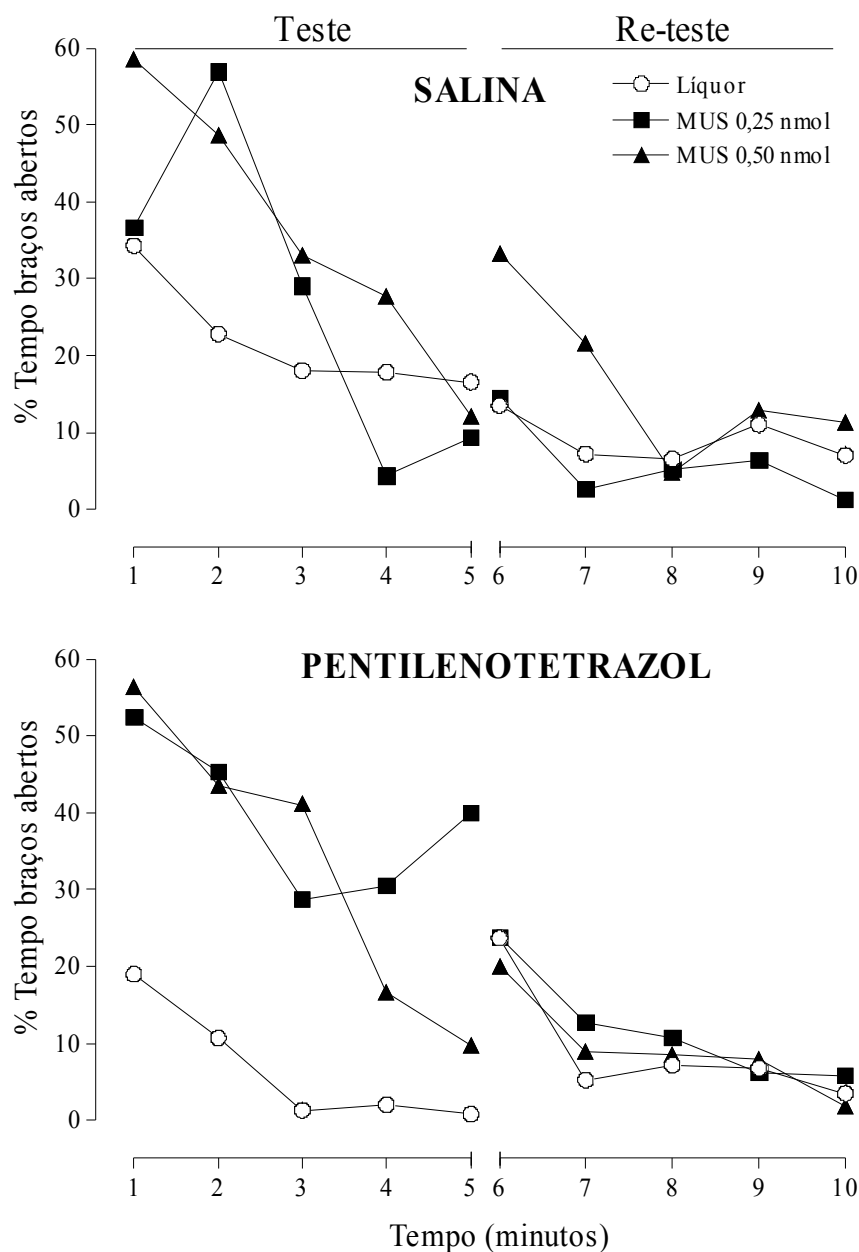


Figura 10. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após administração intraperitoneal de muscimol (MUS 0,25 e 0,50 nmol) em ratos previamente tratados com injeção IP de SALINA (A) ou PTZ 30 mg/kg (B), submetidos ao teste do LCE. O re-teste foi realizado 24 h após sem a administração de drogas. As curvas representam as médias das %TBA do LCE (n = 8-12).

Na Tabela II podemos observar a comparação entre os valores do teste e do re-teste. A ANOVA para medidas repetidas detectou um efeito sobre a %TBA (teste/re-teste: $F_{1,47} = 66,54$; $p < 0,0001$ e interação entre tratamentos IP *versus* intra-SCPdl *versus* teste/re-teste ($F_{2,47} = 3,45$; $p < 0,04$) e sobre a %EBA (teste/re-teste: $F_{1,47} = 20,56$; $p < 0,0001$ e interação entre tratamentos IP *versus* intra-SCPdl *versus* teste/re-teste: $F_{2,47} = 2,47$; $p < 0,005$). O teste *post hoc* revelou que houve uma diminuição significativa nesses parâmetros no re-teste em relação aos valores do teste em todos os grupos, exceto os grupos PTZ/MUS 0,5 que não se alterou e o PTZ/líquor cujo valor da %EBA aumentou significativamente. Quanto ao parâmetro número de EBF não houve diferença entre os valores do teste e do re-teste.

Ainda na Tabela II podemos verificar que a ANOVA detectou um efeito significativo do tratamento IP ($F_{1,47} = 7,95$; $p < 0,007$), do tratamento intra-SCPdl ($F_{2,47} = 9,38$; $p < 0,001$) e da interação entre tratamento intra-SCPdl *versus* tratamento IP sobre a avaliação de risco ($F_{2,47} = 4,89$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* mostrou que tanto os grupos tratados com PTZ IP, quanto os com muscimol 0,50 nmol intra-SCPdl, aumentaram a avaliação de risco no re-teste, quando comparados aos seus valores no teste.

Tabela II. Efeitos da administração de muscimol na SCPdl de ratos previamente tratados com PTZ 30 mg/kg sobre os diferentes parâmetros analisados em ratos submetidos ao teste e ao re-teste no LCE.

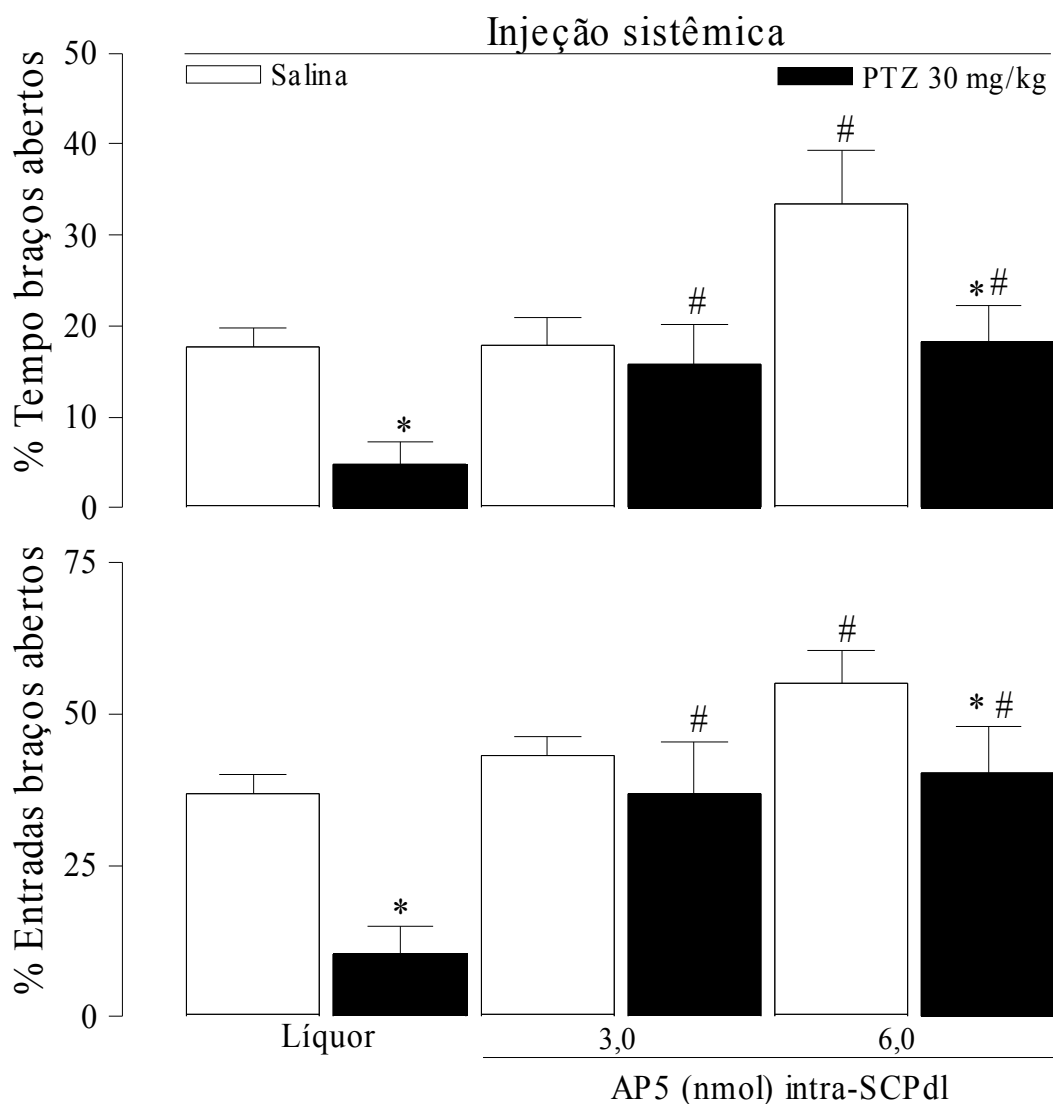
Tratamento	Teste	Re-teste
A		
% TEMPO BRAÇOS ABERTOS		
Sal-líquor	21,9 ± 3,6	9,10 ± 3,0 *
PTZ-líquor	6,80 ± 2,5	9,30 ± 1,9
Sal-MUS 0,25 nmol	27,3 ± 5,4	6,00 ± 3,4 *
PTZ-MUS 0,25 nmol	39,4 ± 7,0	11,9 ± 3,3 *
Sal-MUS 0,50 nmol	36,4 ± 4,8	16,8 ± 2,0 *
PTZ-MUS 0,50 nmol	26,4 ± 7,0	18,6 ± 1,9
B		
% ENTRADAS BRAÇOS ABERTOS		
Sal-líquor	41,0 ± 3,4	29,0 ± 6,6 *
PTZ-líquor	15,8 ± 4,9	40,0 ± 5,7 *
Sal-MUS 0,25 nmol	41,6 ± 6,8	13,8 ± 7,2 *
PTZ-MUS 0,25 nmol	56,4 ± 4,3	22,2 ± 6,8 *
Sal-MUS 0,50 nmol	58,2 ± 4,0	39,0 ± 2,2 *
PTZ-MUS 0,50 nmol	42,3 ± 8,3	38,9 ± 2,3
C		
FREQÜÊNCIA DE ENTRADAS BRAÇOS FECHADOS		
Sal-líquor	8,00 ± 0,7	8,50 ± 0,9
PTZ-líquor	5,60 ± 0,8	7,80 ± 0,9
Sal-MUS 0,25 nmol	10,6 ± 0,8	8,40 ± 1,3
PTZ-MUS 0,25 nmol	7,30 ± 0,9	11,3 ± 2,0
Sal-MUS 0,50 nmol	6,40 ± 0,8	9,20 ± 1,1
PTZ-MUS 0,50 nmol	6,00 ± 0,7	11,2 ± 1,0
D		
AVALIAÇÃO DE RISCO		
Sal-líquor	7,10 ± 0,8	6,60 ± 1,1
PTZ-líquor	5,20 ± 0,9	4,20 ± 0,7
Sal-MUS 0,25 nmol	7,70 ± 1,6	7,60 ± 0,9
PTZ-MUS 0,25 nmol	3,00 ± 1,0	5,70 ± 1,0 *
Sal-MUS 0,50 nmol	1,20 ± 0,6	4,40 ± 1,3 *
PTZ-MUS 0,50 nmol	0,80 ± 0,5	4,20 ± 1,2 *

