

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ALTERAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO DO DIAZEPAM E ANSIOGÊNICO
DO PENTILENOTETRAZOL EM RATOS SUBMETIDOS À MANIPULAÇÃO DO
SISTEMA GLICINA/NMDA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL**

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

MÁRCIA MARIA DE SOUZA

Florianópolis

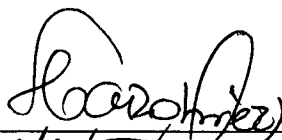
1995

**"ALTERAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO DO DIAZEPAM
E ANSIOGÊNICO DO PENTILENOTETRAZOL EM RATOS
SUBMETIDOS A MANIPULAÇÃO DO SISTEMA/NMDA NA
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL"**

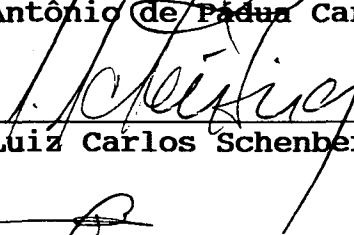
POR

MÁRCIA MARIA DE SOUZA

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. Antônio de Paula Carobrez



Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg



Prof.ª Dr.ª Thereza C.M. de Lima Nogueira

Florianópolis, março de 1995.

Subitamente, me dei conta de que aquela
pequena ervilha, bela e azul, era a Terra.
Estiquei meu polegar e fechei um olho.
E meu polegar tampou completamente o planeta
Terra.
Eu não me senti um gigante, mas muito, muito
pequeno.

Neil Armstrong

Aos meus pais pelo incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela orientação, pelo incentivo constante ao ensino e pesquisa nesses anos de orientação e convívio.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia em especial a profa. Gina Morato e prof. João B. Calixto pela contribuição à minha formação científica e pela amizade.

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria Especial de Farmacologia, especialmente ao Juarez, Josane, Sandra, Pedro e ao Sr. Amaro.

Ao Prof. Carlos Tomaz e funcionários do laboratório de psicobiologia da Universidade de Filosofia Ciências e letras da USP pelo auxílio em uma das etapas experimentais desse estudo

Aos colegas do curso, em especial ao Adair, Adriana, Jonny, Raquel, Cláudio e aos demais pela colaboração, amizade e companheirismo.

Minha gratidão especial aos meus pais e irmãs que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me.

Ao Todo-Poderoso, pois sem Ele nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Substância cinzenta periaquedutal	2
1.2 - Aminoácidos excitatórios	7
1.3 - Aminoácidos excitatórios na SCPD	13
1.4 - Sistema GABAérgico na SCPD	15
1.5 - Outros sistemas neuroquímicos da SCPD	18
1.6 - SCPD, reação de defesa e ansiedade	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 - Animais	24
3.2 - Cirurgia estereotáxica	24
3.3 - Cânulas	26
3.4 - Microinjeção intracerebral	26
3.5 - Teste comportamental	27
3.6 - Dispositivo de registro comportamental	28
3.7 - Protocolo experimental	29
3.8 - Histologia	30
3.9 - Análise estatística	31
3.10- Drogas e soluções	31
4 - AVALIAÇÃO DAS DROGAS GLUTAMATÉRGICAS SOBRE O EFEITO ANSIOLÍTICO DO DIAZEPAM	
4.1 - Introdução	33

4.2 - Resultados	37
4.3 - Discussão	42
5 - AVALIAÇÃO DAS DROGAS GLUTAMATÉRGICAS SOBRE O EFEITO ANSIOGÊNICO DO PENTILENOTETRAZOL	
5.1 - Introdução	45
5.2 - Resultados	47
5.3 - Discussão	50
6 - DISCUSSÃO GERAL	52
7 - CONCLUSÕES	68
ABSTRACT	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A - Localização dos sítios de microinjeções de drogas na SCPD, utilizadas no presente estudo	35
Figura 1B - Localização dos sítios de microinjeções de drogas na SCPD, utilizadas no presente estudo	36
Figura 2 - Efeito das drogas glutamatérgicas injetadas na SCPD sobre a ação ansiolítica do DZP em ratos submetidos ao LCE (FT,FEF, FEA,TEA)	39
Figura 3 - Efeito das drogas glutamatérgicas microinjetadas na SCPD sobre a ação ansiolítica do DZP em ratos submetidos ao LCE (FAE, FL, FAL)	40
Figura 4 - Efeito sedativo do DZP sobre os parâmetros comportamentais de ratos submetidos ao LCE	41
Figura 5 - Efeitos das drogas glutamatérgicas microinjetadas na SCPD sobre a ação ansiogênica do PTZ em ratos submetidos ao LCE (FT, FEF, FEA, TEA)	48
Figura 6 - Efeito das drogas glutamatérgicas microinjetadas na SCPD sobre a ação ansiogênica do PTZ em ratos submetidos ao LCE (FAE, FL, FAL)	49

LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AAE	Aminoácidos excitatórios
ACPD	1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato
AMPA	α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
ASP	Aspartato
AP ₅	Ácido-2-amino-fosfanopentonóico
DZ	Benzodiazepínicos
CPP	3-(2- carboxipiperazina - 4 yl) propilfosfanato
D-APV	D-2- amino 5 fosfonovalerato
DZP	Diazepam
FAE	Frequência de alongamentos exploratórios
FAL	Frequência de auto-limpezas
FEA	Frequência de entradas no aberto
FEF	Frequência de entradas no fechado
FL	Frequência de levantar
FT	Frequência de tentativas
GABA	Ácido gama-amino butírico
GAMP	D-aminociclopentano-1-3-dicarboxilato
GDEE	Dietil-ester-ácido glutâmico
GLI	Glicina
GLU	Glutamato
IC	Intracerebral
IP	Intraperitoneal
LA	Líquor artificial
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTP	Potencialização a longo prazo
ML	Médio lateral (parâmetro estereotáxico)
MK-801	Dizolcipina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	Pentilenotetrazol
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SCPD	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SNC	Sistema nervoso central
TPA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPF	Tempo de permanência nos braços fechados
7Cl-QUIN	ácido 7-cloro-quinurênico

RESUMO

Estruturas periventriculares tais como o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal desempenham um importante papel na indução de reações de fuga e defesa em várias espécies de animais. A parte dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPD) tem sido sugerida como uma região integrativa do neuroeixo envolvida na manutenção de estados motivacionais de animais. Tem sido mostrado que a microinjeção de drogas que, ou aumentam ou mimetizam a neurotransmissão inibitória do ácido gama-aminobutírico (GABA), dentre elas os ansiolíticos benzodiazepínicos, assim como drogas que facilitam a neurotransmissão serotoninérgica, na SCPD, diminuem as consequências aversivas da estimulação elétrica (EE) da SCPD. Portanto, os neurônios na SCPD que controlam a aversão, parecem estar sob modulação inibitória de GABA e 5-HT. Em contraste, aminoácidos excitatórios endógenos (AAE) podem desempenhar um papel mediatório, após a demonstração de vários antagonistas de EEA aplicados na SCPD, atenuam reações de defesa comportamentais e cardiovasculares eliciadas por EE ou da SCPD ou do hipotálamo medial. Recentemente, vários antagonistas de NMDA têm mostrado efeitos do tipo ansiolítico quando administrados periféricamente em diferentes modelos animais. Estes resultados sugerem que os receptores NMDA também desempenham um importante papel na modulação de reações aversivas ligadas a SCPD. Para investigar a possível influência glutamatérgica na SCPD em efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de drogas injetadas sistemicamente,

relacionadas com a neurotransmissão GABAérgica, foi utilizado do teste do labirinto em cruz elevado (LCE), em ratos previamente implantados com cânulas na SCPD. Injeções sistêmicas de PTZ (15 ou 30 mg/kg) ou DZP (0,375, 0,75, 1,5 e 3,0 mg/kg) seguidas (15 min) por uma microinjeção única (0,4 μ l) de líquido artificial (LA), 7Cl-QUIN (8 nmol) ou GLI (80 nmol). Em intervalos subseqüentes de 5 min, os animais foram colocados numa arena de madeira e no LCE. As medidas comportamentais compreenderam: frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (FEA, TPA, respectivamente); frequência de entradas nos braços fechados (FEF); frequência de alongamentos exploratórios (FAE); frequência de levantar (FL), frequência de auto-limpezas (NAL), e frequência de tentativas para entrar nos braços abertos (FT). Na primeira fase dos experimentos verificamos as ações de drogas glutamatérgicas (7Cl-QUIN e GLI) sobre os efeitos ansiolíticos do DZP. Observamos que o DZP na dose de 0,75 mg/kg, mostrou efeito ansiosseletivo nos seguintes parâmetros: FEA, TPA. Não foram observados efeitos significativos nos outros parâmetros. A microinjeção de GLI dentro da SCPD antagonizou o efeito ansiolítico de DZP, mostrado através da redução de FEA; o efeito sedativo induzido por DZP em doses superiores a 3,0 mg/kg não foi bloqueado pela GLI; isso sugere um papel glutamatérgico específico da SCPD somente para efeitos ansiolíticos, mas não para os efeitos sedativos do DZP. A microinjeção de 7Cl-QUIN na SCPD, deprimiu a performance dos animais no LCE reduzindo todos os parâmetros estudados. Na segunda fase dos experimentos, verificamos as ações das mesmas drogas glutamatérgicas sobre os efeitos ansiogênicos de

PTZ. Microinjeções de 7Cl-QUIN aumentaram significativamente a FEA, o TPA, a FAE e FAL quando comparados com o tratamento de LA, indicando que o tratamento com 7Cl-QUIN antagonizou os efeitos ansiogênicos do PTZ. Além disso, verificamos que a microinjeção de GLI manteve o padrão ansiogênico do PTZ, havendo inclusive uma potenciação desse efeito para a FT, a FEF, a FAE, e a FL. Nossos resultados confirmam a participação da SCPD na ansiedade, assim como sugerem uma interação dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico na modulação de mecanismos neuronais associados aos efeitos ansiosseletivos de drogas. Porém, experimentos adicionais serão necessários para o entendimento de como essa interação ocorre.

1 - INTRODUÇÃO

O advento da técnica de estereotaxia, a partir da década de 30, associado a metodologia de estimulação elétrica, permitiu o estudo mais detalhado de estruturas subcorticais, dentre elas a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Em 1939, com o objetivo de mapear o hipotálamo de gatos anestesiados, Ranson e Magoun mostraram que respostas mediadas pelo sistema nervoso simpático eram produzidas quando determinadas regiões cerebrais recebiam estimulação elétrica.

Respostas mais complexas e estereotipadas envolvendo comportamentos afetivos foram obtidas por Hess e Brugger (1943). Animais livres, com implante de eletrodos no hipotálamo e mesencéfalo, comportavam-se agressivamente como se estivessem enfrentando um predador, quando recebiam estimulação elétrica. Esse comportamento de raiva e agressividade era acompanhado por respostas autonômicas acentuadas, como piloereção, midríase e taquicardia.

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

1.1 - Substância cinzenta periaquedutal

A SCP é constituída por uma aglomeração de neurônios pequenos e médios que formam uma estrutura densa, circundando o aqueduto de Sylvius (Gerrits et al., 1993). Rostralmente ela é contínua com a região periventricular adjacente ao terceiro ventrículo. Na parte caudal ela se comunica intimamente com a matéria cinzenta que circunda o quarto ventrículo. Ventralmente limita-se com núcleos relacionados com o supraoculomotor (núcleos troclear, de Edinger-Westphal, de Darkschewitsch e o intersticial de Cajal) e dorsalmente com as camadas que compõem o teto mesencefálico (Bandler et al., 1991).

Vários esquemas têm sido propostos para dividir a SCP em subnúcleos baseados nas suas características citoarquitetônicas (Beitz, 1985; Laemle, 1977; Mantyh, 1982). Prichard e Beitz (1980) e Beitz (1982) sugerem que a SCP pode 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 de forma triangular, 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.

Recentemente, Carrive (1993) e Bandler et al. (1991) 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 pode ser subdividida de forma radial em cinco regiões distintas: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral e ventromedial, cada uma delas formando uma coluna longitudinal.

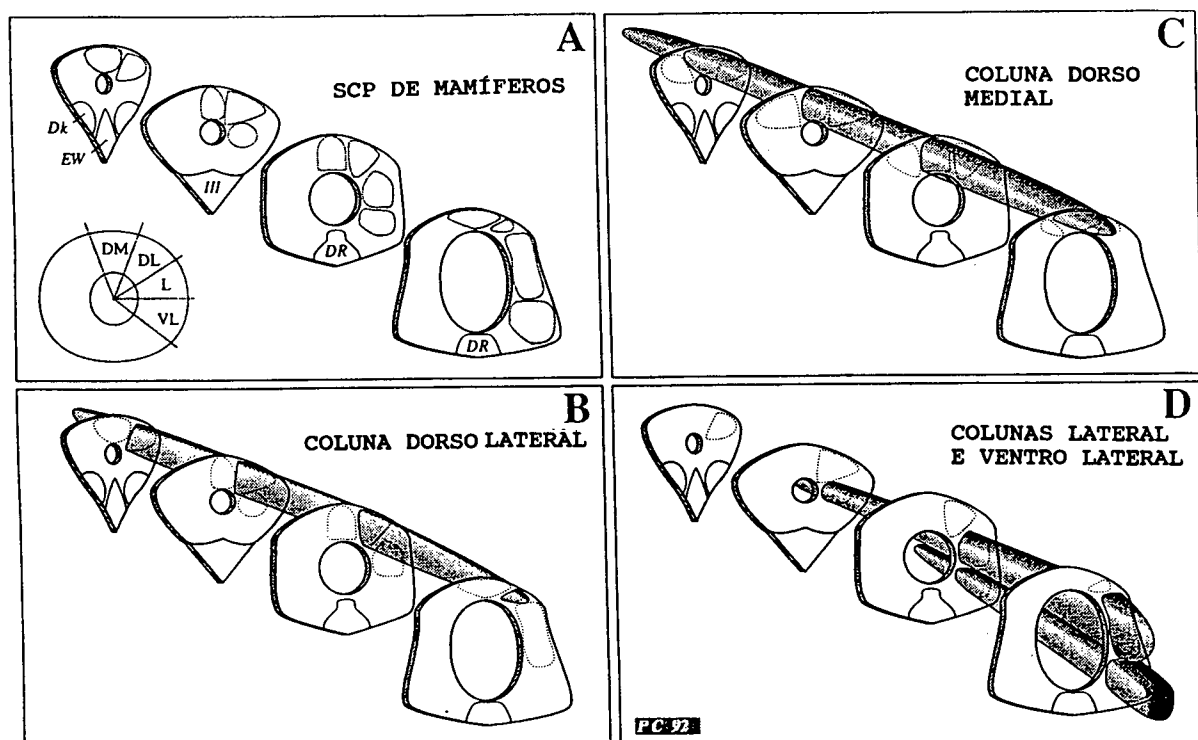


FIGURA 1- Organização colunar da SCP de mamíferos. A- divisão da SCP em 5 regiões distintas: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral e ventromedial, cada região formando uma coluna longitudinal. B- coluna dorsolateral. C- coluna dorsomedial. D- colunas lateral e ventrolateral. Abreviações: DK- Núcleo de Darkschewitsch; EW- Núcleo de Westphal- Edinger; DR- Núcleo dorsal da rafe; III- Núcleo oculomotor; DM- dorso medial; DL_ dorso lateral; L- lateral e VL- ventrolateral. Adaptado de Carrive (1993).

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

Vários estudos têm demonstrado que diferentes formas das reações emocionais são representadas em diferentes regiões da SCP. Por exemplo, a ativação de neurônios da parte rostral da coluna lateral da SCP de gatos evoca um comportamento de ameaça defensiva, enquanto a ativação de neurônios da parte caudal da coluna lateral promove fuga desorientada (Hilton e Redfern, 1986 Carrive, 1993). Estímulos aplicados nos sítios laterais, próximos ao aqueduto, eliciam a reação de fuga, ao passo que os estímulos aplicados nos sítios ventrolaterais induzem comportamentos caracterizados por uma diminuição da atividade espontânea e completa imobilidade (Zhang et al., 1990; Bandler et al., 1991). A distinção entre as regiões lateral e ventrolateral foi baseada nas observações fisiológicas e comportamentais. A ativação dos neurônios laterais aumentam a atividade simpática e somatomotora, enquanto a ativação dos neurônios ventrolaterais diminuem essas atividades (Zhang et al., 1990; Bandler et al., 1991; Carrive e Bandler, 1991).