OBS: Os dados são expressos na forma de média ± EPM (n = 8-12).
* = $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.

4.3 ETAPA 3. Efeitos do bloqueio dos receptores NMDA na SCPdl com microinjeção de AP5 sobre o comportamento de ratos previamente tratados com PTZ submetidos ao LCE.

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 11 a 13 e na Tabela 3.

Na Figura 11 estão representados os dados obtidos após o bloqueio dos receptores NMDA com AP5 em ratos previamente tratados com injeção IP de PTZ. A ANOVA detectou um efeito na %TBA [tratamento IP ($F_{1,50} = 16,17$; $p < 0,0002$); tratamento intra-SCPdl ($F_{2,50} = 11,26$; $p < 0,0001$)]; interação tratamento IP *versus* tratamento intra-SCPdl ($F_{2,50} = 2,72$; $p < 0,07$) e na %EBA [tratamento IP ($F_{1,50} = 14,28$; $p < 0,0004$); tratamento intra-SCPdl ($F_{2,50} = 14,66$; $p < 0,0001$)]; interação tratamento IP *versus* tratamento intra-SCPdl ($F_{2,50} = 2,55$; $p < 0,08$) no teste. O teste *post hoc* mostrou que o PTZ foi capaz de diminuir tanto a %TBA quanto a %EBA em ratos que receberam líquido, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico do PTZ. Entretanto, a administração de AP5, em ambas as doses, em animais pré-tratados com PTZ aumentou os valores desses índices quando comparados ao grupo que recebeu líquido. O teste *post hoc* também mostrou que animais que receberam injeção IP de salina e tratados intra-SCPdl com AP5 na maior dose aumentaram a atividade nos braços abertos (%TBA e %EBA) do LCE quando comparados ao grupo controle, indicando um efeito tipo-ansiolítico desta droga nesta dose.



B Figura 11. Efeitos da administração intra-SCPdl de AP5 em ratos pré-tratados com PTZ IP sobre a exploração dos braços abertos do LCE durante o teste. Os dados estão representados como média \pm EPM ($n = 6 - 10$). * = $p < 0,05$ diferença entre tratamento IP e seu respectivo controle. # = $p < 0,05$ diferença entre tratamento intra-SCPdl e seu respectivo controle.

A ANOVA mostrou um efeito significativo do tratamento IP ($F_{1,50} = 15,22$; $p < 0,0003$) para o parâmetro número de EBF (Figura 12A) no teste, sendo que o teste *post hoc* demonstrou que animais que receberam PTZ diminuíram o número de EBF, quando comparados aos seus respectivos controles.

A ANOVA também detectou um efeito significativo, tanto do tratamento IP ($F_{1,50} = 4,77; p < 0,03$), quanto do tratamento intra-SCPdl, ($F_{2,50} = 4,95; p < 0,01$) para a avaliação de risco (Figura 12B). O teste *post hoc* revelou que animais que receberam AP5 intra-SCPdl, em ambas as doses, pré-tratados com salina, tiveram uma diminuição na avaliação de risco, quando comparados aos que receberam líquido. Em adição, os animais tratados com PTZ reduziram a avaliação de risco independentemente do tratamento intra-SCPdl.

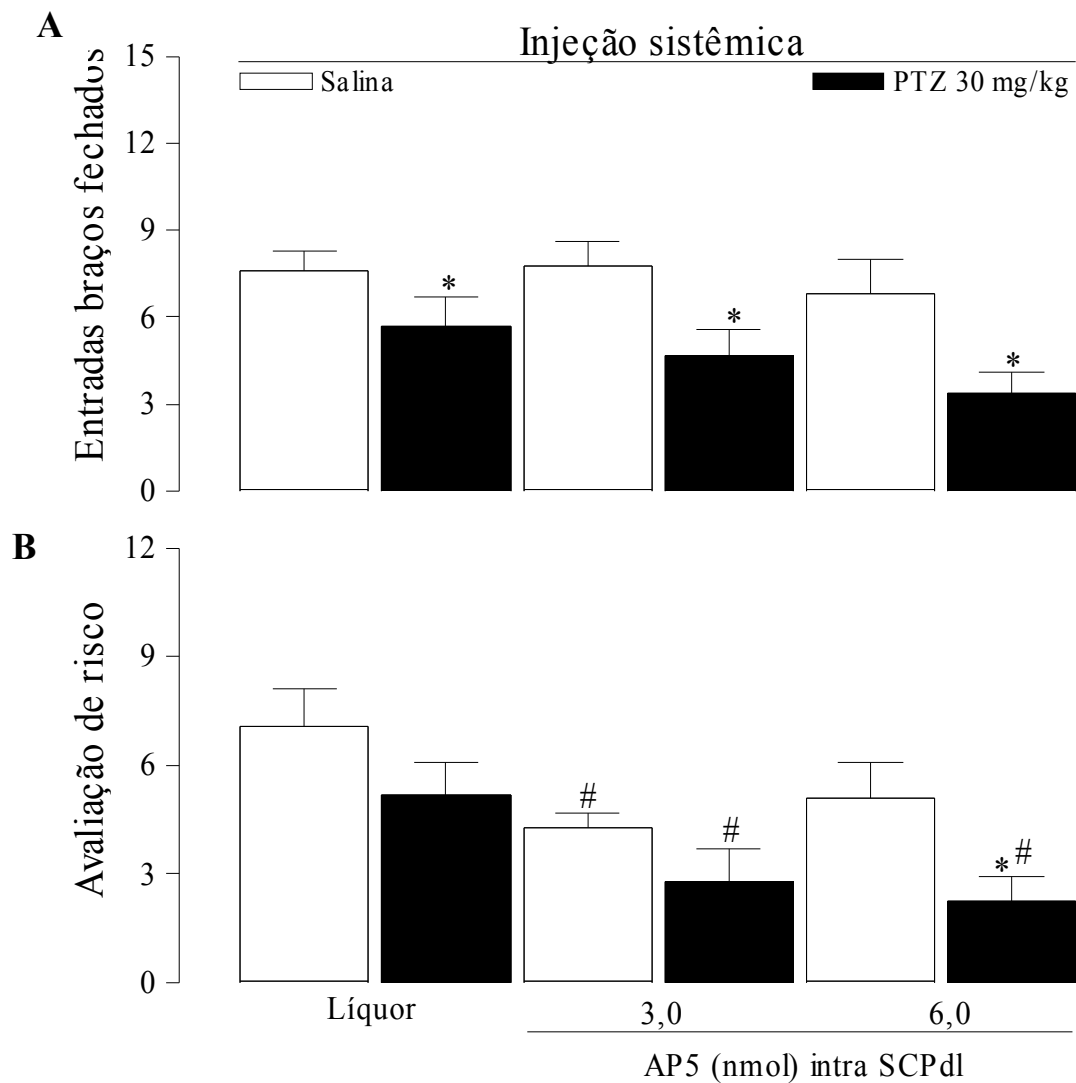


Figura 12. Efeitos da administração intra-SCPdl de AP5 em ratos pré-tratados com PTZ IP sobre a atividade locomotora e exploratória dos animais submetidos ao teste no LCE. Os dados são expressos na forma de médias \pm EPM ($n = 6-10$). * = $p < 0,05$ diferença significativa entre o tratamento IP e seu respectivo controle. # = $p < 0,05$ diferença significativa entre tratamentos intra-SCPdl e seus respectivos controle.

A Figura 13 mostra perfil minuto-a-minuto da %TBA dos animais submetidos ao LCE. Na Figura 12A observa-se a análise dos animais que receberam salina IP e líquor ou AP5 (3,0 e 6,0 nmol) intra-SCPdl. A ANOVA para medidas repetidas detectou efeito significativo do tratamento intra-SCPdl ($F_{2,29} = 4,92$; $p < 0,01$) na %TBA, sendo que o teste *post hoc* mostrou que há um aumento da %TBA no grupo AP5 6,0 nmol, corroborando dados da sessão total (Figura 11A), sugerindo um perfil tipo-ansiolítico desta droga. A ANOVA detectou ainda um efeito da exposição minuto-a-minuto.

A Figura 13B mostra o perfil minuto-a-minuto dos animais pré-tratados com PTZ IP e que foram tratados com líquor ou AP5 (3,0 ou 6,0 nmol) intra-SCPdl. A ANOVA mostrou um efeito significativo do tratamento intra-SCPdl ($F_{2,21} = 7,84$; $p < 0,003$), da exposição minuto-a-minuto ($F_{4,84} = 20,4$; $p < 0,00001$) e uma interação entre esses fatores ($F_{8,84} = 7,1$; $p < 0,00001$) para a %TBA. O teste *post hoc* mostrou que ambas as doses de AP5 aumentaram esse parâmetro em comparação ao controle, indicando que o efeito tipo-ansiógênico do PTZ foi bloqueado. O teste *post hoc* mostrou também que o 1° min de todos os grupos foi diferente do 3°, 4° e 5° min, indicando uma aquisição de esQUIVA ao longo dos 5 min de exposição. A ANOVA não detectou diferenças entre a exposição teste e re-teste.

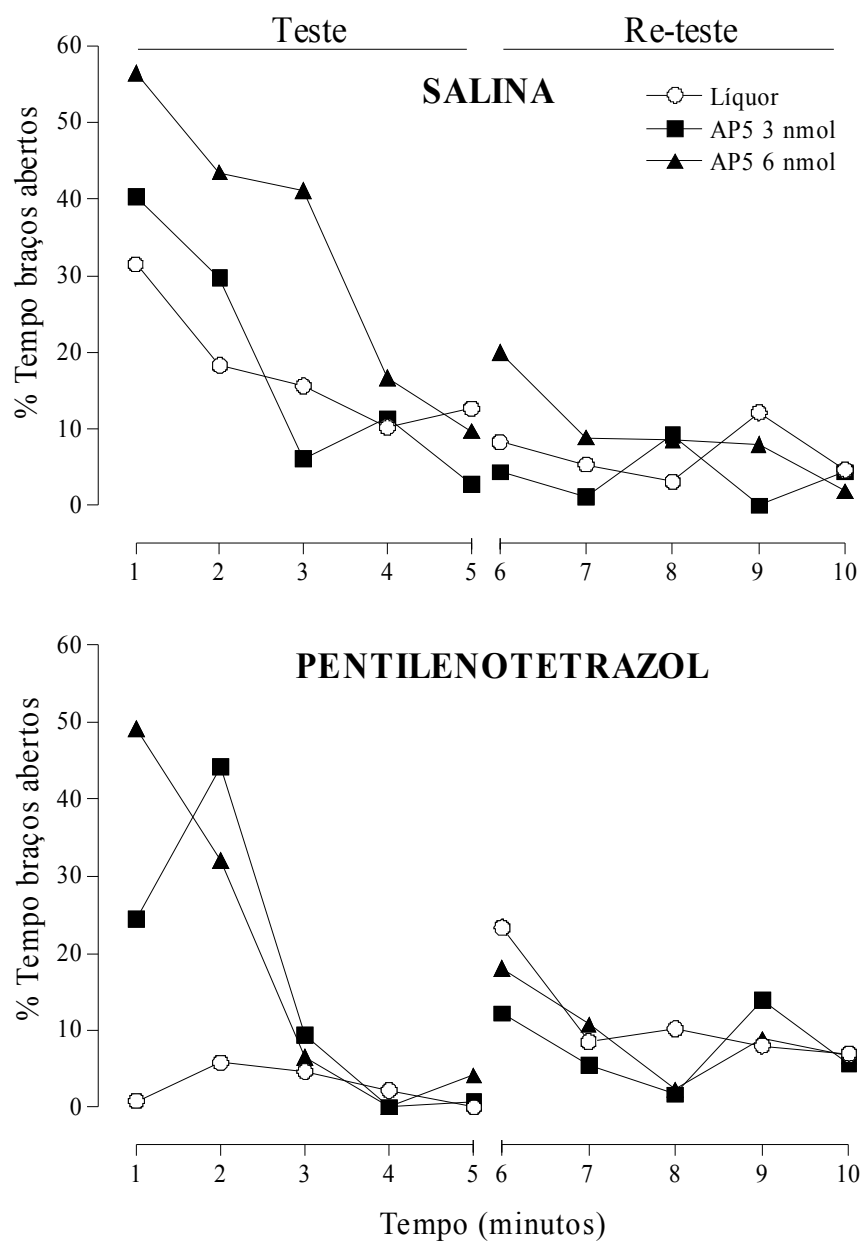


Figura 3. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após o bloqueio dos receptores NMDA com microinjeção (0,3 μ l) de AP5 (3,0 e 6,0 nmol) na SCPd1, 10 minutos antes, em ratos previamente tratados com injeção IP de SAL (A) ou PTZ 30 mg/kg (B), 30 minutos antes, da exposição ao teste do LCE. O re-teste foi realizado 24 h antes sem administração de drogas. As curvas representam as médias das %TBA do LCE (n = 6-10).

Na Tabela III é possível observar uma comparação entre os valores do teste e do re-teste. A ANOVA detectou um efeito na atividade dos braços abertos (%TBA e %EBA) referentes ao teste/re-teste ($F_{1,47} = 29,15$; $p < 0,0001$ e $F_{1,47} = 23,62$; $p < 0,0001$ respectivamente). O teste *post hoc* mostrou que houve uma diminuição significativa nesses parâmetros tanto para o grupo controle quanto para os grupos tratados, mostrando que no re-teste estes grupos apresentaram uma resposta de esquia aos braços abertos maior do que no teste. O grupo PTZ-líquor, entretanto, mostrou um aumento tanto na %TBA, quanto na %EBA no re-teste, quando comparado ao seu valor no teste.

Quanto ao número de EBF, a ANOVA detectou um efeito significativo do tratamento IP ($F_{1,47} = 6,26$; $p < 0,01$) e da exposição teste/re-teste ($F_{1,47} = 29,47$; $p < 0,0001$), sendo que os teste *post hoc* mostrou aumento do número de EBF no re-teste dos grupos tratados com PTZ IP.

Um efeito significativo foi detectado pela ANOVA na avaliação de risco referente ao teste/re-teste ($F_{1,47} = 23,62$; $p < 0,0001$), sendo que o teste *post hoc* mostrou um aumento da avaliação de risco no re-teste dos grupos PTZ-AP5 3,0 nmol e PTZ-AP5 6,0 nmol.

Tabela II. Efeitos da administração de AP5 na SCPdl de ratos previamente tratados com PTZ 30 mg/kg sobre os diferentes parâmetros analisados em ratos submetidos ao teste e ao re-teste no LCE.

Tratamento	Teste	Re-teste
A		
% TEMPO BRAÇOS ABERTOS		
Sal-líquor	17,7 ± 2,1	6,70 ± 1,2 *
PTZ-líquor	4,90 ± 2,4	11,4 ± 3,1 *
Sal-AP5 3,0 nmol	18,0 ± 2,9	3,80 ± 2,0 *
PTZ-AP5 3,0 nmol	15,8 ± 2,4	7,80 ± 3,0 *
Sal-AP5 6,0 nmol	33,4 ± 6,0	9,50 ± 2,6 *
PTZ-AP5 6,0 nmol	18,4 ± 4,0	9,40 ± 2,3 *
B		
% ENTRADAS BRAÇOS ABERTOS		
Sal-líquor	36,7 ± 3,3	17,7 ± 3,7 *
PTZ-líquor	10,4 ± 4,5	31,0 ± 4,0 *
Sal-AP5 3,0 nmol	43,0 ± 3,2	12,2 ± 5,2 *
PTZ-AP5 3,0 nmol	36,8 ± 8,5	21,7 ± 6,3 *
Sal-AP5 6,0 nmol	54,9 ± 5,5	22,4 ± 5,2 *
PTZ-AP5 6,0 nmol	40,1 ± 5,8	23,9 ± 2,8 *
C		
FREQÜÊNCIA DE ENTRADAS BRAÇOS FECHADOS		
Sal-líquor	7,60 ± 0,7	8,80 ± 1,0
PTZ-líquor	5,70 ± 1,0	7,80 ± 0,8 *
Sal-AP5 3,0 nmol	7,80 ± 0,8	8,20 ± 0,9
PTZ-AP5 3,0 nmol	4,70 ± 0,9	8,70 ± 0,3 *
Sal-AP5 6,0 nmol	6,80 ± 1,2	9,60 ± 1,0
PTZ-AP5 6,0 nmol	3,40 ± 0,7	9,10 ± 1,2 *
D		
AVALIAÇÃO DE RISCO		
Sal-líquor	7,10 ± 1,0	7,80 ± 1,1
PTZ-líquor	5,20 ± 0,9	6,90 ± 1,2
Sal-AP5 3,0 nmol	4,30 ± 0,4	6,80 ± 1,1
PTZ-AP5 3,0 nmol	2,80 ± 0,9	8,50 ± 1,2 *
Sal-AP5 6,0 nmol	5,10 ± 1,0	8,50 ± 0,9
PTZ-AP5 6,0 nmol	2,30 ± 0,7	10,6 ± 1,4 *

OBS: Os dados são expressos na forma de média ± EPM (n = 6-11).
* = $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível verificar a participação da SCPdl no efeito ansiogênico do PTZ. As evidências para essa afirmação mostram que as microinjeções de lidocaína, muscimol ou AP5 na SCPdl foram capazes de bloquear os efeitos ansiogênicos característicos da administração de PTZ em animais submetidos ao LCE.