A partir da década de 60, a SCP recebeu uma maior atenção pelo seu papel no mecanismo de analgesia. Desde a observação de que a estimulação elétrica dessa região em ratos produziu profunda analgesia (Reynolds, 1969), inúmeros laboratórios têm demonstrado que a SCP é um importante sítio para analgesia produzida por

estimulação elétrica (Richardson e Akil, 1977), bem como um sítio central para a ação antinociceptiva da morfina (Jacquet e Lajtha, 1976; Willis et al., 1988). Além disso, a SCP está envolvida em outras respostas associadas a comportamentos emocionais como: alterações cardiovasculares (Carrive et al., 1989; Castro e Schenberg, 1989; Carrive e Bandler, 1991; Verbene e Guyenet, 1992; Zhang et al., 1992; Keay e Bandler, 1993), vocalização (Jurgens e Pratt, 1989; Holstege, 1991), reações de " raiva" e controle do comportamento reprodutivo em ratos (Sakuma e Pfaff, 1979).

Os papéis desempenhados pela SCP nas funções descritas acima são dependentes das interconexões dessa estrutura cerebral com outras áreas do SNC (Beitz, 1982). Informações ascendentes e descendentes convergem para a SCP, que recebe estímulos diretos da medula espinhal e núcleo espinhal trigêmeo, o que sugere um papel no processamento de estímulos somatossensórios, provavelmente de natureza nociceptiva (Yeziarski, 1988).

A SCP está também conectada a uma série de estruturas cerebrais anteriores relacionadas com reações e estados emocionais, quais sejam: córtex límbico, amígdala e hipotálamo (Graeff, 1990; Shipley et al., 1991; Schenberg et al., 1991). Tais conexões anatômicas sugerem que a SCP pode ter um importante papel na regulação de estados emocionais, bem como no comportamento defensivo (Carrive, 1993).

Olds e Olds (1963), mapearam as propriedades reforçadoras de

estímulos elétricos intracranianos através da autoestimulação, ou seja, registraram as zonas a partir das quais a autoestimulação podia ser mantida (zonas reforçadoras positivas) ou não (zonas reforçadoras negativas). dentre estas últimas, haviam áreas cuja estimulação apresentava características tipicamente aversivas, isto é, os comportamentos operantes podiam ser reforçados pelo término da estimulação. Nesse trabalho ficou demonstrado que estruturas subcorticais, como a SCP e hipotálamo, possuíam vários sítios com caráter motivacional aversivo, sendo a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) exclusivamente aversiva.

Utilizando eletrodos cronicamente implantados na parte dorsal do mesencéfalo medial de pacientes neurocirúrgicos conscientes, para produção de lesões terapêuticas, Nashold et al. (1969, 1974) constataram que a estimulação elétrica da área próxima à borda lateral da SCP resultava em fortes reações emocionais. Sensações de medo e morte iminente foram produzidas, além de apresentação de respostas autonômicas tais como piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço. Essas manifestações claramente assemelham-se a um ataque de pânico característico, tal como é definido para humanos pela Associação Americana de Psiquiatria (DSM-III-R, 1989) (apud Graeff, 1993a).

Em ratos, a estimulação elétrica da SCPD, ou a microinjeção na mesma área de drogas que inibem as ações do ácido gamaaminobutírico (GABA), induzem o comportamento de congelamento

("freezing"), alternado por fuga " descontrolada" e saltos verticais (Brandão et al., 1982; Schmitt et al., 1985). Essa reação é conhecida como comportamento motor explosivo (Jacquet e Lajtha, 1974) e identificada com o pânico (Panksepp, 1982). Das evidências citadas, sugere-se que a estimulação química ou elétrica da SCPD de ratos pode ser validada como um modelo animal de ataque de pânico (Graeff, 1990). Além disso, trabalhos como os de Delgado et al. (1954), Di Scala et al. (1987) e Robert e Cox (1987) confirmam essa característica de aversividade conferida à SCPD.

Baseado nesses fatos, Graeff (1981) sugeriu que a SCPD, o hipotálamo medial e as partes central e dorsomedial da amígdala constituiriam o chamado sistema cerebral aversivo (SCA), responsável pela integração de comportamentos ativos de defesa, em oposição ao chamado sistema de inibição comportamental (SIC), sugerido por Gray (1976) e constituído pelo septo hipocampal, corpos mamilares, tálamo anteroventral e córtex cingulato.

1.2 - Aminoácidos excitatórios

Embora Curtis et al. (1959) tenham sido os primeiros a obter evidências concludentes sobre a poderosa ação excitatória do glutamato (GLU) e do aspartato (ASP) sobre neurônios, somente há cerca de 15 anos esses AAE foram considerados neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). Atualmente se sabe que um grande

número de sinapses no SNC utilizam os AAE como neurotransmissores (Monaghan et al., 1989; Watkins et al., 1990; Erdo, 1991).

A atuação do GLU e ASP como neurotransmissores se dá através da interação com duas classes de receptores. Receptor N- metil- D- aspartato (NMDA_R), receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA_R) e receptor cainato formam a primeira classe e se caracterizam por serem ligados a canais iônicos (ionotrópicos). Sete subtipos de receptores metabotrópicos (mGLU₁ - mGLU₇), também conhecidos como *trans -1- aminociclopentano - 1,3 - dicarboxilato* (t-ACPD), formam a segunda classe. Estes se caracterizam por estarem acoplados a proteína G ligados a sistemas de segundo mensageiros que incluem hidrólises de fosfoinositídeos e inibição da formação de AMP cíclico (Reynolds e Miller, 1990; Yoneda e Ogita, 1991; Zorunski e Thio, 1992; Hollmann e Hinemann, 1994).

Várias evidências indicam que os receptores de GLU estão associados a diversas neuropatologias e aos danos decorrentes de lesões cerebrais (Schoepp e Conn, 1993; Schoepp e Sacaan, 1994). Além disso, experimentos mostram que os receptores de GLU medeiam os efeitos tóxicos em neurônios, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Choi, 1988; Choi e Rothan, 1990). Essas observações têm levado investigadores a sugerir que muitos acidentes neurológicos originados da falta de oxigênio ou glicose, ou ainda por crises epiléticas, resultam em danos cerebrais devido à estimulação

excessiva dos receptores de GLU (Dingledine et al., 1990; Etienne e Baudry, 1990; Smith et al., 1993). Também tem sido proposto que doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Meldrun e Garthwaite, 1990; Advokat e Pelegrin, 1992), coreia de Huntington (Storey et al., 1992), mal de Parkinson (Carlsson e Carlsson, 1990), esclerose lateral amiotrófica (Appel, 1993) e AIDS (Lipton, 1992) estejam relacionadas com a ativação excessiva do sistema glutamatérgico. Além disso, processos fisiológicos como: plasticidade sináptica (Collingridge et al., 1991; Fazeli, 1992; Nestler et al., 1993), desenvolvimento neuronal (Lisy et al., 1994), aprendizagem e memória (Morris, 1989; Izquierdo, 1991; McEntee e Crook, 1993) também estariam relacionados com os AEE.

Vários trabalhos têm mostrado que os antagonistas do receptor NMDA são neuroprotetores eficientes em uma variedade de modelos experimentais de lesão cerebral (Shapira et al., 1991; Rogawski, 1993), sugerindo que o antagonismo farmacológico deste receptor pode atenuar a excitotoxicidade decorrente da lesão cerebral. Além disso, os antagonistas de NMDA também suprimem a *potenciação a longo prazo (LTP)*, que tem sido relacionada, principalmente, com os processos de memória (Morris, 1989).

Pela existência de antagonistas altamente seletivos, o subtipo NMDA, dentre os receptores de GLU, tem sido o mais exaustivamente estudado (Leeson, 1993). O complexo receptor é constituído de sítios de ligação acoplados a um canal iônico que é

permeável a Na^+ e a Ca^{2+} . Embora o canal não seja do tipo voltagem-dependente *per se*, é bloqueado por Mg^{2+} de maneira voltagem-dependente. Esse bloqueio pode ser removido através da despolarização da membrana neuronal.

Além de sofrer modulação alostérica por um grupo de compostos quimicamente diferentes tais como a glicina (GLI), as poliaminas, a fenciclidina, a quetamina e o MK-801 (Reynolds et al., 1987; Yeh et al., 1990), o canal iônico também é bloqueado por Zn^{2+} , o qual ocuparia um sítio de ligação distinto do sítio de ligação do Mg^{2+} .

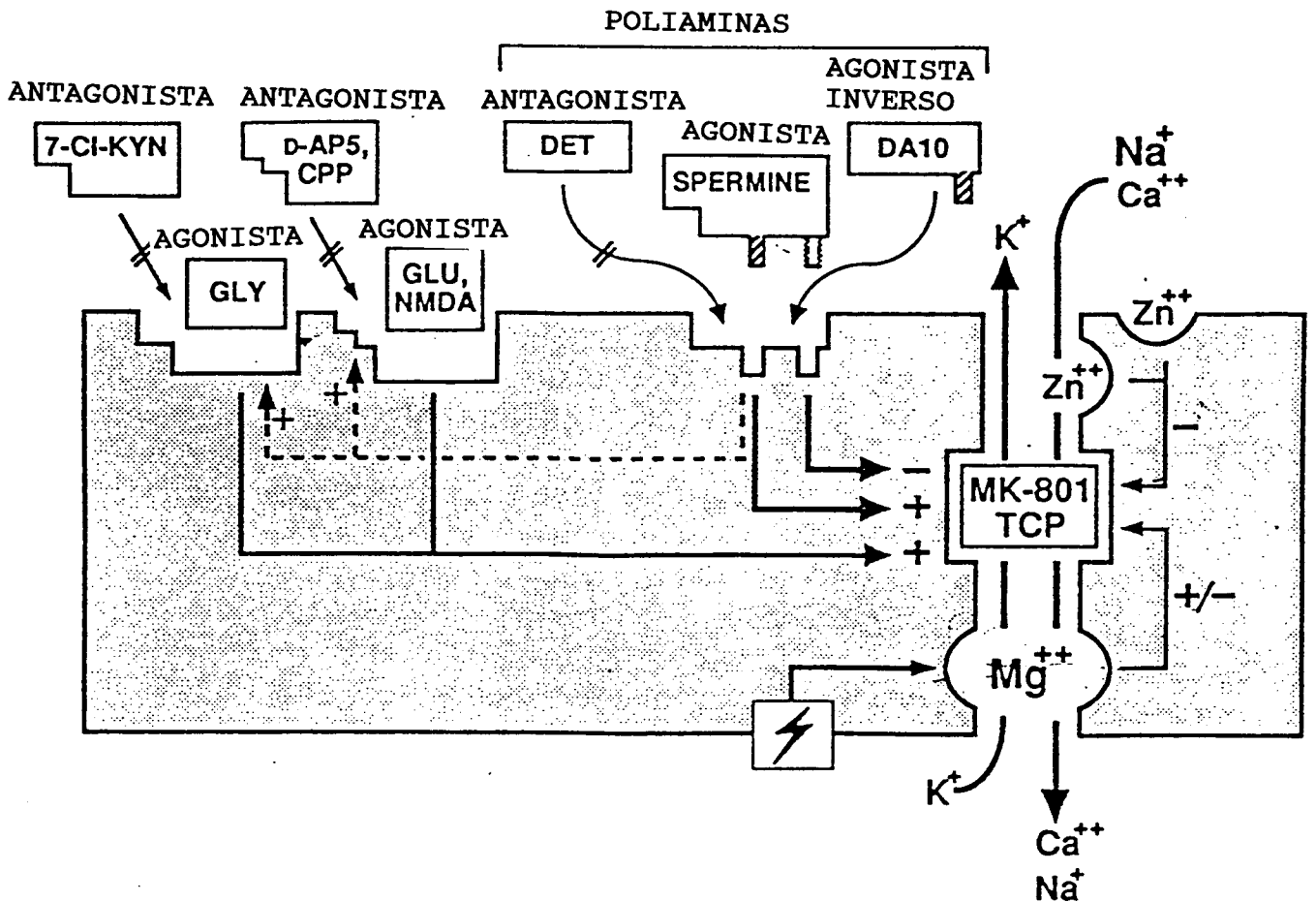


FIGURA 2- Modelo Esquemático do Receptor NMDA. Adaptado de Williams et al., 1990.

Em resumo, o complexo receptor ionóforo NMDA possui vários sítios de ligação: 1) um sítio para os agonistas (GLU e NMDA) e antagonistas competitivos como o ácido- 2- amino-fosfanopentanoico (AP5), 3-(2-carboxipiperazina-4-) propilfosfanato (CPP), D-2-amino-5- fosfanovalerato (D-APV) e D-aminociclopentano-1-3-dicarboxilato (GAMP); 2) um sítio regulatório para a GLI, insensível à estriçnina; 3) um sítio para o Mg^{2+} ; 4) um sítio para a fenciclidina e drogas correlatas; 5) um sítio para o Zn^{2+} e 6) um sítio regulatório alostérico para as poliaminas (Johnson e Acher, 1987; Ransom e Deschenes, 1990; Song e Huang, 1990; Betz, 1991; Leeson, 1993).

A necessidade fisiológica dos múltiplos sítios regulatórios desse receptor ainda não foi bem esclarecida. Sua presença, no entanto, parece ser necessária, pois o receptor NMDA medeia não só a transmissão excitatória neuronal, como também está envolvido no processo de excitotoxicidade do tecido nervoso. Então, o conhecimento das funções atribuídas a este receptor, bem como a todos os receptores de GLU, é crucial para o entendimento de funções cerebrais básicas como a aprendizagem e a memória, assim como para o tratamento racional das doenças anteriormente relacionadas (Harris et al., 1984; Choi, 1988).

A localização dos receptores de AAE tem sido possível graças ao emprego de técnicas eletrofisiológicas e autorradiográficas que detectam a densidade desses receptores no SNC e as vias neuronais

que utilizam AAE como neurotransmissores. Em ratos, análises autorradiográficas indicam uma grande concentração dos receptores do tipo NMDA no córtex cerebral (Maragos et al., 1986), neocórtex (Addae e Stone, 1986), hipocampo (Taxt e Storm-Mathisen, 1984, Baskys, 1992), hipotálamo (Shibata et al., 1986), amígdala, mesencéfalo e medula oblonga (Halpain et al., 1984). No mesencéfalo, todos os tipos de receptores de AAE foram encontrados na SCPD, havendo, porém, diferenças de concentrações desses receptores nas várias regiões dessa estrutura (Monaghan e Cotman, 1982; Albin et al., 1990). Em humanos, Jansen et al. (1989) mostraram que no córtex cerebral os receptores NMDA e AMPA têm concentrações similares; porém, para os receptores cainato e 1-aminociclopentano-1, 3- dicarboxilato (ACPD), as concentrações são mais baixas. As concentrações de receptores cainato, NMDA, ACPD e AMPA no hipocampo são praticamente iguais.

O aminoácido GLI exerce tanto ações inibitórias quanto excitatórias no SNC. Por muitos anos esse aminoácido tem sido conhecido como um dos principais neurotransmissores inibitórios em regiões cerebrais inferiores, atuando em receptores sensíveis à estriçnina no mesencéfalo e medula espinhal. O receptor inibitório oferece um potencial ilimitado como alvo para a intervenção terapêutica. Porém, um interesse maior sobre as funções do aminoácido só ocorreu em 1987, quando lhe foi atribuída uma função excitatória no SNC.

Johnson e Acher (1987) demonstraram que a GLI amplifica acentuadamente as respostas do receptor NMDA. Esse efeito da GLI não é bloqueado por estriçnina, o que sugeriu a existência de um sítio de ligação para GLI no receptor NMDA. A ocupação do sítio para a GLI parece ser absolutamente requerida para ativar o receptor e tem lhe conferido o conceito de "co-agonista" do neurotransmissor de GLU (Kleckner e Dingledine, 1988). Os mecanismos que regulam o papel fisiológico da GLI com relação ao receptor NMDA não são ainda totalmente conhecidos. Entretanto, as concentrações de GLI nos fluidos extracelulares e líquido estão em proporções acima de micromolares e estudos *in vivo* com agonistas de GLI sugerem que o seu sítio parece não estar totalmente saturado. Em adição, tem sido observado que a liberação fásica de GLU pelas terminações nervosas, somada a alterações nas concentrações extracelulares de GLI, pode modular as respostas mediadas pelo receptor NMDA (Leeson, 1993; Schmitt et al., 1995).

1.3 - Aminoácidos excitatórios na SCPD

A primeira indicação de que o GLU poderia estar envolvido nos processos relacionados à SCP foi feita por Behbehani e Fields (1979). Esses autores demonstraram que microinjeções de GLU na SCPD de ratos produziam um potente efeito analgésico por atuação nos receptores AAE existentes nessa região.

Trabalhos posteriores como os de Bandler (1982), Bandler et

al. (1985) demonstraram que a neurotransmissão glutamatérgica também está presente na SCP e que há o envolvimento dessa neurotransmissão em reações comportamentais e neurovegetativas da reação de defesa.

Particularmente na SCPD, o estudo dos AAE ganhou destaque nas últimas décadas. Krieger e Graeff (1985) demonstraram que microinjeções de baixas doses (5 nmol) de GLU induziam respostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de defesa, o mesmo não ocorrendo quando as microinjeções eram feitas em regiões fora da SCPD. Tais resultados vêm ao encontro daqueles obtidos por Bandler et al., em 1985, reforçando a idéia de a SCPD ser uma das estruturas cerebrais envolvidas na reação de defesa.

Carobrez (1987) e Graeff et al. (1988) demonstraram que os efeitos resultantes da microinjeção de GLU, nessa região, eram produzidos por receptores de AAE específicos. O pré-tratamento local com dietil- ester- ácido glutâmico (GDEE), um antagonista com maior seletividade para receptores de quisqualato, bloqueou as respostas comportamentais e neurovegetativas induzidas por GLU, não acontecendo o mesmo quando se administrava ácido caínico. Também foi demonstrado que a estimulação elétrica na SCPD era abolida com administração de GDEE. Esse último resultado levantou a possibilidade de que AAE endógenos (GLU ou ASP) atuariam como mediadores fisiológicos nos mecanismos de reação de defesa presentes na SCPD.

Outros receptores de AAE, presentes na SCPD, parecem estar

envolvidos com a reação de defesa e ansiedade. Resultados recentes envolvendo vários modelos animais de ansiedade têm sugerido a participação do receptor NMDA nesse fenômeno. Antagonistas desses receptores, microinjetados na SCPD, reduzem comportamentos relacionados com a ansiedade nos animais (Dunn et al., 1989; Schmitt et al., 1990; Corbett et al., 1990; Guimarães et al., 1990; Matheus et al., 1994).

1.4 - Sistema GABAérgico na SCPD

Vários métodos bioquímicos, fisiológicos e imunocitoquímicos têm sido empregados para identificar, na SCP, a maquinaria biossintética GABAérgica, confirmando a presença de um circuito GABAérgico nessa estrutura (Hokfelt e Ljungdahl, 1970; Vitorica et al., 1987; Barbaresi e Manfrini, 1988).

Até o momento, três subtipos de receptores de GABA têm sido definidos (para revisão ver Sivilotti e Nestri, 1991; Burt e Kamatchi, 1991; MacDonald e Olsen, 1994): o receptor GABA_A, que tem efeito inibitório sobre os neurônios através da abertura de canais de cloreto e está associado com um sítio de ligação para os benzodiazepínicos; o receptor GABA_B, com efeito também inibitório pré- e pós-sináptico que está associado indiretamente com um canal K⁺ e que pode diminuir a condutância de Ca²⁺ e inibir a produção de AMP_c via proteína G, e o receptor GABA_C, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido (Mody et al., 1994).

Os receptores GABA_A são estimulados por muscimol e inibidos por bicuculina; os receptores GABA_B são estimulados por baclofen, inibidos por flacofen e insensíveis à bicuculina; já os receptores GABA_C são estimulados por GABA mas são insensíveis à bicuculina e ao baclofen (Burt e Kamatchi, 1991).

A técnica de mapeamento usando detecção autorradiográfica mostrou que há uma grande densidade de receptores GABA-BZD na SCP, sobretudo na parte dorsolateral (Young e Kuhar, 1980; McCabe e Wamsley, 1986). Por outro lado, as concentrações de receptores GABA_B são bem mais baixas nessa região.

O complexo receptor GABA-BZD é composto por diferentes subunidades chamadas α , β , γ , ζ e ρ (MacDonald e Olsen, 1994) que se dispõem geometricamente formando o canal de cloreto (Haefely, 1989, 1990; Haefely et al., 1992).

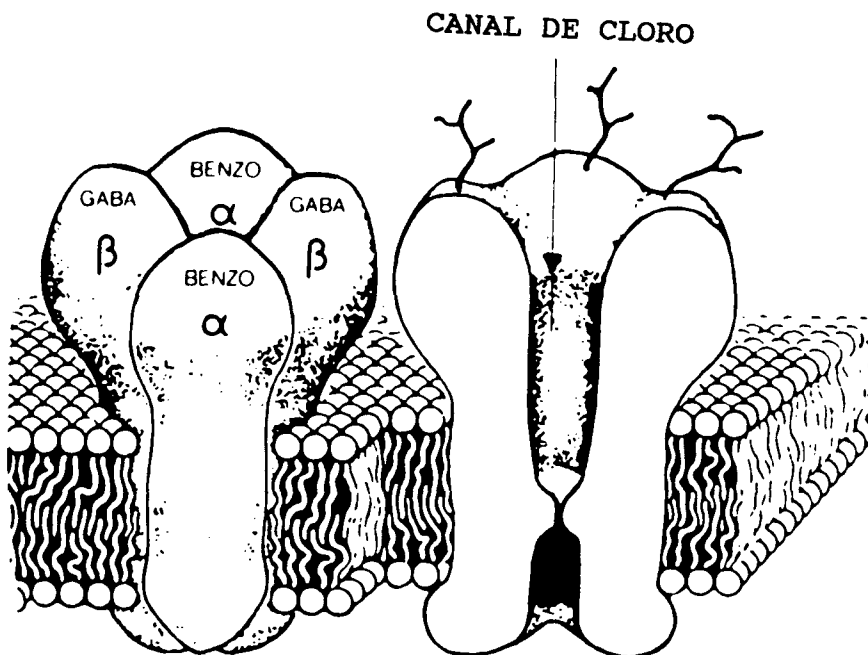


FIGURA 3- Modelo esquemático do receptor GABA_A com suas subunidades formando o canal de cloreto. Adaptado Haefly, 1988.

Atualmente, sugere-se que o sítio de ligação dos receptores BZD no receptor GABA_A esteja localizado na subunidade α , porém, a subunidade γ é necessária à sensibilidade (Knoflach et al., 1991) do BDZ. Sugere-se que os efeitos miorrelaxante, anticonvulsivante e, sobretudo, ansiolítico são devidos à facilitação da neurotransmissão mediada por esse receptor (Zorumski e Isenberg, 1991).

Embora haja vários indícios, as regiões cerebrais relacionadas com os efeitos mencionados acima ainda não estão completamente identificadas e estudadas. Até o momento, sabe-se que o GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, sendo utilizado por 40% dos neurônios (Zorumski e Isenberg, 1991) e que o sistema neuronal GABAérgico já foi detectado em várias regiões como o cerebelo, córtex, hipocampo, hipotálamo, amígdala, substância negra, corpo estriato, colículo superior, entre outras (Coimbra e Brandão, 1993; Vitorica et al., 1987).

Da mesma forma que as respostas aversivas induzidas pela estimulação elétrica na SCPD de ratos foram abolidas por antagonistas de AAE, essas respostas são atenuadas após injeções sistêmicas de drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica, como os barbitúricos e, principalmente, os benzodiazepínicos (Imperato e DiChiara, 1981; Brandão et al., 1982; Audi e Graeff, 1984; Graeff et al., 1986). Além disso, a microinjeção de antagonistas de GABA dentro da SCPD induz o aparecimento das mesmas respostas comportamentais que as eliciadas por estimulação elétrica

(Schenberg et al., 1983; De Paulis e Vergner, 1986; Bandler, 1988; Keay et al., 1988).

Os resultados acima sugerem que uma variedade de funções da SCPD esteja sujeito à uma inibição GABAérgica tônica (Brandão et al., 1982; Schmitt et al., 1985), sejam elas relacionadas com comportamentos defensivos e ansiedade, ou com analgesia. Esses resultados corroboram os dados obtidos por Sherman e Gebhart (1976), nos quais são mostrados que as concentrações de GABA na SCP sofrem aumentos bastante significativos quando o animal é exposto a estímulos nocivos.

1.5 - Outros sistemas neuroquímicos da SCPD

A neuroquímica da SCPD não se restringe somente à neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica. A ação de outros neurotransmissores como alguns peptídeos, dentre eles o tridecapeptídeo neurotensina (Da-Silva et al., 1989), e a colecistocinina nas formas de octapeptídeo (CCK-8) ou tetrapeptídeo (CCK-4) (Handley, 1994), já foram constatados nessa estrutura. Além desses, outros neurotransmissores como a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Audi et al., 1984, 1991; Schutz et al., 1985; Brandão et al., 1991).

A idéia de que antagonistas dos receptores de colecistocinina podem ser ansiolíticos eficazes na desorden de pânico tem atraído bastante a atenção dos pesquisadores. O possível papel da CCK em

ansiedade advém de observações iniciais que certos efeitos centrais e periféricos da CCK podem ser bloqueados por BDZs como o DZP. Efeitos ansiogênicos de agonistas de CCK-8 e CCK-4 tem sido relatado em vários modelos animais, dentre eles o LCE (Handley, 1994).

A serotonina, está envolvida em muitos mecanismos fisiológicos como: sono, comportamento sexual, regulação da temperatura, emese, anorexia e analgesia, além de distúrbios neurológicos como agressão, depressão e epilepsia (Wilkinson e Dourish, 1991). No mecanismo da ansiedade e depressão, a 5-HT tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores. As primeiras citações sobre sua participação na ansiedade remontam-se aos trabalhos de Graeff e Schoenfeld (1970) e Geller e Blum (1970). Esses autores mostraram que antagonistas e inibidores da síntese de 5-HT liberaram comportamentos operantes suprimidos em testes de conflito. Resultados posteriores (Wise et al., 1972) demonstraram que ansiolíticos benzodiazepínicos (BDZ) diminuíam a taxa de renovação ("turnover") de 5-HT, sugerindo que o efeito ansiolítico da droga se dava pela inibição desse neurotransmissor.

A relação entre 5-HT, SCPD e ansiedade foi sugerida primeiramente por Schenberg e Graeff (1978) que demonstraram que antagonistas de 5-HT facilitavam as respostas aversivas eliciadas por estimulação elétrica da SCPD. Mais tarde, Schutz et al. (1985) observaram que a 5-HT, quando microinjetada na SCPD, produzia um efeito antiaversivo dose-dependente em ratos que recebiam

estimulação elétrica nessa estrutura e em seguida eram submetidos ao teste da caixa de vai-e-vem (shuttle-box). Além disso, um agonista dos receptores 5-HT, a 5-metoxi-dimetil-triptamina, que não sofre recaptação pós-sináptica, mostrou-se bem mais efetivo e potente do que a própria 5-HT nesse teste. Esses resultados sugeriram que a ativação de receptores pós sinápticos de 5-HT levava a inibição da aversão gerada pela estimulação elétrica da SCPD.

Resultados subseqüentes, desses mesmos autores, demonstraram que um antagonista não seletivo de 5-HT (metergolina), bem como um antagonista seletivo do receptor 5-HT₂ (quetanserina), preveniam o efeito antiaversivo do neurotransmissor. Além disso, também verificaram que zimelidina, um inibidor seletivo de recaptação de 5-HT, não somente potencializou a sua ação, mas também causou um efeito antiaversivo, quando microinjetada dentro da SCPD, efeito esse abolido pelo pré-tratamento com ritanserina, um antagonista dos receptores 5-HT₂.

Com base nos resultados acima citados, Schutz et al. (1985) sugeriram que o efeito antiaversivo da 5-HT era devido, principalmente, à estimulação de receptores 5-HT₂ presentes nessa estrutura. Essa sugestão foi fortemente sustentada por resultados obtidos com a ipsapirona, agonista parcial do receptor de 5-HT_{1A}, que causou um efeito antiaversivo bem menor quando microinjetado na SCPD. Também foi demonstrado que os antagonistas de 5-HT per se não alteraram as respostas comportamentais quando microinjetados na SCPD, contrastando com o comportamento motor explosivo eliciado por

antagonistas de GABA aplicados nessa mesma região do cérebro (Schutz et al., 1985). Essa diferença fortalece a sugestão de que a modulação da aversão na SCPD pela 5-HT é fásica e não tônica. Assim, estimulação elétrica da SCPD poderia promover a liberação de 5-HT como parte de um mecanismo de inibição, enquanto antagonistas de 5-HT diminuiriam o limiar aversivo da estimulação elétrica.

Contudo não se pode afirmar que somente os receptores 5-HT₂ estejam envolvidos na expressão da ansiedade, pois há evidências sugerindo a participação de receptores 5-HT_{1A} (Deakin, 1993; Graeff et al., 1993; Launay et al., 1994). Os resultados obtidos em vários laboratórios que investigam o papel da 5-HT na ansiedade são contraditórios (para revisão, Handley e McBlane, 1993). Por exemplo, a buspirona, um agonista 5-HT_{1A}, lançado na clínica como ansiolítico, produz um efeito antiaversivo em pombos. Tal efeito é, no entanto, menos consistente do que os obtidos com benzodiazepínicos em roedores e macacos, tendo inclusive sido publicados resultados negativos com relação à sua ação ansiolítica (Graeff, 1993a).

1.6 - SCPD, reação de defesa e ansiedade

Se buscarmos um valor adaptativo para os processos psicobiológicos observados nas espécies, inclusive a humana, pode-se dizer que a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais (Graeff, 1993a). As modificações comportamentais e neurovegetativas observadas nos três processos são bastante semelhantes, sendo possível sugerir que as mesmas vias neuronais,

bem como algumas estruturas cerebrais, sejam compartilhadas no desencadeamento desses processos.

Os mecanismos cerebrais envolvidos nos comportamentos defensivos foram bem descritos por Adams (1979), ao sugerir que o sistema de defesa estaria representado na SCPD. Vários estudos têm claramente sugerido que a SCPD é uma das estruturas que compõe o sistema cerebral aversivo (SCA) (Graeff, 1981).

Dentre as estruturas cerebrais que compõem o mesencéfalo, foi observado, que do ponto de vista evolutivo, a SCPD sofreu poucas alterações ao longo dos anos, tanto na forma quanto no funcionamento (Carrive, 1993), sugerindo que os comportamentos à ela associados vêm sofrendo uma seleção favorável entre os mamíferos. Os substratos neuronais encontrados na SCPD ainda não foram completamente estudados, mas mecanismos como o GABAérgico, serotonérgico, o glutamatérgico e o opioidérgico exercem determinados controles sobre essa estrutura, o que se reflete nos padrões comportamentais (Brandão et al., 1982; Schenberg et al., 1983; Bandler, 1988; Graeff, 1990; Brandão, 1993).

A verificação de que os comportamentos defensivos resultantes da estimulação elétrica da SCPD são abolidos por antagonistas de receptores de AAE, bem como por agonistas GABAérgicos, sugere que ambos os sistemas neuronais estejam presentes nessa estrutura e medeiam os comportamentos a ela integrados. No entanto, poucos são os trabalhos que estudam uma possível sobreposição funcional entre esses dois sistemas neurotransmissores na SCPD.

2 - OBJETIVOS

Baseado nos fatos relatados na introdução, nos propusemos a investigar a interação entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico presentes na SCPD. Esta análise foi realizada através da manipulação química dessa estrutura cerebral, associado à administração de drogas pela via sistêmica. Para tanto os seguintes objetivos específicos foram delineados:

a) Verificar as ações da glicina e do 7 cloroquinurênico microinjetados na SCPD sobre o efeito ansiolítico do DZP administrado pela via IP.

b) Verificar as ações da glicina e do 7 cloroquinurênico microinjetados na SCPD sobre o efeito ansiogênico do PTZ administrado pela via IP.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Nos experimentos que seguem foram utilizados, no total, 320 ratos "hooded" pesando entre 280 e 300 g. Os animais, após o desmame, foram alojados em caixas plásticas (15 x 36 x 30 cm) com forração de serragem. O número de animais por caixa não ultrapassou a seis. Em cada caixa os animais permaneceram até completarem 4 meses de idade. Durante o período de alojamento, água e comida foram oferecidos livremente. Os resultados mencionados neste trabalho referem-se a 290 desses animais, número esse obtido a partir da análise histológica, que revelou os sítios da SCPD atingidos pelas drogas, como demonstrado na figura 1A e IB (apenas 120 estão ilustrados devido às sobreposições).