Desde Hunsperger (1963), a SCP tem sido vista como uma via final comum onde são executados os mecanismos das respostas defensivas (Adams, 1979; Fanselow, 1991; Sudré *et al.*, 1993). A estimulação química ou elétrica de algumas estruturas localizadas mais rostralmente, como a amígdala ou o hipotálamo medial, podem induzir reações de defesa (Graeff, 1994), as quais são permanentemente abolidas depois de lesões na SCP (Hunsperger, 1963). O inverso não é verdadeiro, pois nem a ablação do telencélafo (Tomaz *et al.*, 1988) nem lesões no hipotálamo posterior ou medial (Hunsperger, 1963) bloquearam reações de defesa geradas pela estimulação da SCP. Lesões na SCP podem também abolir ou causar reduções dramáticas de comportamentos defensivos inatos (Blanchard *et al.*, 1981) ou aprendidos (LeDoux *et al.*, 1988). Esses achados foram reforçados pela descoberta da organização da SCP em colunas longitudinais, as quais são divididas em regiões anatômicas associadas a funções específicas desta estrutura (Carrive e Bandler, 1991). Como já visto na introdução, quatro principais

subdivisões da SCP são aceitas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral, cada uma delas formando uma coluna ao longo do seu eixo rostro-caudal (Bandler *et al.*, 1991).

Vários estudos têm sugerido que a porção dorsal (a qual inclui dorso-medial e dorso-lateral) da SCP faz parte de um substrato neural responsável pela elaboração de comportamentos defensivos (Graeff, 1981, 1984). Em humanos, emoções como medo, ansiedade, terror ou sentimento de morte iminente foram relatadas depois da estimulação da SCP (Nashold *et al.*, 1969; Young, 1989). Em animais, estudos demonstraram que respostas de medo evocadas pela estimulação da SCPd foram atenuadas com benzodiazepínicos e barbitúricos (Schenberg e Graeff, 1978; Brandão *et al.*, 1982; Clarke e File, 1982; Russo *et al.*, 1991; 1993), sugerindo uma relação desta estrutura com os comportamentos defensivos relacionados à ansiedade ao medo (Graeff, 1990, 1991, 1994).

Em nosso estudo, os efeitos das drogas microinjetadas na SCPdl associadas a injeções periféricas foram analisados de acordo com os comportamentos observados no LCE, um modelo animal de ansiedade já descrito na introdução.

Analisando os dados comportamentais obtidos do LCE, os resultados obtidos na etapa I mostraram que o estímulo tipo-ansiogênico do PTZ, caracterizado pela redução da %TBA e da %EBA, foi bloqueado em ratos que receberam microinjeção de lidocaína na porção caudal da SCPdl, mas não no CS, sugerindo uma participação seletiva desta região. É importante ressaltar que a microinjeção de anestésicos locais, como a lidocaína, é

um dos métodos mais utilizados para a inativação temporária e reversível de estruturas cerebrais, sem danos à estrutura-alvo (Malpeli, 1999). A lidocaína, um bloqueador dos canais de Na⁺, previne o início do potencial de ação em ambos, corpos celulares neuroniais e axônios (Malpeli e Schiller, 1979; Martin e Ghez, 1999) e sua microinjeção intracerebral pode ser utilizada para o estudo do envolvimento de estruturas específicas em determinadas situações (Lino-de-Oliveira, 2002; Teixeira, 2002; Bertoglio *et al.*, submetido). Sendo assim, a administração de lidocaína mostrou que a inativação da SCPdl, não afeta o comportamento dos animais que receberam salina, entretanto ela bloqueia o aparecimento do efeito ansiogênico em animais previamente tratados com PTZ. De maneira complementar, os resultados obtidos a partir da análise minuto-a-minuto mostram que, em animais controle expostos ao teste, há uma diminuição da atividade nos braços abertos do LCE, a qual é gradual e ocorre ao longo dos cinco minutos de exposição, sugerindo uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Lamprea *et al.*, 2000; Bertoglio e Carobrez, 2002; Teixeira, 2002). Da mesma maneira, a inativação temporária da SCPdl com lidocaína, não prejudicou a aquisição da resposta de esquiva ao longo da exposição ao LCE, havendo assim uma redução da exploração aos braços abertos nos grupos pré-tratados com salina. O grupo tratado com PTZ-líquor, entretanto, mostra um perfil minuto-a-minuto diferente: logo no primeiro minuto os animais apresentam uma esquiva aumentada aos braços abertos do

LCE, quando comparado ao grupo controle, permanecendo desta forma durante toda a exposição. A administração de lidocaína intra-SCPdl, entretanto, reverte este perfil uma vez que esses animais permanecem mais tempo nos braços abertos do que aqueles tratados com líquor.

Esses resultados sugerem que a integridade da SCPdl é essencial para a expressão do efeito tipo-ansiógênico do PTZ e reforçam a idéia de que a estrutura tem um papel importante na organização de respostas defensivas (Fanselow, 1991). Esses resultados estão de acordo com estudos que mostram que a administração sistêmica de compostos ansiógênicos causam um aumento significativo no número de células que expressam Fos no hipotálamo, na amígdala (Singewald *et al.*, 2003) e na SCPdl, regiões fortemente implicadas nas respostas emocionais e autonômicas frente a estímulos de medo e ansiedade (Singewald e Sharp, 2000).

Contudo, uma desvantagem da utilização da lidocaína como anestésico local é que ela previne o início do potencial de ação tanto em corpos celulares neuroniais quanto em axônios (Malpeli e Schiller, 1979; Martin e Ghez, 1999), impedindo desta forma uma avaliação mais profunda da participação dos neurônios presentes na SCPdl. Com base nesse fato, nas etapas posteriores procuramos utilizar drogas mais seletivas para avaliar a neurotransmissão excitatória (GLU) e a inibitória (GABA) que predominam nesta região do cérebro.

O PTZ é um antagonista do receptor GABA_A que age no sítio da picrotoxina (Ramamjaneyulu and Ticku, 1984; Squires *et al.*,

1984; Huang *et al.*, 2001) e seu efeito resume-se à redução da neurotransmissão mediada pelo GABA (Corda *et al.*, 1992).

Apesar de ser conhecida por ser uma droga convulsivante, estudos revelaram que em doses subconvulsivantes o PTZ possui propriedades ansiogênicas em humanos (Rodin, 1958; Rodin and Calhoun, 1970;) e em uma variedade de modelos animais (Lal and Emmett-Olglesby, 1983; File e Lister, 1984; File e Pellow, 1985; Pellow *et al.*, 1985; Corda *et al.*, 1992; Lopes-da-Silva *et al.*, 1996; De Souza *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002).

Os estímulos endógenos produzidos pelo PTZ são fisiologicamente similares aos sintomas da ansiedade, características pelas quais essa droga é utilizada em estudos comportamentais relacionados aos estados de ansiedade (Harris *et al.*, 1989). A reversão desses estímulos endógenos de caráter ansiogênico é obtida com o uso de drogas ansiolíticas que atuam por mecanismos GABAérgicos (Wilson e Bennett, 1989).

Em adição, estudos prévios demonstraram que o GABA está presente em toda a extensão rostro-caudal da coluna dorsolateral da SCP (Barbaresi e Manfrini, 1988; Reichling e Basbaum, 1990; Williams e Beitz, 1990; Beitz, 1995; Lovick e Paul, 1999; Griffiths e Lovick, 2002).