3.2 - Cirurgia estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com Equitesin (0,3 ml/100 g, IP), precedido pela administração de atropina (1 mg/ml, IP, 15 minutos antes). Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se à tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal e posterior adaptação ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA).

Em seguida foi realizada a assepsia da área com álcool iodado e uma solução de xilocaína com adrenalina (2%) foi injetada

subcutaneamente por todo o campo cirúrgico. A calota craniana foi exposta numa área desde 3 a 4 mm posterior à sutura lambdóide até 3 a 4 mm anteriores à sutura coronária através da remoção de uma área ovalada. O perióstio de toda a região foi raspado. Em seguida, 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 perfurada com uma broca odontológica para fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Um dos parafusos foi colocado no centro do osso parietal esquerdo e o outro no osso parietal direito. Para o implante da cânula na SCPD, as coordenadas obedecidas, segundo Paxinos e Watson (1986), foram as seguintes: ML = 1.9 mm em ângulo de 22°, na altura da sutura lambdóide. A profundidade de introdução da cânula foi de 2,0 mm (DL), a partir da superfície externa do osso.

Uma vez adaptados parafusos e cânula, novamente o osso foi seco e a área aberta preenchida com uma prótese de polímero autopolimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma sólida prótese.

Decorridos alguns minutos para a secagem total da prótese, um mandril nº 29 foi adaptado à cânula, com o intuito de prevenir o seu entupimento.

Ao final da cirurgia, cada animal recebia 0,1 ml de pentabiótico veterinário, por via intramuscular, sendo após isso, colocado numa caixa específica para sua recuperação, dotada de uma

lâmpada de 40 W para aquecimento à 30°C, aproximadamente, até seu despertar. Posteriormente, os animais foram removidos para uma caixa individual, onde receberam água e comida livremente, e ali permaneceram por sete dias até serem utilizados no modelo animal escolhido.

3.3 - Cânulas

Em todos os experimentos realizados os animais foram implantados com uma cânula-guia, a fim de receberem microinjeções na SCPD. As cânulas foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm ou 30 x 7 mm. Após fazer a medição com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo- Brasil) as agulhas foram cortadas no comprimento de 13mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual não permitia a sua total introdução pelo orifício feito anteriormente com a broca odontológica.

3.4 - Microinjeção intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16,0 mm de comprimento (0,3 mm de diâmetro), adaptadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas a microsseringas (Hamilton, 10 μ l), por um tubo de polietileno. As agulhas possuíam 3,0 mm de comprimento a mais do que a cânula-guia de forma que as drogas fossem realmente microinjetadas na SCPD.

As seringas foram preenchidas com água destilada e com a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado com auxílio de um pano e, com um alicate, foi retirado o mandril adaptado à cânula durante o ato cirúrgico. Com auxílio de limas odontológicas, usadas para desobstrução de canal dentário, a cânula-guia foi limpa. Posteriormente a agulha foi suavemente introduzida através da cânula. Em cada animal foi injetado na SCPD 0,4 μ l de solução. Ao final da microinjeção, a agulha foi deixada no local por 30 segundos adicionais. Em seguida o animal foi levado ao campo aberto para o início do teste comportamental.

3.5 - Teste comportamental

O teste comportamental utilizado foi o labirinto em cruz elevado (LCE). Esse modelo foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1958) por Handley e Mithani em 1984. Posteriormente, Pellow et al. (1985) executaram a validação comportamental fisiológica e farmacológica do LCE para ratos.

Esse equipamento, em forma de cruz, é composto por dois braços abertos (50 x 10 cm) opostos, e dois braços fechados por parede (50 x 10 x 40 cm), também opostos. O aparelho estava elevado 50 cm do chão. Os braços abertos foram circundados por um anteparede de acrílico 1 cm de altura para evitar a queda dos animais. Uma arena quadrada (60 x 60 x 35 cm), confeccionada igualmente em madeira, foi utilizada imediatamente antes do teste no LCE, com o

objetivo de habituar o animal à luminosidade da sala (Lister, 1987a).

Os aparelhos usados no experimento estavam localizados numa sala com luz branca, cuja intensidade era de 40 Lux. Após testar cada animal, os aparelhos foram limpos com solução de etanol a 20%.

3.6 - Dispositivo de registro comportamental

Durante o teste do LCE foram registrados os seguintes comportamentos:

a) frequência de entradas dos animais nos braços abertos (FEA) e nos fechados (FEF);

b) o tempo de permanência dos animais nos braços abertos (TPA) e fechados (TPF):

c) a frequência de tentativas de entradas nos braços abertos (FT). Foi considerada tentativa o ato do animal colocar a cabeça e uma, duas ou três patas em um dos braços abertos, seguido de retorno ao centro ou a um dos braços fechados do LCE;

d) a frequência de levantar ("rearing") (FL). Esse comportamento é caracterizado pela postura do animal quando ele se coloca em posição vertical, com o corpo apoiado nas patas traseiras em extensão.

e) frequência de alongamentos exploratórios (FAE) ("stretched-attend"), definido como alongamento da cabeça e ombros para frente do corpo, seguido por retração à posição original (Rodgers e Cole,

1993);

f) frequência de auto-limpeza (FAL) ("grooming") . Embora seja caracterizado por uma seqüência de comportamentos, foi considerado apenas a auto-limpeza executada pelo animal na região da face (Roeling et al., 1993).

3.7 - Protocolo experimental

O trabalho teve duas etapas. Na etapa A foram analisados os efeitos das drogas glutamatérgicas microinjetadas na SCPD em ratos pré-tratados com DZP, aplicado pela via intraperitoneal. Na etapa B, foram analisados os efeitos das drogas glutamatérgicas microinjetadas na SCPD em ratos pré-tratados com PTZ, administrado pela via intraperitoneal. Em ambas as etapas foi seguido o protocolo abaixo descrito.

Os animais foram alojados, isoladamente, por uma semana após a impantação das cânulas-guias. No dia do teste, cada animal era colocado numa ante-sala com iluminação de 720 lux. Nesse local era aplicada uma injeção por via IP de diazepam (DZP), pentilenotetrazol (PTZ) ou veículo e, 15 minutos após, o mesmo animal era microinjetado com uma das seguintes soluções: a) líquido artificial (LA), b) glicina (GLI), ou c) 7-cloroquinurênico (7Cl-QUIN) e transportado para a sala do LCE, com iluminação de 40 lux. A seguir cada animal era colocado numa arena de madeira cujo objetivo era aumentar a atividade locomotora, bem como ocorrer uma

habituação à pouca luminosidade (Lister, 1987a). Passados 5 minutos, o animal era transferido para o centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e seu comportamento registrado por um período de 5 minutos, de acordo com o procedimento descrito por Pellow et al. (1985). Após cada sessão experimental, o LCE era limpo, assim como a arena de madeira, com uma solução de etanol 20%.

Todos os experimentos foram realizados entre 8h e 12h. As doses foram selecionadas de acordo com a literatura (Matheus et al., 1994; Lopes-da-Silva, 1994) ou por experimentos preliminares.

3.8 - Histologia

Ao término de cada teste comportamental, os animais foram anestesiados com solução de Equitesin (0,3 ml/100 g, IP). Os cérebros foram perfundidos por via intracardíaca com solução salina (NaCl, 0,9%), seguida por solução de formaldeído (10%) por cerca de 3 minutos. Posteriormente, os cérebros receberam uma microinjeção de solução de azul de Evans (0,4 μ l).

Seguiu-se a decapitação e a remoção dos respectivos cérebros, que foram acondicionados em solução de formaldeído. Os cérebros foram fatiados em micrótomo de congelamento (Cryocut 1800, USA). Os sítios das injeções foram identificados através da comparação do corte com os diagramas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1986).

3.9 - Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M.. Quando foram detectadas diferenças entre as variâncias pelo teste de Bartlett's, os dados foram transformados pela raiz quadrada. e realizada análise de variância nos dados transformados. As comparações entre os tratamentos e o controle foram detectadas pelo Teste de Dunnett, já as comparações entre cada tratamento IC e líquor foram detectadas pelo Teste T de Student. Os níveis de significância receberam as seguintes notações :(*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$ e (***) $P < 0,005$.

3.10 - Drogas e soluções

Nos experimentos realizados as seguintes drogas foram utilizadas por injeções IP: PTZ (Sigma, EUA) e atropina (Sigma, EUA) dissolvidos em solução de salina 0,9%; DZP (Cristalia, Brasil) dissolvido em solução contendo 90% salina e 10% propileno glicol e solução de equitesin composta de hidrato de cloral (8,5g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,252 g), água destilada (91,4 ml), pentobarbital sódico (1,94 g), álcool etílico (13,0 ml) e propilenoglicol (85,6 ml). Foram aplicados ainda, 0,1 ml/animal de pentabiótico veterinário (Abbott, Brasil) pela via intramuscular. Os volumes injetados de DZP e PTZ foram de 1 ml/kg. O equitesin foi injetado num volume de 0,3ml/100g.

Para injeções intracerebrais foram utilizados os seguintes

compostos: LA, constituído por NaCl (8,1 g), KCl (0,25 g), CaCl₂ (0,14 g), MgCl₂ (0,11) e Na₂CO₃ (1,0 g), dissolvidos em um litro de água destilada (Merlis, 1940); GLI (Sigma, EUA), dissolvida em LA; e 7Cl-QUIN (RBI, EUA) dissolvido em 0,2 ml de NaOH, 0,1 M e o pH ajustado para 7,4 com HCl 0,1 M, para completar o volume da solução (0,4 ml) adicionou-se solução de salina (NaCl 0,9%). Os volumes utilizados para as injeções intracerebrais foram de 0,4 µl/sítio neural.

4. AVALIAÇÃO DAS DROGAS GLUTAMATÉRGICAS SOBRE O EFEITO ANSIOLÍTICO DO DIAZEPAM

4.1 - Introdução

Desde a introdução do clordiazepóxido (1957) e do DZP (1960) na clínica, os benzodiazepínicos têm sido as drogas de escolha para o tratamento das desordens de ansiedade (Fontana et al., 1989). Claramente superiores em atividade ansiolítica e muito menos tóxicos do que as outras classes de drogas até então utilizadas para os mesmos propósitos (carbamatos e barbitúricos), os benzodiazepínicos fazem parte do rol de drogas mais prescritas na prática médica nos dias atuais (Harvery, 1991).

Dois fatores principais contribuíram para a grande aceitação dos benzodiazepínicos. O primeiro foi a sua fácil avaliação em testes animais que detectam mudanças comportamentais induzidas por drogas, e o segundo foi a descoberta dos receptores endógenos nos quais os benzodiazepínicos se ligam, o que permitiu que um número muito grande de compostos similares ao clordiazepóxido fosse lançado no mercado (File, 1987). O protótipo dos benzodiazepínicos utilizados na clínica é o DZP. Os efeitos ansiolíticos do DZP já são bem conhecidos na literatura e essa propriedade é utilizada na determinação do perfil farmacológico ("screening") de drogas ansiolíticas em diferentes modelos animais de ansiedade.

No LCE, o DZP aumenta a exploração (frequência), bem como o tempo de permanência do animal nos braços abertos (Pellow et al.,

1985; Yasumatsu et al., 1994; Melchior e Ritzmann, 1994; Wolfman et al., 1994; Brett e Pratt, 1990; Fukuda e Wada, 1991). No teste de interação social, animais que recebem tratamento com DZP aumentam o tempo de interação, quando comparados com o grupo controle (File et al., 1991). O efeito ansiolítico também é detectado no teste do campo aberto ("open-field") (Hughes, 1993), no teste das vocalizações ultrasônicas (Vivian e Miczek, 1993), no teste do labirinto em zero (Shepherd et al., 1994), no teste do "hole-board" (Lister, 1987b), e no teste do sobressalto acústico (Davis, 1979).

Nosso objetivo na primeira parte desse trabalho foi verificar a ação de drogas glutamatérgicas (como a GLI e o 7Cl-QUIN) microinjetadas na SCPD sobre o efeito ansiolítico do DZP. Em modelos animais de ansiedade, agonistas do sítio de GLI acoplado ao receptor NMDA, microinjetados na SCPD têm demonstrado ação ansiogênica (Schmitt et al., 1995) enquanto a administração de antagonistas competitivos desse sítio de ligação, como o ácido 7Cl-QUIN e o HA-966, tem exibido ação ansiolítica (Matheus et al., 1994).

Partindo do conhecimento prévio dos efeitos farmacológicos dessas três drogas (DZP, GLI e 7Cl-QUIN), propusemo-nos a verificar as possíveis interações entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico, utilizando como modelo animal de ansiedade o LCE.

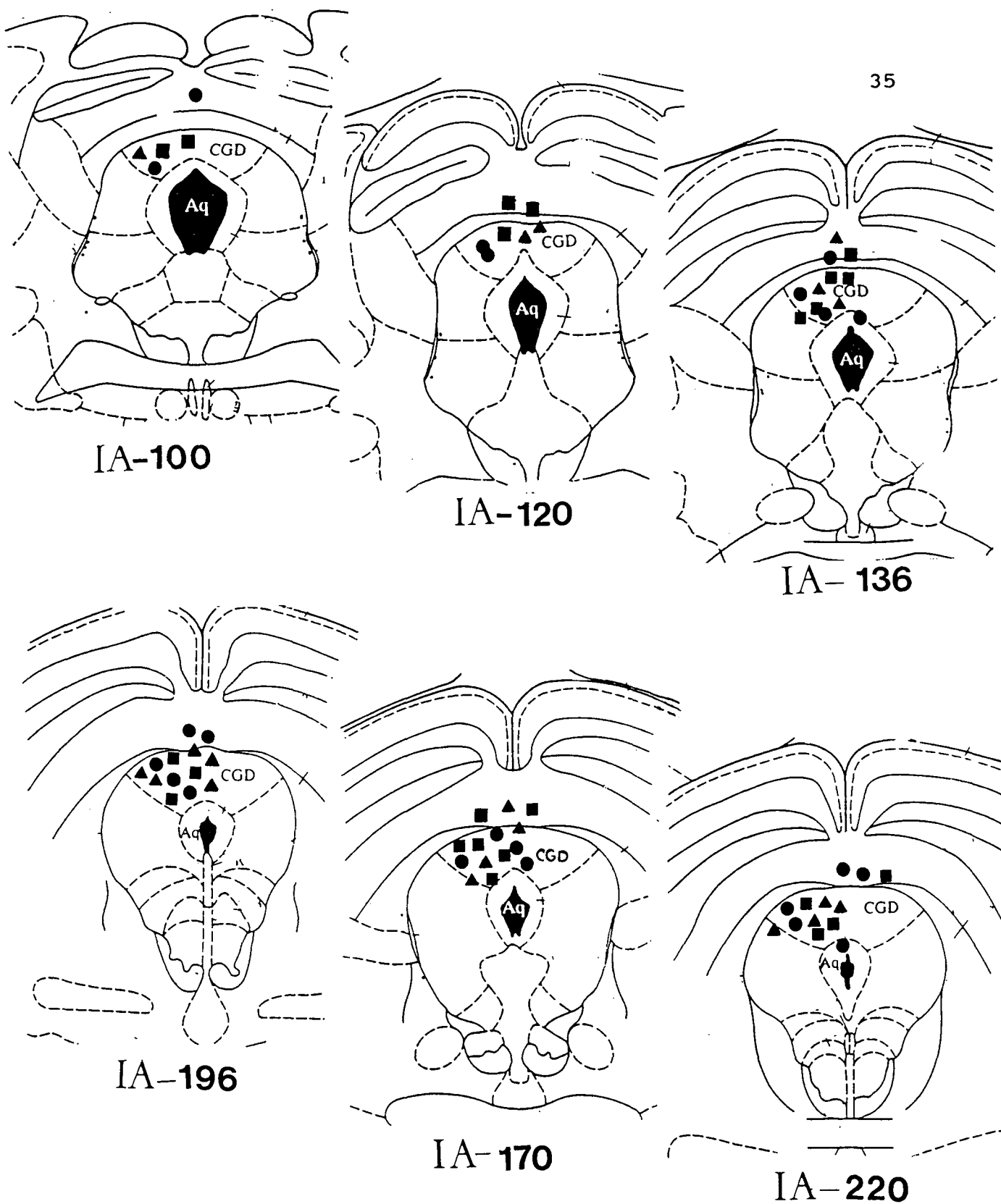


FIGURA 1A - Localização do centro das microinjeções de drogas na SCPD. Os diagramas foram extraídos do atlas de Paxinos & Watson (1986). Os círculos, triângulos e quadrados representam os pontos nos quais os compostos GLI, 7Cl-QUIN e LA foram injetados, respectivamente.