Na segunda etapa experimental, avaliamos os efeitos da microinjeção de um agonista GABAérgico, o muscimol, no efeito tipo-ansiogênico do PTZ. Assim como a lidocaína, o muscimol é um agente que causa inativação reversível, porém mais seletivo, pois sua ação no receptor GABAérgico hiperpolariza

somente as membranas onde esse receptor está presente, prevenindo a geração do potencial de ação (Martin e Ghez, 1999). Além disso, sabe-se que o muscimol é um potente ligante dos receptores GABA_A neuroniais e gliais, muito mais do que o próprio GABA (Krogsgaard Larsen e Johnston, 1978) e, provavelmente por isso, possui um tempo de atuação mais prolongado do que o da lidocaína (Martin, 1991). Os resultados obtidos com a administração intra-SCPdl de muscimol na dose de 0,5 nmol estão de acordo com a literatura (Bovier *et al.*, 1982; Audi e Graeff, 1984; Graeff *et al.*, 1986) e mostram uma diminuição da aversão dos animais aos braços abertos, representada neste trabalho pelo aumento da %TBA e %EBA em ratos submetidos ao LCE, sugerindo um perfil tipo-ansiolítico induzido pela droga. A menor dose de muscimol (0,25 nmol), entretanto, não alterou os índices tradicionais de ansiedade e nem a atividade locomotora. Ambas as doses, contudo, foram capazes de bloquear o efeito ansiogênico produzido pelo PTZ administrado sistemicamente em ratos submetidos ao teste do LCE. Uma análise minuto-a-minuto do perfil de atividade nos braços abertos do LCE reforçam os dados da sessão total de 5 minutos pois, em ratos tratados previamente com salina, mostra um perfil ansiolítico do grupo tratado intra-SCPdl com muscimol 0,50 nmol, caracterizado por uma %TBA aumentada durante quase toda a sessão. Animais pré-tratados com PTZ IP que receberam muscimol intra-SCPdl, em ambas as doses, aumentaram a %TBA e a %EBA, quando comparados ao grupo que recebeu líquor. O grupo salina-líquor apresentou uma

diminuição da %TBA ao longo dos cinco minutos de exposição ao teste e retenção de esQUIVA no re-teste. Como relatado anteriormente, esses resultados concordam com dados da literatura que sugerem que o animal adquire um aumento gradativo da esQUIVA aos braços abertos durante a exposição ao teste e uma retenção da esQUIVA no re-teste, indicando que a experiência prévia no LCE aumenta o medo evocado numa segunda sessão neste modelo (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Lamprea *et al.*, 2000; Bertoglio e Carobrez, 2002; Teixeira, 2002).

Em conjunto, esses dados revelam que a administração de muscimol na SCPdl interfere no efeito tipo-ansiológico do PTZ, sugerindo que a ativação da estrutura se faz necessária para a expressão deste efeito. Embora estudos prévios tenham mostrado que uma única injeção sistêmica de PTZ, numa dose subconvulsivante, reduz em até 40 % a ligação de benzodiazepínicos ao seu sítio no receptor GABA_A, na região dorsolateral da SCP (Rocha *et al.*, 1996), nossos resultados sugerem que a função do sítio do GABA no receptor GABA_A não foi prejudicada, uma vez que a microinjeção de um agonista competitivo deste receptor impediu a expressão do efeito tipo-ansiológico do PTZ.

Na terceira etapa experimental do nosso estudo, passamos a avaliar o papel dos receptores NMDA presentes na SCPdl na mediação do efeito tipo-ansiológico do PTZ IP. Foi verificado que a microinjeção de AP5 na SCPdl causou um aumento dos índices de ansiedade, somente na dose maior (6,0 nmol),

sugerindo um efeito tipo-ansiolítico da droga. Esses dados concordam com relatos da literatura que mostram que antagonistas do receptor NMDA injetados sistemicamente ou intra-SCPdl diminuem a aversão dos animais aos braços abertos do LCE (Schmitt *et al.*, 1990; Guimarães *et al.*, 1991; Russo *et al.*, 1993; Matheus *et al.*, 1994; Teixeira e Carobrez, 1999; Molchanov e Guimarães, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2003). Assim como nas etapas anteriores, a análise temporal dos dados mostrou que o grupo controle adquiriu a esQUIVA ao longo dos cinco minutos do teste, e apresentou a retenção desta esQUIVA no re-teste. Da mesma forma, os grupos tratados apresentaram uma curva de aquisição de esQUIVA semelhante ao grupo controle. O grupo PTZ-líquor, como mencionado anteriormente, apresenta uma esQUIVA aumentada desde o primeiro minuto, permanecendo desta forma até o final da exposição. Nesta etapa experimental, porém, quando este mesmo grupo foi submetido ao re-teste, observou-se que ele não reteve a resposta de esQUIVA. Estes resultados corroboram nossos dados anteriores (Bertoglio e Carobrez, 2000) que mostram que os animais necessitam de uma experiência prévia em todo o LCE para adquirirem esQUIVA aos braços abertos do modelo. Como esses animais permaneceram praticamente todo o tempo da primeira exposição nos braços fechados do LCE, sugerimos que estes animais não tiveram experiência suficiente nos braços abertos do LCE.

Os resultados referentes a microinjeção de AP5 estão de acordo com estudos que revelam a presença expressiva de

receptores NMDA em toda extensão da coluna dorso-lateral da SCP (Albin *et al.*, 1990; Beitz, 1995), e que eles estariam envolvidos na mediação de comportamentos defensivos (Teixeira, 2002; Molchanov e Guimarães, 2002). É importante ressaltar que o bloqueio da neurotransmissão excitatória não necessariamente produz inativação. A inativação depende da ausência de múltiplos determinantes de excitação na área determinada (ex: receptores NMDA e não-NMDA), as quais não podem ser sempre controladas (Martin e Ghez, 1999).

A administração de AP5 na dose de 3,0 nmol não alterou a % TBA e a %EBA quando comparado com o controle. Ambas as doses de AP5, entretanto, impediram o aparecimento do efeito tipo-ansiolítico característico do PTZ. Estes dados sugerem que o efeito tipo-ansiolítico do PTZ poderia ser resultante de um desequilíbrio entre a atividade GABAérgica e glutamatérgica, pois quando bloqueamos os dois sistemas com PTZ e AP5, respectivamente, o animal se comporta semelhante ao controle; além disso, esses resultados também sugerem que uma atividade aumentada dos receptores NMDA na SCPdl é necessária para o aparecimento do efeito ansiolítico induzido pela administração sistêmica de PTZ. Isto está de acordo com estudos anteriores do nosso laboratório, onde microinjeções do antagonista competitivo do sítio do receptor de glicina na SCPd aboliram os efeitos ansiolíticos do PTZ aplicado (De-Souza *et al.*, 1997). Em adição, há relatos da redução dos efeitos convulsivantes do PTZ após administração de AP7 e MK-801, antagonistas do receptor NMDA (Czuczawar e Meldrum, 1982).

Em contraste aos nossos resultados, Stephens e colaboradores (1986) mostraram que, embora a administração de AP-7, outro antagonista competitivo do receptor NMDA, tenha mostrado efeito tipo-ansiolítico em camundongos submetidos ao LCE, ele não antagonizou os efeitos do PTZ em camundongos submetidos ao modelo do estímulo discriminativo. Uma hipótese para explicar essa contradição poderia ser baseada nos diferentes modelos utilizados. Enquanto utilizamos um modelo que envolve comportamento incondicionado, o LCE, Stephens e colaboradores utilizaram o modelo discriminativo induzido pelo PTZ, o qual baseia-se no comportamento condicionado. Assim, modelos comportamentais incondicionados e condicionados de ansiedade poderiam estar relacionados a diferentes mecanismos centrais.

Nossos estudos reforçam que o sistema glutamatérgico, via modulação dos receptores NMDA, está implicado no comportamento tipo-ansiedade em ratos. Tem sido mostrado que o NO atua como um mensageiro retrógrado que aumenta a liberação pré-sináptica de glutamato (Montague *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2000). A ativação dos receptores NMDA induzem a produção de NO via NOS neuronal (Garthwaith *et al.*, 1988). Os substratos neurais relacionados à ansiedade e comportamento defensivo, como a SCPdl, são ricos em neurônios sintetizantes de NO (Vincent e Kimura, 1992; De-Oliveira *et al.*, 2000), e a administração sistêmica ou intra-SCPdl de inibidores da NOS produzem efeito tipo-ansiolítico (Guimarães *et al.*, 1994; De-Oliveira *et al.*, 1997; Eroglu and Caglayan, 1997; Faria *et al.*, 1997; Volke *et*

al., 1997; Dunn *et al.*, 1998; Yildiz *et al.*, 2000). Em adição, estudos mais recentes sugerem que o NO participaria da modulação de respostas defensivas induzidas pela SCPdl (para revisão ver De-Oliveira *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2004).

Estudos revelaram que a administração sistêmica de um inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME, inibiu os efeitos convulsivantes induzidos pelo PTZ (Kaputlu e Uzbay, 1997). Entretanto, esta mesma droga, assim como outros inibidores da NOS, não foram capazes de inibir o efeito tipo-ansiolítico do PTZ em ratos submetidos ao modelo de estímulo discriminativo, sugerindo que, neste modelo, os efeitos do PTZ não são mediados por mecanismos relacionados ao NO (Uzbay e Lal, 2002). Nesse sentido, estudos preliminares obtidos em nosso laboratório revelaram que o efeito tipo-ansiolítico do PTZ não é revertido pela microinjeção de L-NAME na SCPdl de ratos submetidos ao LCE. Estes dados, porém, não excluem a possibilidade dos mecanismos associados ao NO estarem relacionados ao efeito ansiolítico induzido pelo PTZ em ratos. Assim sendo, estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos que correlacionam a SCPdl e comportamentos defensivos com o sistema de neurotransmissão mediado pelo NO.

Em resumo, nossos resultados reforçam a hipótese de que a SCPdl está realmente envolvida com a expressão da ansiedade, uma vez que a administração de drogas como anestésicos locais e antagonista do receptor NMDA na estrutura bloqueiam o efeito tipo-ansiolítico do PTZ administrado IP.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com este trabalho podemos concluir que:

- a redução da atividade nos braços abertos observada em ratos tratados com PTZ sistêmico confirma o efeito tipo-ansiolítico desta droga;
- a lidocaína injetada na SCPdl, mas não no colículo superior, bloqueou o efeito tipo-ansiolítico do PTZ demonstrando que essa estrutura é chave no efeito ansio-seletivo do PTZ;
- os resultados sugerem que os neurotransmissores GABA e GLU presentes na SCPdl parecem mediar a expressão do efeito tipo-ansiolítico do PTZ, uma vez que o aumento da atividade GABAérgica ou a redução da atividade glutamatérgica bloquearam o efeito do PTZ sistêmico;
- os resultados obtidos a partir do protocolo teste/re-teste sugerem que a SCPdl estaria envolvida na mediação da expressão do efeito ansiolítico do PTZ, porém não estaria relacionada à aquisição de aprendizado.