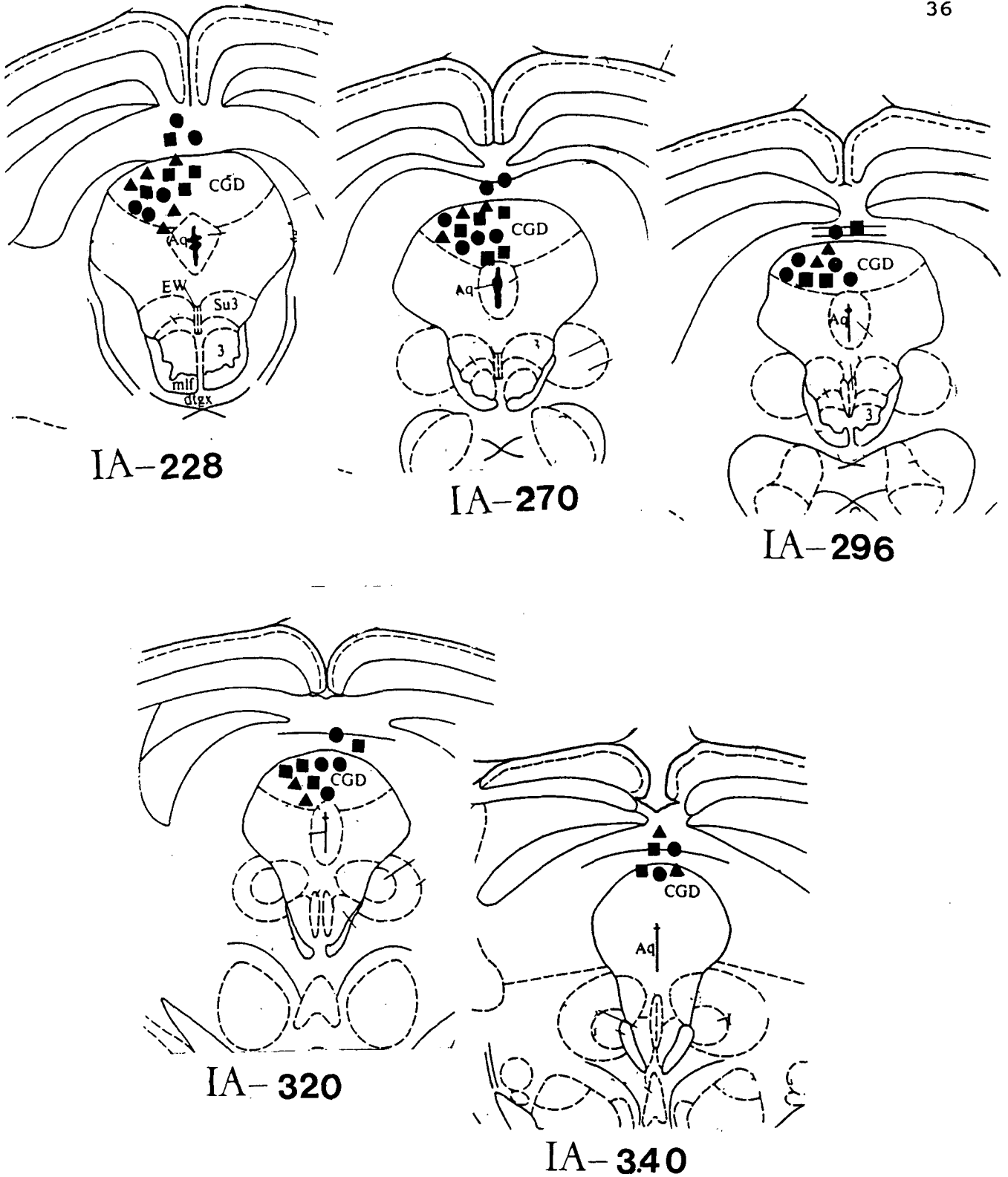


FIGURA 1B - localização do centro das microinjeções de drogas na SCPD em planos mais rostrais. Os diagramas foram extraídos do Atlas de Paxinos & Watson (1986). Para maiores detalhes veja figura 1A.

4.2 - Resultados

Os resultados obtidos nesta primeira etapa experimental estão representados nas figuras 2, 3 e 4.

O DZP na dose de 0.375 mg/kg promoveu uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,005$) da FT quando comparado com o grupo controle (Fig. 2A). Não foram detectados quaisquer efeitos significativos do DZP nos parâmetros FEF, FAE e FL (Fig. 2B e Fig. 3A e B). Entretanto, interações significantes ($p < 0.05$) foram detectadas entre os tratamentos IP e IC para a FEA [$F(4,110) = 2,7$] e TPA [$F(4,110) = 2,36$]. De fato, o DZP causou aumentos (dose-dependentes para a TPA) em ambos os parâmetros comportamentais, efeitos esses, que foram antagonizados pelos tratamentos IC com GLI e, principalmente, com 7Cl-QUIN (Fig. 3C e 3D).

O DZP também causou um aumento da FT e da FAL que, no entanto, não alcançaram, significância estatística. Para a FT observou-se um efeito antagônico marginal do DZP pela GLI [$F(8,17) = 1,92$ $P = 0,064$] e um antagonismo significativo do 7 Cl-QUIN (Fig. 3A). Para a FAL, apesar do tratamento IC da GLI ter produzido uma diminuição, somente o tratamento com 7 Cl-QUIN produziu um antagonismo estatisticamente significativo do efeito do DZP (Fig. 3C).

Cabe ainda notar que, enquanto a GLI causou um antagonismo parcial dos efeitos do DZP para a FEA, TPA, FAL e FT, o 7Cl-QUIN promoveu a inversão do efeito.

Nesse experimento também foram utilizados doses de DZP de 1,5

e 3,0mg/Kg. Na figura 4 estão representados os resultados obtidos sobre os quatros principais parâmetros comportamentais do teste do LCE.

De uma forma geral verificamos que nessas duas doses, sobretudo na maior delas (3,0 mg/kg), houve reduções significativas dos parâmetros comportamentais analisados ($P < 0,005$), independentemente do tratamento IC recebido, sugerindo um efeito sedativo do DZP nessas doses. Essa sugestão é reforçada pelas reduções observadas nos comportamentos de atividade geral (FT e FEF). Nenhum dos tratamentos IC (GLI ou 7Cl- QIN alterou o efeito sedativo do DZP nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, como mostra a Fig. 4.

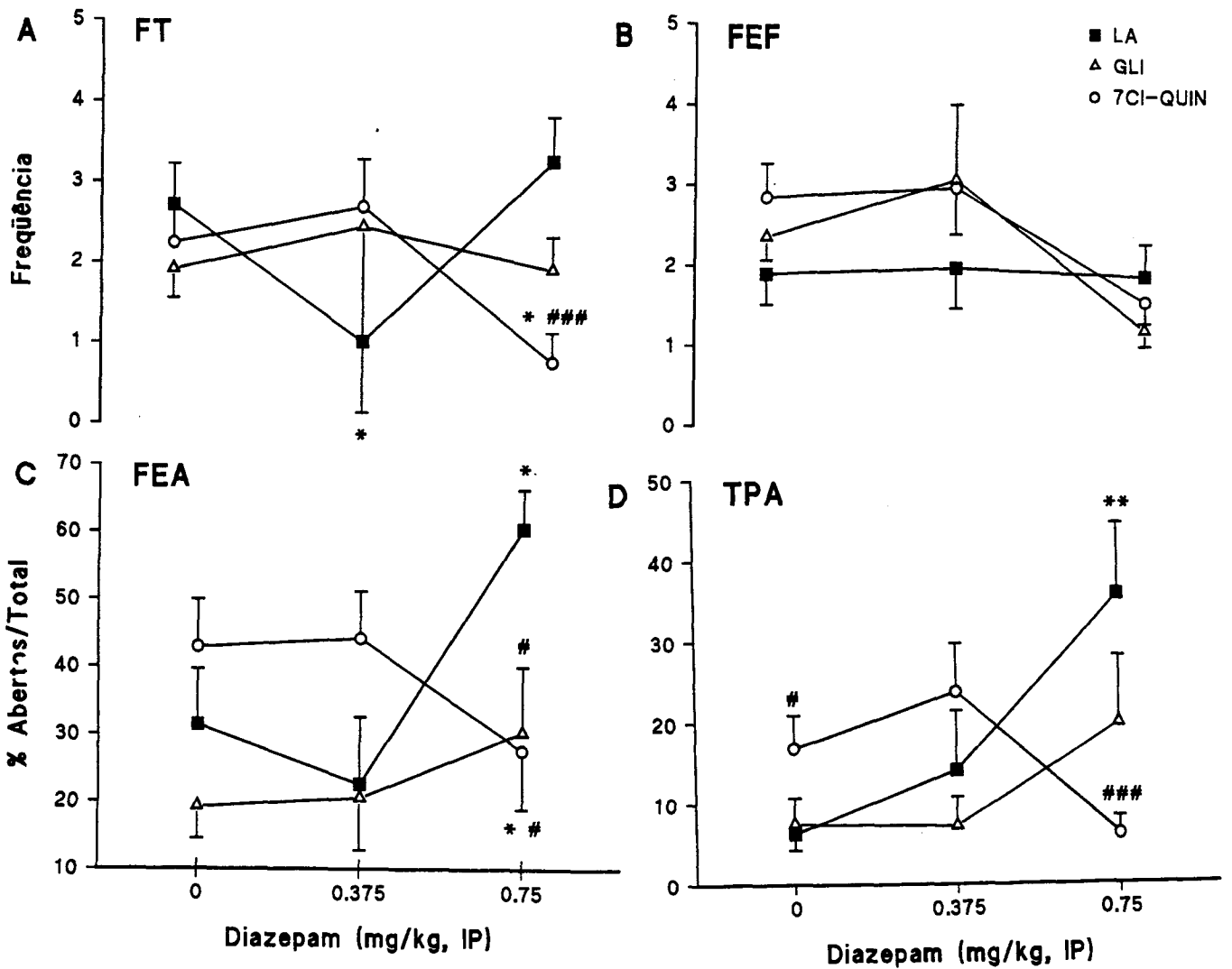


FIGURA 2 - Efeito das drogas glutamatérgicas (7Cl- QUIN e GLI) microinjetadas na SCPD sobre a ação do DZP, em ratos submetidos ao LCE. A,B,C e D representam respectivamente: a frequência de tentativas (FT), a frequência de entradas no fechado (FEF), a frequência de entradas no aberto (FEA) e o tempo de permanência no aberto (TPA). Cada valor representa a média E.P.M. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; diferenças significantes entre as doses de DZP. # = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$ diferenças significantes entre as doses IC. N= 13.

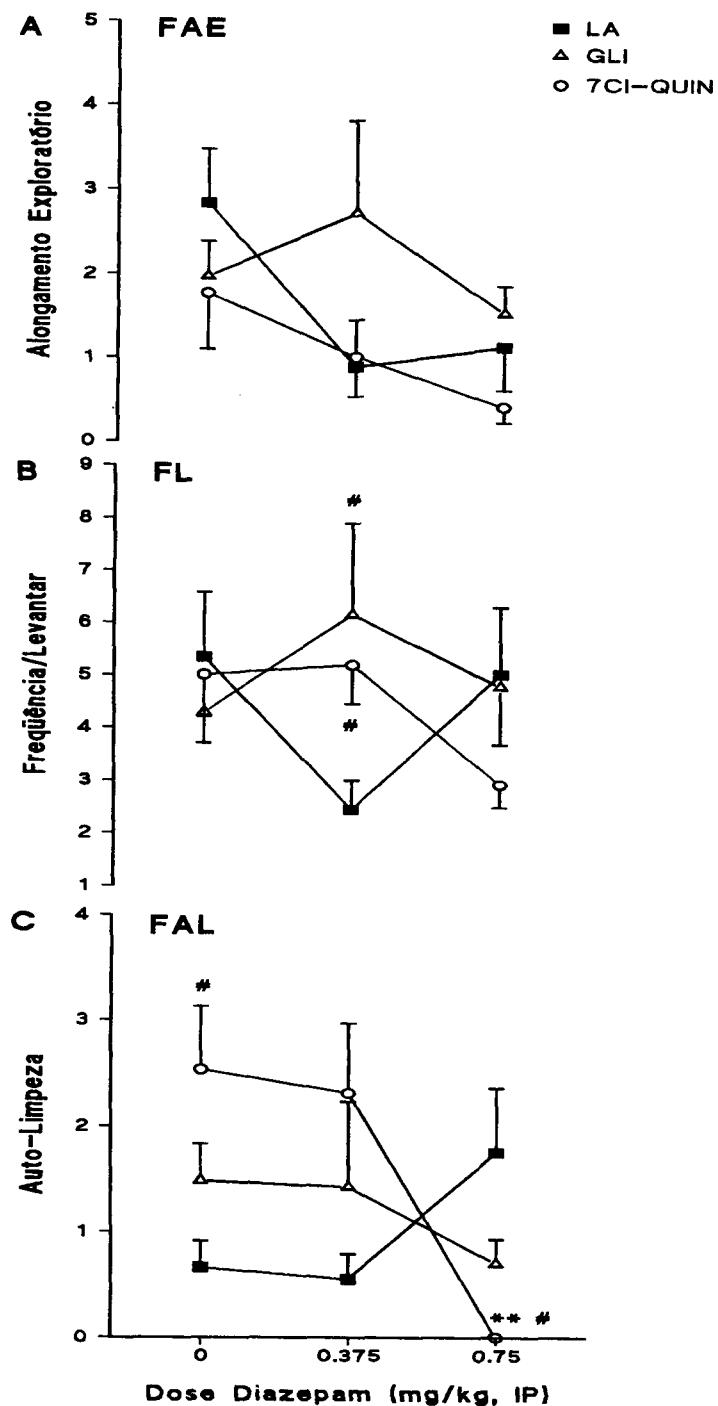


FIGURA 3 - Efeito do 7Cl-QUIN e da GLI microinjetados na SCPD sobre a ação do DZP, em ratos submetidos ao LCE. A, B e C representam respectivamente: frequência de alongamentos exploratórios (FAE), frequência de levantar (FL) e frequência de auto-limpeza (FAL). Cada valor representa a média E.P.M. N=13.

** = $P < 0,01$ para diferenças significantes entre as doses de DZP.
 # = $P < 0,05$; para diferenças significantes entre as doses IC.