Adamec R (2001). Does long term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress? - Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress. *Behav Brain Res* 120(2):111-135.

Adams DB (1979). Brain mechanisms for offense, defense and submission. *Behav Brain Sci* 2:201-241.

Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure IV LS, Penney JB Young AB (1990). Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci Lett* 118:112-115.

Aley KO, Levine JD (2002). Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 111(2):389-97.

Audi EA, Graeff FG (1984). Benzodiazepine receptors in the periaqueductal gray mediate antiaversive drug action. *Eur J Pharmacol* 103:279-285.

Bandler R (1988). Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for midbrain periaqueductal gray region. *Prog Psychobiol Physiol Psychol* 13:67-222.

Bandler R, Prineas S, McCulloch T (1985). Further localization of midbrain neurones mediating the defence reaction in the cat by microinjections of excitatory amino acids. *Neurosci Lett* 56:311-316.

Bandler R, Shipley MY (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 17(9):379-389.

Bandler R, Depaulis A (1991). Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, p.175-198.

Bandler R, Carrive P, Zang SP (1991). Integration of somatic in the autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: vicerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res* 87:269-305.

Bandler R, Carrive P, Depaulis A (1991a). Introduction - Emerging principles of organizations of the midbrain periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, p.1-8.

Bandler R, Keay KA (1996). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. In: Holstege G, Bandler R Saper CB (eds). *Progress in Brain Research*, Vol. 107, Chapter 17. Amsterdam: Elsevier Science, p.285-300.

Barbaresi P, Manfrini E (1988). Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons and terminals in the periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 27:183-191.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Möhler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998). International Union of Pharmacology: XV. Subtypes of Gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.

Basile AS, Lippa AS, Skolnick P (2004). Anxiolytic anxiolytics: can less be more? *Eur J Pharmacol* 500:441-451.

- Beart PM, Nicolopoulos LS, West DC, Headley PM (1988). An excitatory amino acid projection from ventromedial hypothalamus to periaqueductal gray in the rat: autoradiographic and electrophysiological evidence. *Neurosci Lett* 85:205-211.
- Beckett SR, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA (1997). Central c-fos expression following 20khz/ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Brain Res Bull* 42(6):421-426.
- Behbehani MM (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46:575-605.
- Beitz AJ (1985). The midbrain periaqueductal gray in the rat I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J Comp Neurol* 237:445-459.
- Beitz AJ, Shepard RD (1985). The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A golgi analysis. *J Comp Neurol* 237:460-475.
- Beitz AJ (1982). The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rats. *Neuroscience* 7:133-159.
- Beitz AJ (1995). Periaqueductal gray. In: Paxinos G (ed). *The rat nervous system*. Second edition. San Diego: Academic Press, p.173-182.
- Bennett DA, Amrick CL (1987). Antagonists at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In: *Excitatory amino acid transmission*. New York, p.213-216.
- Bergink V, Van Megen HJGM, Westenberg GM (2004). Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharm* 14:175-183.
- Bertoglio LJ (2004). Caracterização do efeito ansiolítico de drogas em ratos pré-expostos no labirinto em cruz elevado (tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res* 108(2):197-203.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2002). Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav Brain res* 132:135-143.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2003). Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptors ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharmacology* 170(4):335-342.
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Carobrez AP, Veniegas R, Rodgers RJ, Sheperd JK (1992). MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychopharmacology* 108:352-362.
- Blanchard DC, Williams G, Lee EMC & Blanchard RJ (1981). Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiological Psychology* 9: 157-163.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-9.
- Bormann J (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptors subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.

- Bovier P, Broekkamp CLE, Lloyd KG (1982). Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. *Brain Res* 248:313-320.
- Bowery NG, Hill DR, Hudson Al, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, Turnbull MJ (1980). (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by action at a novel receptor. *Nature* 283:92.
- Brandão ML, Aguiar JC, Graeff FG (1982). GABA mediation of antiaversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav* 16:397-402.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araújo JE, Castilho VM (1999). Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Ver* 23(6):863-75.
- Brandão ML, Fontes JC, Graeff FG (1980). Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 13(1):1-4.
- Brandão ML, Vianna DM, Masson S, Santos J (2003). Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr* 25(2):36-41.
- Cameron AA, Khan IA, Westlund KN, cliffier KD, Willis D (1995). The efferent projections of periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. *J Comp Neurol* 351(4):568-584.
- Campeau S, Falls WA, Cullinan WE, Helmreich DL, Davis M Watson SJ (1997). Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. *Neuroscience* 78(4):1087-1104.
- Canteras NS, Goto M (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10(2):10089-10093.
- Canteras NS, Swanson LW (1992). The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of mammillary body. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21):10089-10093.
- Carobrez AP (1987). Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In: Brandão ML (Ed.) *Neuroscience and Behavior*. Vitória: UFES, 21-29.
- Carobrez AP (2003). Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr* 25(2):52-58.
- Carobrez AP, Schenberg LC, Graeff FG (1983). Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol Behav* 31(4):439-444.
- Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG (2001). Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):697-709.
- Carrive P (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27-47.
- Carrive P, Schmitt P, Karli P (1986). Flight induced by microinjection of D-tubocurarine or (-)bungarotoxin into the medial hypothalamus or periaqueductal gray matter: cholinergic or GABAergic mediation? *Behav Brain Res* 22:233-248.
- Chebib M, Johnston GAR (1999). The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940.

- Chen S, Aston-Jones G (1996). Extensive projections from the midbrain periaqueductal gray to the caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience* 71(2):443-459.
- Cherubini E, Conti F (2001). Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* 24:155-162.
- Clarke A, File SE (1982). Effects of ACTH, benzodiazepines and 5-HT antagonists on escape from periaqueductal grey stimulation in the rat. *Biol Psychiatry* 6:27-35.
- Collingridge GL, Lester RAJ (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 40:143-210.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS (2003). Predatory hunting and exposure to a live predator induced opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res* 138(1): 17-28.
- Conti F, Barbaresi P, Fabri M (1988). Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivision in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 24:629-633.
- Corbet R, Dunn RRW (1991). Effects of HA-966 on conflict, social interaction, and plus-maze behaviors. *Drug Develop Res* 24:201-203.
- Corbet R, Dunn RRW (1993). Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus-maze behaviors. *Neuropharmacology* 32(5):461-466.
- Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Giorgi O (1992). Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *J Pharmacol Exp Ther* 262(2):792-800.
- Cotman CW, Monaghan DT (1988). Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11:61-80.
- Curtis DR, Phillips JW, Xxins JC (1959). Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183:611-612.
- Curtis DR, Phillips JW, Watkins JC (1960). The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol* 150:656-682.
- Czuczwar SJ, Meldrum B (1982). Protection against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Eur J Pharmacol* 83(3-4): 335-338.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797-7801
- Delorey TM, Olsen RW (1989). GABA and glycine. In: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P (eds). *Basic Neurochemistry*. 4ed. New York; Raven Press, p.389-399.
- DeFeudis Fv (1977). GABAergic in the vertebrate nervous system. *Prog Neurobiol* 9:123-145.
- DePaulis A; Vergner M (1986). Elicitation of intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjection of picrotoxin, a GABA antagonist, into the midbrain periaqueductal gray matter. *Bray Res* 367:87-95.
- De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow S (1998). Distinct regions of periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 18(9):3426-3432.

De Oliveira CL, Del Bel EA, Guimarães FS (1997). Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 56(1):55-9.

De Oliveira RW, Del Bel EA, Guimaraes FS (2001). Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):679-85.

De-Oliveira RW, Del Bel EA, Mamede-Rosa ML, Padova CM, Deakin JF, Guimarães FS (2000). Behavioral c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 51:457-464.

De-Souza MM, Schenberg LC, Carobrez AP (1997). NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav Brain Res* 90:157-165.

Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001). 'When a rat smells a cat': the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104(4):1085-1097.

Dinglendorff R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channel. *Pharmacol Rev* 51(1):7-61.

Doble A (1999). New insights into the mechanism of action of hypnotics. *J Psychopharmacology* 13(1): 11-20.

Drew CA, Johnston GAR, Weatherby RP (1984). Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding (-) baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett* 52:317-321.

Dunn RW, Corbett R, Fielding S (1989). Effects of 5-HT1A receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 169(1):1-10.

Dunn RW, Reed TA, Copeland PD, Frye CA (1998). The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology* 37(7):899-904.

Eisenberg E, Pud D (1998). Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine? *Pain* 74:337-339.

Endler JA (1986). Defence against predators. In: *Predatory-prey relationships*. University of Chicago Press, Chicago, p.109-134.

Enz R, Cutting GR (1998). Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38:1431-1441.

Eroglu L, Caglayan B (1997). Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol Res* 36(5):381-5.

Faria MS, Muscara MN, Moreno Junior H, Teixeira SA, Dias HB, De Oliveira B, Graeff FG, De Nucci G (1997). Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol* 323(1):37-43.

Fendt M (1998). Different regions of the periaqueductal grey are involved differently in the expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle. *Eur J Neurosci* 10:3876-3884.

Fernandez De Molina A, Hunsperger RW (1959). Central representation of affective reaction in forebrain and brainstem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *J Physiol* 145:251-265.

Fernandez De Molina A, Hunsperger RW (1962). Organization of the subcortical system defense and flight in the cat. *J Physiol (London)* 160:200-213.

File SE (1992). Behavioral detection of anxiolytic action In: *Experimental Approches to Anxiety and Depression*, Wiley, Manchester, p.25-44.

File SE, Andrews N, Hogg S (1996). New developments in animal tests of anxiety. In: Westenberg HGM, Den Boer JA, Murphy DL (eds). *Advances in Neurobiology of anxiety Disorders*. Chichester, UK, Wiley, p.61-69.

File SE, Lister RG (1984). Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? *Neuropharmacology* 23(7A):793-796.

File SE, Pellow S (1985). Does the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 reverse the action of picrotoxin and pentylentetrazole on social and exploratory behaviour?. *Arch Int Pharmacodyn* 277(2):272-279.

File SE, Zangrossi H Jr (1993). "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 110(1-2):240-244.

Garthwaite J, Boulton CL (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.

Garthwaite J, Grathwaite G, Palmer RMJ, Moncada S (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413-416.

Goodchild AK, Dampney RAL, Bandler R (1982). A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of central nervous system. *J Neurosci Meth* 6:351-363.

Graeff FG (1981). Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res* 14:239-265.

Graeff FG (1990). Brain defense system in anxiety. In: Roth M, Burrowas GD, Noyes E (eds). *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier, v.3, p.307-354.

Graeff FG (1991). Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal model of panic anxiety. In: Briley M, File SE (eds). *New Concepts in anxiety*. London: Macmillan, p.288-312.

Graeff FG (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 27(4):811-829.

Graeff FG, Brandão ML, Audi EA, Schutz MTB (1986). Modulation of the rat brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanism. *Behav Brain Res* 21:65-72.

Graeff FG, Carobrez AP, Silveira MCL (1988) Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Cavalheiro EA, Lehmann J, Turski L (eds). *Neurology and neurobiology*, vol 46. *Frontiers in excitatory amino acids research*. New York: Liss, p.325-332.

Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res* 58(1-2):123-31.

Griebel G (1995). 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 65(3): 319-395.

- Griffiths JL, Lovick TA (2002). Co-localization of 5-HT_{2A}-receptor- and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett* 326:151-154.
- Guimarães FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG (1991). Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103 (1):91-94.
- Guimarães FS, De-Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G (1994). Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Neuroreport* 5:1929-1932.
- Haefely WE, Martin JR, Richards JG, Schoch P (1993). The multiplicity of actions of benzodiazepines receptor ligands. *Can J Psychiat* 38(4): 102-107.
- Hamilton BL (1973). Citoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. *J Comp Neurol* 149:1-28.
- Handley SL, McBlane JW (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Meth* 29:129-138.
- Handley SL, Mithani S (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:1-5.
- Harris EW, Emmett-Oglesby MW, Lal H (1989). Sensitivity of pentylentetrazole discrimination increased by a stimulus fading technique. *Psychopharmacology* 98(4):460-464.
- Hess WR, Brugger M (1943). Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1:33-52.
- Hill DR, Bowery NG (1981). 3H-Baclofen and 3H-GABA bind bicuculline-insensitive GABAB sites in the rat brain. *Nature* 290:149-52.
- Holmes A, Rodgers RJ (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 60(2):473-488.
- Hösli L, Hösli E (1978). Action and uptake of neurotransmitter in CNS tissue culture. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 81:135-188.
- Holstege G (1991). Descending pathways from the periaqueductal gray and adjacent areas. In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, p.239-265.
- Huang R, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH (2001). Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant (-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors: mechanisms and site action. *J Pharmacol Exp Therap* 298(3):986-995.
- Hunsperger RW (1956). Affektreaktionen auf elektrische reizung in hirnstamm der katze. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 14:70-92.
- Hunsperger RW (1963). Affective behavior patterns elicited by electrical stimulation of the brain stem and forebrain. *J Physiol* 55:45-98.
- Jansen ASP, Farkas E, Mac Sams J, Loewy AD (1998). Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res* 784:329-336.
- Johnston GAR (1978). Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 18:269-289.

- Jung ME, Depoortere R, Oglesby MW (2001). Use of negatively reinforcing electrical brain stimulation to detect conventional and nonconventional anxiolytics as well as an anxiogenic drug. *Pharmacol Biochem Behav* 68:33-42.
- Jung ME, Lal H, Gatch MB (2002). The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazole as a model of anxiety: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 26:429-439.
- Kaputlu I, Uzbay T (1997). L-NAME inhibits pentylenetetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res* 753(1):98-101.
- Kehne JH, McCloskey TC, Baron BM, Chi EM, Harrison BL, Whitten JP, Palfreyman MG (1991). NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. *Eur J Pharmacol Sci* 193:283-292.
- Kemp JA, Leeson PD (1993). The glycine site of the NMDA receptor - five years on. *Trends Pharmacol Sci* 14:20-25.
- Korpi ER, Grundner G, Lüddens H (2002a). Drug interaction at GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 67:113-159.
- Korpi ER, Mihalck RM, Sinkkonen ST, Hauer B, Hevrs W, Homanics GE, Sieghart W, Lüddens H (2002b). Altered receptor subtypes in the forebrain of GABAA receptor delta subunit-deficient mice: recruitment of gamma 2 subunits. *Neuroscience* 109:733-743.
- Kotlinska J, Liljequist S (1998). The putative AMPA receptor antagonist, LY32632, produces anxiolytic-like effects without altering locomotor activity in rats (*Pharmacol Biochem Behav* 60(1):119-124).
- Krieger JE, Graeff FG (1985). Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Braz J Med Biol Res* 18:61-67.
- Krieger MS, Conrad LCA, Pfaff DW. An autoradiographic study of the efferent projections of ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 183:785-816.
- Krnjevic K (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol Rev* 54:418-540.
- Krogsgaard-Larsen P, Johnston GAR (1978). Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds. *J Neurochem* 30:1377-1382.
- Laemle LK (1977). Neuronal populations of the periaqueductal gray, nucleus lateralis. *J Comp Neurol* 186:93-108.
- Lal H, Emmett-Oglesby MW (1983). Behavioral analogues of anxiety. *Neuropharmacology* 22:1423-1441.
- Lamprea MR, Cardenas FP, Silveira R, Morato S, Walsh TJ (2000). Dissociation of memory and anxiety in repeated elevated-plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanism. *Behav Brain Res* 117:97-105.
- LeDoux JE, Iwata J, Cichetti P & Reis DJ (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *Journal of Neuroscience* 8: 2517-2529.
- Lee C, Rodgers RJ (1990). Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology* 102(4):507-513.
- Leeson PD (1993). Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: *Drug Design for Neuroscience*. New York: Raven Press, p.339-381.

- Leeson PD, Iversen LL (1994). The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J Med Chem* Vol 37 no 24.
- Lino-de-Oliveira C, De Lima TC, Carobrez AP (2002). Dorsal periaqueductal gray matter inhibits passive coping strategy elicited by forced swimming stress in rats. *Neurosci Lett* 335(2):87-90.
- Lin HC, Hang BH, Wan FJ, Huang ST, Tseng CJ (2000). Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarius of rats. *Eur J Pharmacol* 407:83-89.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330(9):613-622.
- Lonstein JS, Stern JM (1997). Somatosensory contributions to c-fos activation within the caudal periaqueductal gray of lactating rats: effects of perioral, rooting and suckling stimuli from pups. *Horm Behav* 32(3): 155-166.
- Lovick TA, Paul NL (1999). Co-localization of GABA with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurones in the dorsolateral periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett* 272:167-170.
- Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130:567-580.
- Maes M, Debaecker G, Suy E, Minner B (1995). Increased plasma serine concentrations in depression. *Neuropsychobiology* 31:10-15.
- Malpeli JG (1999). Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Meth.* 86(2): 119-128.
- Malpeli JG, Schiller PH (1979). A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. *J Neurosci Meth* 1(2):143-151.
- Martin JH, Ghez C (1999). Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *J Neurosci Meth* 86(2):145-159.
- McKernan RM, Whiting PJ (1996). Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosc* 19(4):139-143.
- Mantyh PW (1982). The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a Nissl, Weil, and a Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204:349-363.
- Mantyh PW (1982a). Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observation in the cat and rat. *J Comp Neurol* 206:146-158.
- Marek P, Beneliyahu S, Gold M, Liebeskind JC (1991). Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res* 547:77-81.
- Matheus MG, Nogueira RL, Carobrez AP, Graeff FG, Guimarães FS (1994). Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey of the cat. *Psychopharmacology* 113(3-4):565-569.
- McCulloch J (1992). Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. *Br J Clin Pharmacol* 34:106-114.
- McGeer PL, McGeer EG (1989). Amino acid neurotransmitter. In: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P (eds). *Basic Neurochemistry*. 4ed. New York: Raven Press, p.311-332.