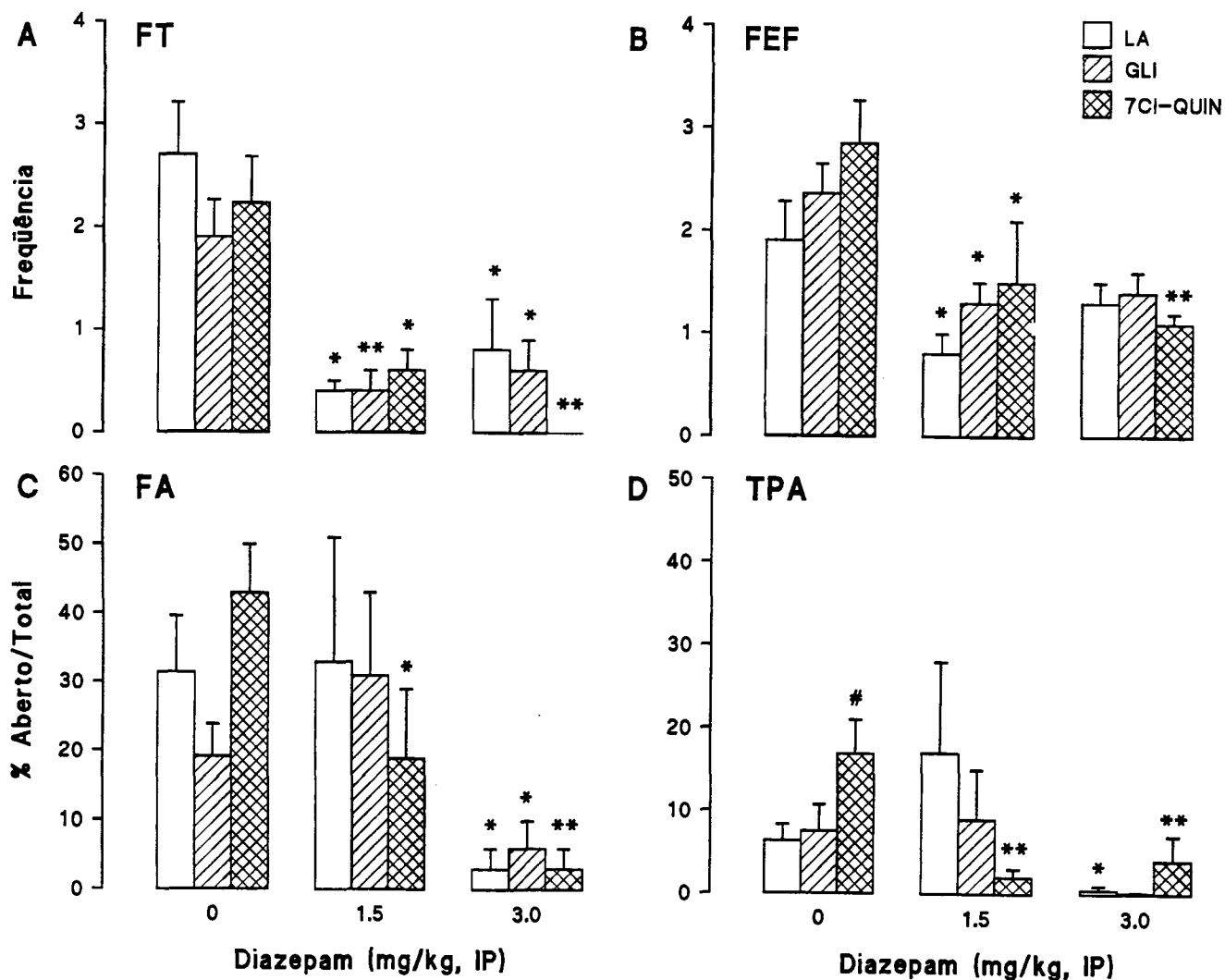


FIGURA 4- Efeito de drogas glutamatérgicas sobre a ação do DZP em ratos submetidos ao LCE. As colunas brancas representam tratamento com LA e as colunas hachuradas representam os tratamentos com GLI (▨) e 7CI-QUIN (▩). A, B, C e D representam respectivamente: a frequência de tentativas (FT), a frequência de entradas no fechado (FEF), a frequência de entradas no aberto (FEA) e o tempo de permanência no aberto (TPA). Cada valor representa a média E.P.M. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; para diferenças significantes entre as doses de DZP. # = $P < 0,05$ para diferenças significantes entre as doses IC. N= 13.

4.3 - Discussão

A manipulação química ou elétrica de regiões específicas do SNC, associadas a tratamentos sistêmicos, tem sido largamente utilizada em estudos psicofarmacológicos com o intuito de determinar os neurotransmissores envolvidos em várias reações comportamentais (Shenberg e Graeff, 1978; Motta e Brandão, 1993; Matheus et al., 1994).

No teste do LCE, tanto o FEA como o TPA são os fatores mais utilizados para se verificar o perfil ansiosseletivo de uma determinada classe de drogas (Pellow et al., 1985; File, 1992), pois as drogas ansiolíticas tendem a aumentar esses parâmetros, enquanto que as ansiogênicas tendem a diminuí-los.

Um efeito ansiolítico foi claramente observado em animais controle (grupo LA/DZP) pré-tratados com a dose de 0,75 mg/kg de DZP. Para os parâmetros FEA e TPA observou-se aumento significativo dessas respostas nessa dose, o que reflete o perfil ansiolítico da droga no LCE (Pellow et al., 1985).

Resultados semelhantes com essa dose foram obtidos por Lopes-da-Silva (1994) no LCE e por Shepherd et al. (1993) num novo modelo animal de ansiedade, o labirinto em zero, uma modificação do LCE, que incorpora medidas etológicas tradicionais e novas, na análise dos efeitos de drogas ansiosseletivas. Porém, em ambos os casos, a manipulação química da SCPD não foi realizada, indicando que a administração local de LA não interfere com os efeitos sistêmicos do DZP.

Quando usamos GLI microinjetada na SCPD, verificamos um antagonismo dos efeitos ansiolíticos do DZP (0,75 mg/kg) refletido pelas reduções dos parâmetros FEA e TPA, além da FT e FAL.

Esses resultados podem sugerir que, em condições normais, os sistemas glutamatérgico e GABAérgico agem na SCPD de forma modulatória. A administração local de GLI estimularia os receptores NMDA sobrepondo-se ao sistema GABAérgico potencializado pelo DZP.

Russo et al. (1993) não conseguiram antagonizar o efeito ansiolítico do DZP administrado pela via sistêmica com flumazenil (antagonista dos receptores de GABA-BDZ) microinjetado na SCPD, sugerindo uma ação do BDZ em outras estruturas cerebrais também envolvidas no mecanismo de ansiedade. Neste estudo a estimulação da SCPD pode ter produzido um aumento geral da excitabilidade neural, que resultaria em um bloqueio da ação ansiolítica do BDZ na SCPD e em outras áreas. Por outro lado, como mostra a figura 4, a microinjeção de GLI não antagonizou os efeitos sedativos obtidos a partir do pré-tratamento com doses superiores de DZP (1,5 e 3,0 mg/kg). Sendo assim, os resultados indicam que os efeitos obtidos com a injeção de GLI na SCPD foram específicos para reduzir a ação ansiolítica dos BDZ e que os efeitos sedativos desses compostos devem estar associados a outras regiões cerebrais do SNC, além da SCPD.

Uma vez verificado que a GLI microinjetada na SCPD poderia antagonizar fisiologicamente os efeitos ansiolíticos do DZP administrado sistemicamente, numa segunda etapa nos propusemos a

verificar se a administração de um antagonista do sítio de ligação da GLI poderia potencializar o efeito ansiolítico do DZP. Utilizou-se, então, o ácido 7Cl-QUIN, um antagonista seletivo do sítio de GLI nos receptores NMDA. Stephens et al. (1989) demonstraram que com uma única dose de 7Cl-QUIN, ratos manipulados no LCE mostraram um aumento na exploração dos braços abertos. O mesmo resultado foi obtido por Matheus et al. (1994) usando 7Cl-QUIN (8 mmol) e HA-966 (100 nmol), microinjetados na SCPD. Nos dois casos expostos, o antagonismo do sítio de GLI, insensível à estriçnina, produz efeito ansiolítico, aumentando a exploração nos braços abertos do LCE e o índice geral de atividade.

Sendo o DZP e o 7Cl-QUIN drogas ansiolíticas apesar de atuarem por mecanismos distintos (Corbett et al., 1990, Matheus et al., 1994), esperávamos um aumento desse efeito com a associação IP e IC das duas drogas. Nesse estudo, nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados no LCE mostrou potencialização dos efeitos ansiolíticos do DZP, pelo 7Cl-QUIN, como era esperado. Detectamos, ao contrário, a potencialização do efeito depressor do benzodiazepínico na dose de 0,75 mg/Kg. Porém, uma tendência à potencialização do efeito ansiolítico do DZP foi observada (figura 2 C e D), na dose de 0,375 mg/kg, sustentando a idéia de uma interação entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico na SCPD.

5. AVALIAÇÃO DAS DROGAS GLUTAMATÉRGICAS SOBRE O EFEITO ANSIOGÊNICO DO PENTILENOTETRAZOL

5.1 - Introdução

O PTZ é um convulsivante largamente conhecido, além de causar ansiedade em humanos e em animais (Emmett-Oglesby e Abdel-Malek, 1990). Em humanos, doses subconvulsivantes de PTZ produzem ansiedade intensa e perda do sentido de direção (Rodin e Callhoun, 1970), uma síndrome comportamental que antecede o ataque de pânico. Em ratos, doses subconvulsivantes de PTZ facilitam o comportamento punido (Corda et al., 1992) e induzem estímulos discriminativos que são seletivamente antagonizados por drogas ansiolíticas atuando nos sítios de ligação do receptor GABA-BDZ (Wilson e Bennett, 1989). O PTZ é um bloqueador seletivo do canal de cloreto acoplado ao receptor GABA_A, e seu efeito resume-se à redução da neurotransmissão mediada pelo GABA (Corda et al., 1992).

Os estímulos interoceptivos 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 interoceptivos de caráter ansiogênico se dá com o uso de drogas ansiolíticas que atuam por mecanismos GABAérgicos (Emmett-Oglesby et al., 1990).

Além de produzir efeitos ansiogênicos (Harris et al., 1989), o PTZ em doses maiores (80 mg/kg) pode causar convulsões, sendo

este o seu efeito clássico (Giusti et al., 1991; Kupferberg et al., 1992). Portanto, o PTZ tem sido largamente utilizado como um dos modelos de convulsão para a avaliação farmacológica de drogas com atividades anticonvulsivantes (Jobe e Laird, 1987). Também tem sido mostrado que ratos podem aprender a discriminar o tratamento com PTZ do tratamento com salina e o argumento utilizado para explicar esse fato é que a discriminação está baseada nas propriedades ansiogênicas da droga, e não nas convulsivantes (Lal e Sherman, 1980).

Pellow et al. (1985) demonstraram o efeito ansiogênico do PTZ no LCE. Animais submetidos ao LCE, pré-tratados com PTZ IP, diminuem a exploração no aparato de forma não seletiva, isto é, em ambos os braços abertos e fechados. Também observa-se o efeito ansiogênico do PTZ pelo comportamento de animais no teste de interação social (File e Lister (1984).

Na segunda etapa deste trabalho, utilizamos o PTZ como droga ansiogênica. Nosso objetivo foi verificar se o efeito ansiogênico do PTZ, quando administrado IP, era alterado pela microinjeção de GLI e/ou 7Cl-QUIN administrados na SCPD.

5.2 - Resultados

Nas figuras 5 e 6 estão representados os resultados obtidos na segunda etapa dos experimentos.

O PTZ na dose de 15mg/kg causou um decréscimo significativo da FT, FEA e FAL quando comparados com o grupo controle (Figs. 5A,C e 6A). Embora tenha ocorrido aumentos da FT, da FEF, FEA, do TPA, da FAE e da FL, nenhum desses parâmetros comportamentais atingiu significância estatística com o tratamento do PTZ na dose de 30 mg/Kg. Somente um efeito marginal [$F(13,10)= 1,978$ $P= 0,059$] foi obtido para a FEF (Figs. 5A e 6 A,B).

Os efeitos da GLI foram surpreendentemente similares aos do PTZ para o TPA. Entretanto, foram observadas reduções significantes da FT, da FAE, da FEF e da FL após a associação GLI/PTZ 30mg/kg (Figs. 5A,B e 6A,B).

Interações significantes foram detectadas entre os tratamentos IP e IC para a FEA [$F(2,105)= 20,20$; $P< 0.005$], TPA [$F(2,105)= 9,80$; $P< 0,005$], FEF [$F(2,105)= 7,25$; $P< 0,05$], FAE [$F(2,105)= 8,83$; $P< 0,05$], FL [$F(2,105)= 4,58$; $P< 0,05$] e FAL [$F(2,105)= 15,45$; $P< 0,05$]. Realmente, os baixos níveis de respostas obtidas com PTZ nas duas doses utilizadas foram revertidas pelo tratamento de 7Cl- QUIN, sobretudo na FEA, no TPA e FAL (Figs. 5C,D e 6C), sugerindo um antagonismo do efeito ansiogênico do PTZ pelo 7Cl- QUIN. Também foi observado antagonismo do efeito ansiogênico do PTZ na dose de 15mg/kg pelo 7CL- QUIN para a FEF e para a FL (Figs. 5B e 6B).

Não foram detectados quaisquer efeitos significativos do 7Cl- QUIN na FT como mostra a figura 6A.

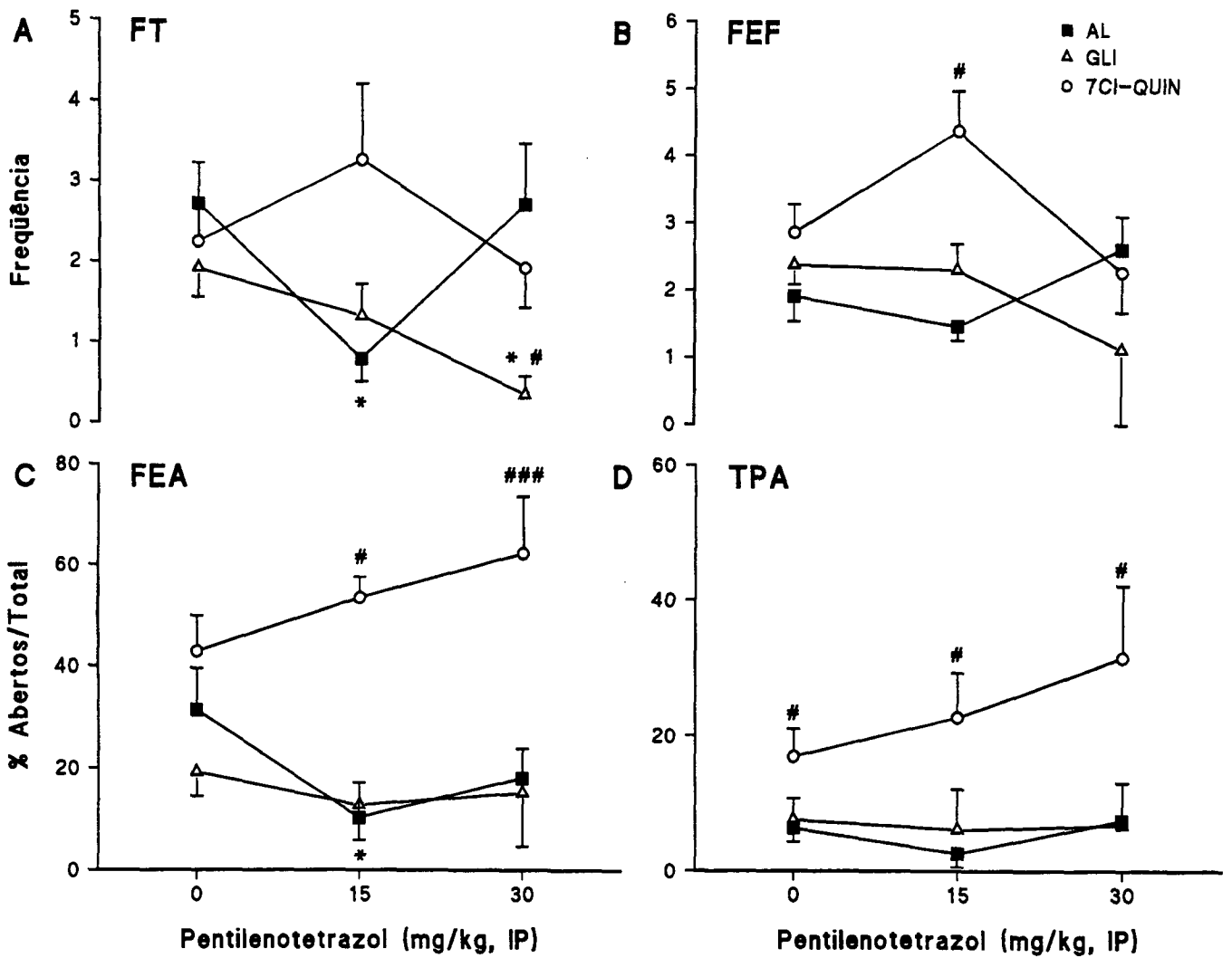


FIGURA 5 - Efeito das drogas glutamatérgicas (7Cl- QUIN e GLI) microinjetadas na SCPD sobre a ação do PTZ, em ratos submetidos ao LCE. A,B,C e D representam respectivamente: a frequência de tentativas (FT), a frequência de entradas no fechado (FEF), a frequência de entradas no aberto (FEA) e o tempo de permanência no aberto (TPA). Cada valor representa a média E.P.M. * = $P < 0,05$; para diferenças significantes entre as doses de DZP. # = $P < 0,05$; ### = $P < 0,001$ diferenças significantes entre as doses IC. N= 13.

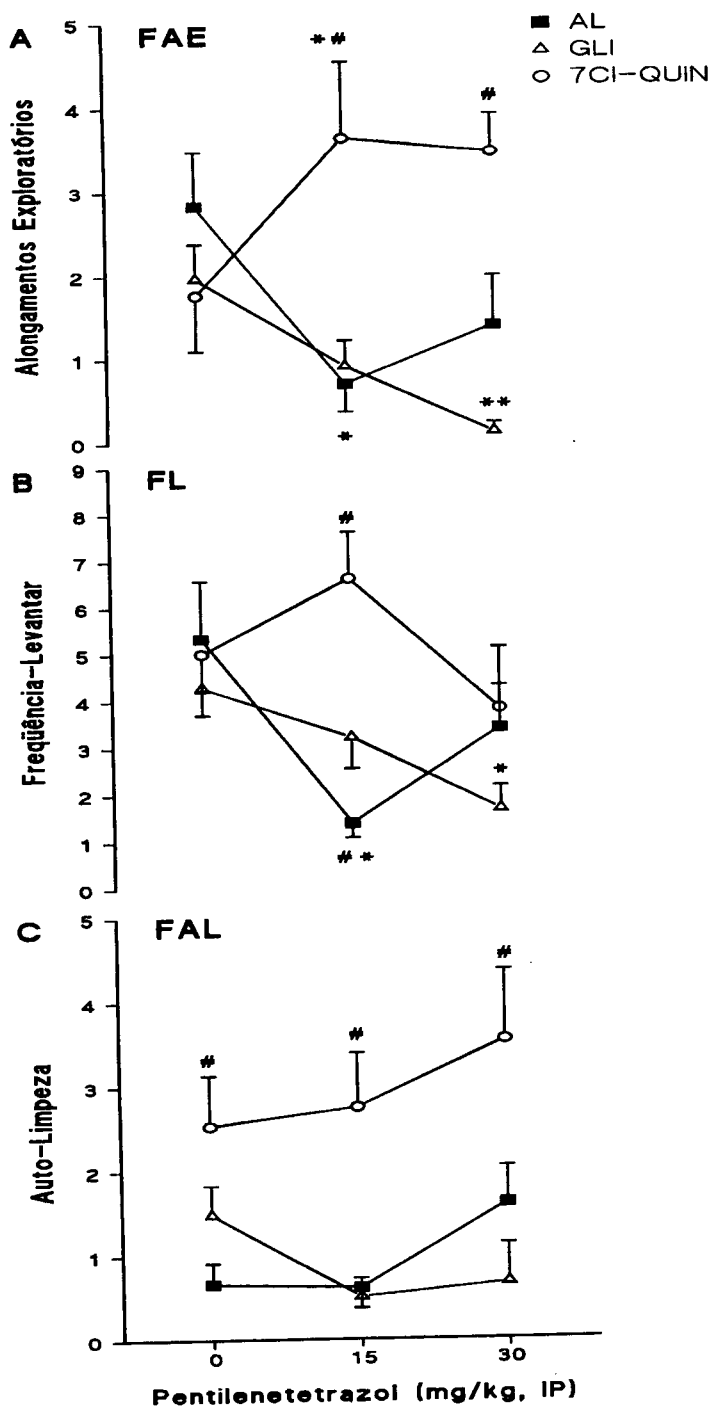


FIGURA 6 - Efeito do 7Cl- QUIN e da GLI microinjetados na SCPD sobre a ação do PTZ, em ratos submetidos ao LCE. A, B e C representam respectivamente: frequência de alongamentos exploratórios (FAE), frequência de levantar (FL) e frequência de auto- limpeza (FAL). Cada valor representa a média E.P.M. N=13. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$ para diferenças significantes entre as doses de DZP. # = $P < 0,05$; para diferenças significantes entre as doses IC.

5.3 - Discussão

Complementando os estudos feitos sobre as interações que podem ocorrer quando drogas são administradas local ou sistemicamente, passamos a analisar nesta segunda etapa do trabalho a ação das drogas glutamatérgicas sobre o efeito ansiogênico do PTZ.

Conforme já mencionado, o PTZ é uma droga ansiogênica muito utilizada como modelo animal de ansiedade (Emmett-Oglesby et al., 1990). No labirinto em cruz elevado, a ação ansiogênica do PTZ é verificada pela redução da FEA e do TPA (Pellow et al., 1985). Em nossos experimentos, na dose de 15mg/kg esses padrões comportamentais sofreram reduções, sendo estas foram também observadas nos comportamentos de atividade geral, como a FT, a FAE, a FAL.

As reduções dos parâmetros comportamentais que sugeriram o perfil ansiogênico do PTZ, resultaram de uma característica própria de drogas com ação ansiogênica. Tais drogas possuem uma propriedade bidirecional de medidas, ou seja, são capazes de reduzir ou aumentar os níveis de ansiedade (Carey et al., 1992). Essa propriedade tem sido verificada em vários modelos animais para roedores, dentre eles encontramos o teste de interação social (Guy e Gardner, 1985), o teste da caixa claro-escuro (Costall et al., 1988), modelos de conflito (Stephens e Kehr, 1985) e o LCE (Pellow e File, 1985). Sobretudo no LCE, ocorre uma certa dificuldade de se obterem respostas ansiogênicas quando comparamos o grupo tratado com o controle, pois os níveis normais de comportamentos exibidos

pelos animais apresentam-se baixos. Além disso, a habilidade dos agentes ansiogênicos para produzir respostas comportamentais opostas àquelas produzidas por ansiolíticos nos modelos acima citados, tem sido bastante questionada (Thiébot et al., 1988).

Os estímulos ansiogênicos do PTZ são revertidos por drogas ansiolíticas que atuam por mecanismos GABAérgicos (Emmett-Oglesby e Abdel-Malek, 1990). Em nossos experimentos, o ácido 7Cl-QUIN, um antagonista do sítio de ligação da GLI nos receptores NMDA, quando microinjetado na SCPD, antagonizou de forma bastante significativa o efeito ansiogênico do PTZ, como mostra a FEA e o TPA no LCE. Esse antagonismo também foi detectado em outros parâmetros comportamentais como a FAE e a FAL. Tais dados vêm corroborar os efeitos ansiolíticos do 7Cl-QUIN por bloqueio do sistema glutamatérgico da SCPD.

Nossos resultados com a microinjeção de GLI na SCPD evidenciaram o perfil ansiogênico da droga, uma vez que os padrões de respostas comportamentais avaliados mantiveram-se constantes. Embora fosse esperada uma potencialização do efeito ansiogênico do PTZ, com a microinjeção de GLI, no geral isso não foi observado.

6. DISCUSSÃO GERAL

A estimulação química da SCP se constitui num modelo animal utilizado para investigar a participação de sistemas neurotransmissores nas respostas do organismo à ansiedade (para revisão ver Graeff, 1987, 1990, 1991, 1993b; Graeff et al., 1988), alguns componentes da reação de defesa (Bandler, 1988; Fanselow, 1991) e nocicepção (Reynolds, 1969; Behbehani et al., 1979).

Por ser uma estrutura integrativa, recebendo projeções de mais de 50 áreas do SNC, como amígdala (Rizvi et al., 1991; Graeff et al., 1993), hipotálamo medial (Olds e Olds, 1963; Lu et al., 1992), hipocampo (Kim et al., 1993), núcleos da rafe (Beitz e Williams, 1991) e colículo inferior (Brandão et al., 1993), o interesse sobre essa estrutura tem crescido nos últimos anos.

Vários trabalhos apontam diversos sistemas neuronais presentes na SCP, notadamente na parte dorsal, tendo sido sugerido que mecanismos GABAérgicos exercem uma inibição tônica sobre a organização de respostas aversivas nessa região (Brandão et al., 1982; Schenberg et al., 1983; Schmitt, 1985), enquanto que outros experimentos como os de Schutz et al. (1985) e Audi et al. (1991) têm mostrado a presença do sistema serotonérgico na SCPD inibindo as respostas aversivas de forma fásica. Além disso, encontramos evidências da participação do sistema opióide (Jenck et al., 1986; Brandão, 1993), do sistema peptidérgico (Da-Silva et al., 1989) e também tendo sido demonstrada por estudos fisiológicos, imuno-histoquímicos e bioquímicos, a neurotransmissão envolvendo os AAE (Carobrez, 1985; Wilklund et al., 1988; Beitz, 1989; Beart et al., 1990).

Os efeitos das drogas microinjetadas na SCPD associadas a injeções periféricas, foram analisados de acordo com os comportamentos observados no LCE. Dentre as razões apontadas por Pellow et al. (1985), validando o LCE como um modelo animal de ansiedade destacam-se: a rapidez, a simplicidade e o não envolvimento de equipamentos de alto custos. Além disso, essa metodologia é baseada no comportamento espontâneo, não envolvendo treinamentos ou estímulos nocivos como dor ou privação de água ou comida. Esse teste mostra-se, ainda, sensível à detecção dos efeitos ansiolíticos agudos de drogas tipo benzodiazepínicos e é bidirecionalmente sensível à manipulação da ansiedade (Rodgers e Cole, 1994).

Nesse teste, a tendência natural de ratos para explorar ambientes novos é confrontada com o medo de espaços abertos e altura (Montgomery, 1955). Porém, Treit e Fundytus (1988) demonstraram que a variação da altura das paredes laterais dos braços abertos produzia efeitos mais significativos sobre a exploração dos braços abertos do que a variação da altura do labirinto *per se*. Esses resultados mostraram que os roedores são altamente tigmotáxicos em ambientes estranhos a eles.

O LCE usado em nossos experimentos foi baseado nas descrições feitas por Handley e Mithani (1984) e Pellow et al. (1985). Quando colocados no LCE, sobretudo nos braços abertos, os animais geralmente mostram manifestações comportamentais (imobilidade ou congelamento) e fisiológicas (defecação e aumento de corticosteróides no plasma (Pellow et al., 1985)). O que se tem mostrado é que as drogas ansiogênicas diminuem a percentagem de

entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, dentro de uma faixa de doses que não afeta a atividade geral ou o total de entradas nos braços (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986). Também é avaliada a frequência de entradas nos braços fechados (Pellow et al., 1985; File, 1992), como índice indicativo de atividade geral.

Nesses aspectos, nossos resultados confirmaram os obtidos na literatura com relação aos efeitos ansiogênicos da GLI e do PTZ e ansiolíticos do DZP e do 7 Cl- QUIN.

Com o passar do tempo, desde a validação do LCE, outros parâmetros comportamentais elaborados pelos animais durante os testes foram sendo incluídos para completar as interpretações dos resultados obtidos com os parâmetros já existentes. Rodgers e Cole (1993) adotaram como medidas de atividade geral no LCE, a FL, a FAL e a FAE. Lopes-da-Silva (1994), Lopes-de-Souza e Carobrez (1992) introduziram no seu protocolo experimental a FT como parâmetro comportamental de atividade geral. Esse parâmetro é caracterizado pelo número de vezes que o animal, estando em um dos braços fechados, ou no centro do LCE, tenta explorar os braços abertos.

A análise fatorial mostrou, contudo, que esse comportamento estaria mais relacionado com atividade de exploração geral do que com ansiosseletividade. Em nossos experimentos esses novos parâmetros comportamentais, associados com os parâmetros denominados "clássicos" (Rodgers et al., 1992; Rodgers e Cole, 1993) foram analisados em relação a cada um dos tratamentos utilizados.

Os animais do grupo LA/DZP (0,75 mg/kg) apresentaram aumentos

da FEA e do TPA, evidenciando o conhecido efeito ansiolítico desse composto (Pellow et al., 1985). Resultados semelhantes foram obtidos por Lopes-da-Silva (1994) e Shepherd et al. (1994) utilizando essa mesma dose, porém sem a manipulação química da SCPD. Os efeitos ansiolíticos da dose de 0,75 mg/kg de DZP foram também evidenciados nos comportamentos de atividade geral como a FT, FAL e FAE e FL.

A auto-limpeza ("grooming") trata-se, na realidade, de um grupo de respostas somáticas, autonômicas e endócrinas associadas com comportamentos adaptativos, os quais asseguram a sobrevivência do animal (Celis e Torre, 1993). Em roedores, o comportamento de auto-limpeza segue uma espécie de hierarquia. Inicia-se mais comumente com limpeza do nariz pelas patas dianteiras que previamente são levadas à boca para serem umidecidas. Seguem-se atos de lambidas pelo corpo, até alcançar a região que envolve o ânus e a genitália.

O comportamento de auto limpeza é um bom recurso para avaliar os efeitos de vários peptídeos, posto que muitos deles, como as adrenocorticotropinas, hormônios estimulantes dos α -melanócitos (ACTH/ μ -MSH) (Gispen e Isaacson, 1981; Dunn e Hurt, 1986), endorfinas e bombesinas (Crawley e Moody, 1983) podem induzir comportamento de auto-limpeza excessivo, tornando-se assim um modo conveniente para estudar a estrutura cerebral na qual o peptídeo atua e quais os neurotransmissores envolvidos no comportamento.

O comportamento de auto-limpeza pode ser provocado com a estimulação elétrica ou química de determinadas áreas do SNC (Spruijt et al., 1986; Van Erp et al., 1993). O núcleo

paraventricular e a área hipotalâmica dorsal (Roeling et al., 1991) têm sido apontadas como regiões que desencadeiam esse comportamento. Roeling et al. (1993) consideram o hipotálamo como uma "área de auto-limpeza" específica. Outras áreas cerebrais como o septo, os núcleos amigdalóides e a SCP, quando estimulados, podem provocar esse comportamento, uma vez que possuem vias aferentes e eferentes com o hipotálamo (Van Erp et al., 1993). A auto-limpeza está relacionada de uma forma muito direta com o estresse, mais precisamente àquele desencadeado por situações novas e conflitantes. Ratos colocados em ambientes estranhos têm o número de auto-limpezas aumentado (Dunn et al., 1981). A significância biológica desse comportamento ainda não está claramente identificada, mas tentamos fazer um elo entre esse comportamento, o modelo animal de ansiedade utilizado neste trabalho e a estimulação química da SCPD. O LCE é um ambiente estranho e aversivo para os animais; a SCPD, por sua vez, já foi apontada como região cerebral desencadeadora (Spruijt et al., 1986) do comportamento de auto-limpeza, e tem sido demonstrado que drogas ansiolíticas podem diminuir a frequência desse comportamento (Crawley e Moody, 1983).

Moody et al. (1985) verificaram que drogas ansiolíticas como o clordiazepóxido ($1\mu\text{M}$) e o DZP ($1\mu\text{M}$) microinjetados no ventrículo, reverteram completamente o comportamento de auto-limpeza induzido por peptídeos. Em nossos resultados, o DZP administrado isoladamente pela via IP aumentou a frequência desse comportamento, o mesmo acontecendo com a administração IC do 7Cl-QUIN. O comportamento de auto-limpeza só foi completamente abolido após a

interação dos tratamentos IP e IC de duas drogas ansiolíticas, o 7Cl-QUIN e o DZP (0,75 mg/kg) respectivamente, o que sugere que a interação de ambos os mecanismos GABAérgico e glutamatérgico podem estar modulando o controle desse comportamento. Além disso, pode-se sugerir que a reversão do comportamento de auto-limpeza, seja decorrente de um efeito depressor resultante da associação das duas drogas relacionadas.