- Meldrum BS (1985). Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clin. Sci.* 68:113-122.
- Meldrum BS (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130:1007S-1015S.
- Meller ST, Dennis BJ. Afferent projections to the periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience* 9(3):927-964.
- Menard J, Treit D (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23(4): 591-613.
- Mehta AK, Ticku MK (1999). An update on GABAA receptors. *Brain Res Rev* 29:196-217.
- Millan MJ (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70:83-244.
- Miranda-Paiva CM, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS, Felício LF (2003). A role for periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour. *Eur J Neurosci* 18(3):667-674.
- Mody I (2001). Distinguishing between GABAA receptors responsible for tonic and phasic conductance. *Neurochem Res* 26:907-913.
- Molchanov ML, Guimarães FS (2002). Anxiolytic-like effect of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160(1):30-38.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989). The excitatory amino acids receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263:973-977.
- Montgomery KC (1955). The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J Comp Neurol* 48:254-260.
- Moreira FA, Molchanov ML, Guimarães FS (2004). Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 171:199-203.
- Morris RGM (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9:3040-3057.
- Murphy AZ, Shupnik MA, Hoffman GE (1999). Androgen and estrogen (alpha) receptor distribution in the periaqueductal gray of the male rat. *Horm Behav* 36(2):98-108.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969). Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30:14-24.
- Nauta WJH (1958). Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat brain. *Brain* 81:319-340.
- Nelovkov A, Philips MA, Köks S, Vasar E (2003). Rats with exploratory activity in the elevated plus-maze have the increased expression of limbic system-associated membrane protein gene in the periaqueductal grey. *Neurosci Lett* 352:179-182.

- Omori N, Ishimoto T, Mutoh F, Chiba S (2001). Kindling of the midbrain periaqueductal gray in rats. *Brain Res* 903:162-167.
- Pandossio JE, Brandao ML (1999). Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. *Psychopharmacology* 142(4):360-8.
- Parsons CG (2001). NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429(1-3):71-8.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, fourth edition. San Diego: Academic Press.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14:149-167.
- Pessatti TLP (1999). Efeito da injeção de AP5 na substância cinzenta periaqueductal dorsal em ratos submetidos ao labirinto em T-elevado (dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.
- Prichard SM, Beitz AJ (1980). A Golgi analysis of the rodent periaqueductal gray. *Neuroscience Abs* 6:429.
- Ramamjaneyulu R, Ticku MH (1984). Interactions of pentylenetetrazole and tetrazole analogues with picrotoxin site of the benzodiazepine-GABA receptor-inophore complex. *Eur J Pharmacol* 78:353-356.
- Ranck Jr JB (1975). Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res* 98(3):417-440.
- Reichling DB, Basbaum AI (1990). Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending nociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol* 302:370-377.
- Redgrave P, Dean P (1991). Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, p.199-209.
- Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT (1991). Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol* 303(1):121-131.
- Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT (1992). Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: a WGA-HRP and PHA-L study. *J Comp Neurol* 315(1):1-15.
- Rocha L, Ackermann RF, Engel Jr J (1996). Chronic and single administration of pentylenetetrazole modifies benzodiazepine receptor-binding: autoradiographic study. *Epilep Res* 24:65-72.
- Rodin EA (1958). Metrazol tolerance in a 'normal' and volunteer population. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10:433-446.
- Rodin EA, Calhoun HD (1970). Metrazol in a 'normal' volunteer population. *J Nerv Ment Dis* 150:438-450.
- Rodgers RJ (1997). Animal models of 'anxiety': where the next? *Behav Pharmacol* 8:477-496.
- Rodgers RJ, Cole FC (1994). The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA (eds). *Ethology and Psychopharmacology*. New York: Wiley, p.9-44.

- Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF (1999). Corticosterone response to the elevated plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 68(1-2):47-53.
- Rodgers RJ, Johnson NJT, Cole JC, Dewa CV, Kidd GR, Kimpson PH (1996). Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 54:41-50.
- Rossetti ZL, Carboni S (1995). Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 283:177-183.
- Rudolph U, Crestani F, Mohler H (2001). GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 22: 188-194.
- Russo AS, Guimarães FS, De-Auiar JC, Graeff FG (1991). Anxiolytic effect of midazolam microinjected into the dorsal periaqueductal grey area of rats. *Braz J Med Biol Res* 24(6):607-609.
- Russo AS, Guimarães FS, De-Auiar JC, Graeff FG (1993). Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray in anxiety. *Psychopharmacology* 110:198-202.
- Sandkuhler J, Herdegen T (1995). Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions. *J Comp Neurol* 357(4):546-553.
- Sanger DJ (1985). GABA and the behavioural effects of anxiolytic drugs. *Life Sci* 36:1503-1513.
- Shaikh MB, Siegel A (1990). GABA-mediated regulation of feline aggression elicited from midbrain periaqueductal gray. *Brain Res* 507(1):51-56.
- Scheel-Küger J, Petersen EN (1982). Anticonflict effect of the benzodiazepines mediated by a GABAergic mechanism in the amygdala. *Eur J Pharmacol* 82:115-116.
- Schenberg LC, Graeff FG (1978). Role of periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 9:287-295.
- Schenberg LC, Aguiar JC, Salgado HC, Graeff FG (1981). Depressant action of chlordiazepoxide on cardiovascular and respiratory changes induced by electrical stimulation of the brain. *Braz J med Biol Res* 14:69-72.
- Schenberg LC, Aguiar JC, Graeff FG (1983). GABA modulation of defense reaction induced by brain electrical stimulation. *Physiol Behav* 31:429-437.
- Schmitt ML, Coelho W, Lopes-de-Souza AS, Guimarães FS, Carobrez AP (1995). Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci Lett* 189:93-96.
- Schmitt ML, Graeff FG, Carobrez AP (1990). Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 23(8):677-679.
- Shepard RA (1986). Neurotransmitter, anxiety and benzodiazepines: a behavioral review. *Neurosci Biobehav Rev* 10:449-461.
- Shepard RA (1987). Behavioral effects of GABA agonist in relation to anxiety and benzodiazepines action. *Life Sci* 40:2429-2436.

- Silveira MC, Sandner G Graeff FG (1993). Induction of fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 56(1): 115-118.
- Singewald N, Salchner P, Sharp T (2003). Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol Psychiatry* 53(4):275-283.
- Singewald N, Sharp T (2000). Neuroanatomical targets fo anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience* 98(4): 759-770.
- Squire RF, Saederup E, Crawley JN, Skolnick P, Paul SM (1984). Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepines/picrotoxin receptor complex in brain. *Life Sci* 35:1439-1444.
- Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutzner M (1986). Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolity activity? *Psychopharmacology* 90(2):166-169.
- Sudre EC, de Barros MR, Sudre GN, Schenberg LC (1993). Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res* 58(1-2):141-54.
- Teixeira KV, Carobrez AP (1999). Effects of glycine or (()-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci* 113:196-203.
- Teixeira KV (2002). Participação dos receptores NMDA/GLYB da substância cinzenta periaqueductal dorsal na mediação do comportamento defensivo de ratos (tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Thomson AM (1990). Glycine is a coagonist at the NMDA receptor/channel complex. *Progr in Neurobiol* 35:53-74.
- Tomaz C, Brandao M, Bagri A, Carrive P, Schmitt P (1988). Flight behavior induced by microinjection of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 30(2):337-42.
- Treit D, Menard J, Royan C (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44(2):463-469.
- Trullas R, Jackson B, Skolnick P (1989). Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine insensitive glycine receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 34:313-316.
- Uzbay IT, Lal H (2002). Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester, 7-nitro indazole, and agmatine on pentylentetrazol-induced discriminative stimulus in Long-Evans rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26(3):567-73.
- Valverde-Navarro AA, Olucha FE, Garcia-Verdugo JM, Hernandez-Gil T, Ruiz-Torner A, Martinez-Soriano F (1996). Distribution of basal-expresses c-fos-like immunoreactive cells of the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroreport* 7(15-17):2749-2752.
- Vander-Horst VG, Schsfoort FC, Meijer E, Van Leeuwen FW, Holstege G (1998). Estrogen receptor-alpha-immunoreactive neurons in the periaqueductal gray of adult ovariectomized female cat. *Neurosci Lett* 240(1):13-16.
- Vianna DML, Brandão ML (2003). Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res* 36:557-566.

- Vincent SR, Kimura H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46(4):755-84.
- Volke V, Soosaar A, Koks S, Bourin M, Mannisto PT, Vasar E (1997). 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology* 131(4):399-405.
- Walker DL, Cassella JV, Lee Y, De lima TC, Davis M (1997). Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. *Neurosci Biobehav Rev* 21(6):743-753.
- Walker DL, Davis M (1997). Involvement of dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behav Neurosci* 111:692-702.
- Wenger GR (1980). Effects of phencyclidine and ketamine in pigeons on behavior suppressed by brief electrical shocks. *Pharmacol Biochem Behav* 12(6):865-870.
- Whetsell WO Jr (1996). Current concepts of excitotoxicity. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(1):1-13.
- Williams FG, Beitz AJ (1990). Ultrastructural morphometric analysis of GABA-immunoreactive terminals in the ventrocaudal periaqueductal gray: analysis of the relationship of GABA terminals and GABAA receptor to periaqueductal gray-raphe magnus projection neurons. *J Neurocytol* 19:686-696.
- Wilson DE, Bennett DA (1989). Pentylentetrazole discriminative stimuli are selective for identifying benzodiazepine receptor modulating agents. *Drug Dev Res* 17:237-243.
- Yamakura T, Shimoji K (1999). Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.
- Yildiz F, Ulak G, Erden BF, Gacar N (2000). Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 65(2):199-202.
- Young RF (1989). Brain and spinal stimulation: How and whom! *Clin Neurosurg* 35:429-447.
- Zarrindast MR, Rostami P, Sadeghi-Hariri M (2001). GABAA but not GABAB receptor stimulation induces antianxiety profiles in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 69:9-15.
- Zhang SP, Bandler R, Carrive P (1990). Flight and immobility evoked by excitatory aminoacid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. *Brain Res* 520(1-2):73-82.
-