A freqüência de levantar ("rearing") é um comportamento de atividade geral mais relacionado com a exploração de ambientes novos. Drogas estimulantes promovem um aumento desse comportamento, enquanto drogas depressoras deprimem-no (Shillito, 1970). No que tange ao fator ansiedade, a freqüência de levantar tem sido avaliada em testes animais, sendo que o argumento que justifica seu uso é de que o aumento de uma atividade locomotora refletiria uma diminuição do estado de ansiedade experimentado pelo animal (Lister, 1990). Os benzodiazepínicos em doses baixas aumentam a locomoção de animais em ambientes não familiares (Christmas e Maxwell, 1970). Entretanto, drogas estimulantes motoras aumentam a freqüência de levantar sem, no entanto, terem atividade ansiolítica (Cunha e Masur, 1978). Portanto, o comportamento de levantar, quando analisado em um teste comportamental de ansiedade como o LCE, tem que ser relacionado a outros parâmetros comportamentais, de forma que a interpretação dos resultados não incorra em erros (Juraska et al., 1984).

Nossos resultados com relação a esse parâmetro comportamental mostraram que DZP aumentou a FL, dado esse coerente com as observações feitas por Lister (1990) de que no estado de ansiedade,

verifica-se uma diminuição desse comportamento exploratório. Além disso, a associação GLI/PTZ diminuiu a FL. Entretanto, respostas contrárias as nossas foram obtidas por Hugnes (1993) que mostrou que drogas ansiolíticas, administradas por via IP, ao invés de induzir um aumento na FL, promoveram efeito contrário.

Carey et al. (1992) sugeriram que a redução de comportamentos de atividades exploratórias induzida por tratamento com agentes ansiogênicos parece ser a mais consistente mudança comportamental e que essa ação pode ser causada pelos efeitos sedativos. Entretanto, uma das evidências contra esse argumento é a de que nenhum dos agentes ansiogênicos utilizados experimentalmente têm mostrado qualquer sinal de sedação.

A postura de alongamento exploratório ("stretched attend") faz parte de um repertório comportamental designado por Blanchard et al. (1989) como avaliação do risco ("risk assessment"). Esse comportamento é caracterizado pelo alongamento do corpo (patas anteriores, costas e ombros), o mais próximo possível da superfície de contato e retração à posição original (Grant e Makintosh, 1963; Kaesermann, 1986). Há um novo corpo de evidências empíricas dando suporte à visão de que uma diminuição da postura de alongamento exploratório é consistente com a redução da ansiedade (Blanchard et al., 1990; Shepherd et al., 1994) Essa postura ocorre com grande frequência quando o animal está no centro do labirinto em direção aos lados abertos ou da saída dos braços fechados para o centro (Rodgers e Cole, 1992). Num contexto etológico, a postura de alongamento exploratório representa uma hesitação por parte do animal a um ambiente novo ou a um perigo potencial, indicando um

conflito comportamental entre explorar ou fugir. Embora durante esse comportamento o animal exiba tensão e imobilidade com duração e intensidade variáveis, o alongamento exploratório difere bastante do estado de congelamento (Van der Poel, 1979). Para Rodger e Cole (1993), medidas comportamentais como essas, atualmente, parecem ser índices de ansiedade mais sensíveis do que as medidas tradicionais de exploração (tempo e frequência) dos braços abertos do labirinto.

Retomando a discussão dos nossos resultados, verificamos que o DZP na dose de 0,375 mg/kg diminuiu a FAE, porém não de forma estatisticamente significativa. Além disso, houve uma clara evidência da diminuição desse comportamento quando foi feita uma associação entre o tratamento IC de 7Cl-QUIN e IP de DZP 0,75 mg/kg. Shepherd et al. (1994), utilizando uma dose duas vezes maior de DZP, obtiveram uma redução bastante significativa do número de alongamentos exploratórios em um novo modelo animal de ansiedade, o labirinto em zero. Entretanto, resultados menos precisos foram obtidos com as associações 7Cl-QUIN/PTZ e GLI/PTZ com relação a esse parâmetro comportamental.

A GLI é um dos elementos necessários para ativar o canal do receptor NMDA, modula alostericamente o receptor facilitando a abertura do canal. Enquanto tem um papel inibitório nos receptores da medula espinhal sensíveis à estriçnina, tem-se demonstrado também que modula a neurotransmissão excitatória por aumentar a despolarização das membranas dotadas de receptores NMDA em culturas de neurônios (Johnson e Acher, 1987). Em culturas com *Xenopus oocytes* (Kleckner e Dingledine, 1988) e culturas de córtex visual (Huettner, 1989), o requerimento da GLI na operação dos receptores

NMDA é maior do que o aumento das concentrações de GLU.

Quando usamos GLI microinjetada na SCPD, verificamos que para os parâmetros FEA, TPA, como também a FT, FEF e FAL houve um antagonismo sobre o efeito ansiolítico do DZP na dose de 0,75 mg/kg. O antagonismo mencionado obviamente não é farmacológico e sim fisiológico, uma vez que a GLI não é um antagonista de receptores GABA-BDZ, mas sim um agonista de receptores NMDA. Os resultados obtidos com a interação GLI/PTZ evidenciaram os efeitos ansiogênicos de ambas as classes de drogas descritos na literatura (Emmett-Oglesby e Abdel-Malek,1990; Schmitt et al.,1995).

A GLI, quando microinjetada dentro da SCPD, modula de forma alostérica o receptor NMDA, facilitando a abertura do canal iônico presente no receptor (Peterson, 1991). O fato de drogas antagonistas do sítio de ligação da GLI produzirem efeitos ansiolíticos (Corbett e Dunn, 1991; Matheus et al., 1994) e a GLI ser um elemento modulatório essencial para ativar o canal do receptor NMDA (Johnson e Acher, 1987), sugere que no estado de ansiedade os receptores NMDA encontram-se ativados; em outras palavras, o efeito ansiogênico da GLI deve-se então à ativação da transmissão glutamatérgica da SCPD.

Em nossos experimentos as doses de DZP 1,5 e 3,0 mg/kg, administradas pela via sistêmica, produziram um efeito sedativo evidenciado pela redução da atividade geral (FT, FEF,). Podemos verificar que o efeito ansiolítico do DZP na dose de 0,75 mg/kg e o efeito sedativo nas doses superiores a essa processam-se de maneiras diferentes. Enquanto que a GLI consegue antagonizar o efeito ansiolítico do benzodiazepínico, o mesmo não ocorre com o

efeito sedativo. Esse fato pode sugerir uma seletividade da participação da SCPD sobre o efeito ansiolítico, mas não sobre o efeito sedativo. Além disso, partindo-se da observação que a neurotransmissão GABAérgica está presente em várias regiões do SNC, pode-se sugerir que o controle do efeito sedativo deva envolver, além da SCPD, outras estruturas não ativadas pela estimulação dessa região.

Uma vez verificado que a GLI microinjetada na SCPD poderia antagonizar os efeitos ansiolíticos do DZP administrado perifericamente, passou-se a analisar se o efeito ansiolítico do DZP poderia ser potencializado com antagonistas dos receptores NMDA. Recentemente, o ácido 1-aminociclopropano-carboxílico (ACPC), um antagonista parcial dos sítios de GLI nos receptores NMDA, mostrou propriedades ansiolíticas e antidepressivas quando injetado perifericamente (Trullas et al., 1989, 1991), efeito esse atribuído a sua ação antagonista sobre este receptor.

Schmitt et al. (1990) demonstraram o efeito ansiolítico do ácido quinurênico microinjetado na SCPD de ratos colocados no LCE. O ácido quinurênico é um metabólito do triptofano (Mayer e Miller, 1990) que atua como antagonista competitivo dos sítios de GLI nos receptores de NMDA. Batista-da-Silva et al. (1990), microinjetando AP7 (um antagonista do sítio de ligação do GLU nos receptores NMDA) na SCPD, conseguiram reverter o efeito pressor do GLU microinjetado nessa mesma região. Da mesma forma, Guimarães et al. (1990), também usando AP7 na SCPD, obtiveram um efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE.

Efeitos ansiolíticos do HA 966, um antagonista do sítio

modulatório de GLI, foram também descritos para testes de conflito, interação social e LCE (Corbett e Dunn, 1991). Os mesmos resultados foram obtidos por Matheus et al. (1994), usando o 7Cl-QUIN (4 e 8 nmol) e HA-966 (50 e 100 nmol) microinjetados na SCPD. Outros resultados referentes à ação ansiolítica do ácido 7Cl-QUIN foram obtidos por Fletcher et al. (1989), Foster et al. (1990), Pittaluga e Raiteri (1990).

Nos casos acima expostos, com o uso do LCE, o antagonismo dos sítios de GLI insensíveis à estriçnina, produzem efeitos ansiolíticos refletidos pelo aumento da exploração dos braços abertos, aumento do tempo de exploração e o índice geral de atividade (File, 1992). Na primeira etapa dos nossos experimentos, em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados no LCE observamos uma potencialização dos efeitos ansiolíticos do DZP pelo ácido 7Cl-QUIN, como esperado. Especificamente na dose ansiolítica de 0,75 mg/kg, o efeito obtido nos resultados experimentais foi uma redução significativa de todos os parâmetros comportamentais avaliados, sugerindo uma potencialização marcante do efeito depressor do benzodiazepínico.

Stephens et al. (1989) têm estudado os efeitos similares entre benzodiazepínicos e antagonistas do receptor NMDA. Ambas as classes de drogas têm atividade ansiolítica nos testes animais de ansiedade, quando administradas periférica ou centralmente (Stephens et al., 1986; Dunn et al., 1989; Kehne et al., 1991). Esses autores têm sugerido que os efeitos similares produzidos pelos benzodiazepínicos e antagonistas NMDA podem ser devidos a uma estreita interação entre os dois sistemas neuronais (GABAérgico e

glutamatérgico) e não a efeitos isolados dos dois sistemas.

Receptores NMDA estão freqüentemente localizados nos dendritos dos neurônios (Monaghan et al., 1989); assim, os eventos iônicos associados à ativação do receptor NMDA (influxo de cátions) causariam uma propagação da despolarização ao longo da membrana e, dessa forma, influenciariam outros receptores glutamatérgicos (AMPA, cainato, quisqualato). Além disso, a existência de receptores GABA_A sobre os dendritos, por si só significa que a propagação da despolarização pode ser fortemente influenciada pelo influxo de cloreto através dos canais do receptor GABA_A. Sendo assim, uma retroalimentação natural se estabeleceria, pois a despolarização induzida por receptores NMDA poderia ser interrompida por mecanismos GABAérgicos. Da mesma forma, a inativação da inibição modulada pelo receptor GABA por antagonistas ou agonistas inversos dos benzodiazepínicos, poderia levar a uma exacerbação da atividade dos receptores NMDA. De acordo com essa visão, drogas convulsivantes ou ansiogênicas como o PTZ, produziriam seus efeitos por remoção da inibição tônica dos receptores GABAérgicos. Similarmente, drogas com atividades ansiolíticas e anticonvulsivantes como os benzodiazepínicos, propiciariam a inibição tônica dos receptores GABA, o que influenciaria no funcionamento dos receptores NMDA.

De acordo com as sugestões de Stephens et al. (1989) sobre a interação dos dois sistemas neuronais presentes na SCPD, sugerimos que o efeito depressor do DZP 0,75mg/kg, quando administrado conjuntamente com o 7Cl-QUIN, pode ser devido a uma inibição do mecanismo glutamatérgico e, conseqüentemente uma ativação do

sistema GABAérgico, já que se encontraria potencializado pelo benzodiazepínico.

No segundo grupo de experimentos passamos a verificar a interação dessas mesmas drogas sobre o efeito ansiogênico do PTZ. Para a FT, FEA e TPA, parâmetros comportamentais analisados no LCE, o PTZ mostrou um perfil ansiogênico marcante sobretudo na dose de 15mg/kg, semelhante aos resultados obtidos por File et al. (1984), Pellow et al. (1985), Yamamoto e Ueki (1986), Wada e Fukuda (1990, 1991), Giusti et al. (1991), Carey et al. (1992) e Zangrossi e File (1992).

Resultados obtidos com a GLI microinjetada na SCPD, juntamente com PTZ administrado pela via intraperitoneal, refletiram a manutenção do perfil ansiogênico das duas classes de drogas sobre os parâmetros comportamentais avaliados. Uma potencialização total desse perfil ansiogênico foi obtida, com a FT, a FEF, a FAE e a FL. Embora agindo por mecanismos neuronais distintos, os efeitos finais dessas duas classes de drogas são similares, ou seja, ambas tem efeito ansiogênico. Com a associação de GLI/PTZ obtivemos respostas ansiogênicas, enquanto a associação entre 7Cl-QUIN/PTZ mostrou um resultado contrário. O efeito ansiogênico do PTZ foi totalmente revertido pelo 7Cl-QUIN, sugerindo um efeito ansiolítico dessa droga. Provavelmente, ao mesmo tempo que houve redução na inibição GABAérgica tônica pelo PTZ (Simmonds, 1982; Melchior e Ritzmann, 1994; Peterson, 1994), ocorreu bloqueio no sítio de ligação da GLI com o 7Cl-QUIN, inibindo as respostas mediadas pela ativação dos receptores de NMDA.

Se a verificação de respostas comportamentais induzidas por drogas relacionadas a um mesmo mecanismo (agonistas e antagonistas) muitas vezes resulta em respostas incongruentes, muito mais difícil é explicar os resultados obtidos quando usamos drogas que atuam em mecanismos distintos. Por exemplo, várias linhas de evidência sugerem que assim como a SCPD, a amígdala está envolvida com os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (Davis, 1992). Muitas das evidências comportamentais que fornecem suporte a essa hipótese estão relacionadas com situações "conflito", amplamente utilizadas em modelos animais de ansiedade. A esse respeito, Treit (1985) verificou que drogas ansiolíticas administradas sistemicamente antagonizavam as respostas suprimidas pelo conflito. Muito mais importante é que a infusão direta de benzodiazepínicos dentro da amígdala, uma área rica em receptores desse tipo (Schell-Kreuger e Petersen, 1985), tem repetidamente mostrado efeitos anticonflito (ansiolíticos) em ratos (Nagy et al., 1979; Shibata et al., 1989; Petersen et al., 1985; Kataoka et al., 1987; Yamashita et al., 1989). Outros estudos têm mostrado que o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos centralmente administrados pode ser bloqueado pela co-administração de antagonistas específicos como o flumazenil central (Hodges et al., 1987) ou periféricamente (Petersen et al., 1985; Shibata et al., 1989). Além disso, lesões na amígdala também provocaram efeitos ansiolíticos como os benzodiazepínicos. Todos esses resultados levam a crer que a amígdala contém sistemas neuronais que medeiam os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos. Entretanto, há contradições, pois Schell-Kreuger e Petersen (1982) não conseguiram efeitos ansiolíticos com a

infusão de benzodiazepínicos na amígdala. Hodges et al. (1987) não conseguiram antagonizar os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos com antagonista específico neste local enquanto Kopchia et al. (1992), demonstraram que lesões na amígdala não provocaram efeito ansiolítico.

Resultados semelhantes aos descrito acima, também foram obtidos usando a SCPD como foco de estudo. As conseqüências comportamentais e neurovegetativas da estimulação elétrica da SCPD foram atenuadas por injeção sistêmica ou local de drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica (Brandão et al., 1982; Schenberg et al., 1983; Audi e Graeff, 1984; Graeff et al., 1986). Além disso, a microinjeção de antagonistas de GABA dentro da SCPD, induz fortes reações de fuga, similares àquelas induzidas por estimulação elétrica (Brandão et al., 1982), confirmando o envolvimento do sistema GABAérgico e da SCPD nos processos aversivos. Por outro lado, Russo et al. (1993) demonstraram que o efeito ansiolítico do midazolam foi antagonizado por flumazenil, quando ambas as drogas eram administradas localmente na SCPD. Em contrapartida, esses mesmos autores não conseguiram antagonizar os efeitos ansiolíticos do DZP microinjetado na SCPD, quando o flumazenil foi administrado pela via intraperitoneal.

Particularmente, nossos resultados com o 7Cl-QUIN nos levam a sugerir que mesmo estando os dois mecanismos neuronais (glutamatérgico e GABAérgico) presentes na SCPD e agindo de forma modulatória (Stephens et al., 1986, 1989), um perfil puramente ansiolítico só é obtido quando o sistema glutamatérgico é bloqueado como mostram os resultados obtidos com a administração 7 Cl-QUIN/

PTZ. Esse resultado fortalece ainda mais a hipótese de que a SCPD está realmente envolvida com o processo da ansiedade, uma vez que a administração IC de drogas ansiolíticas e/ ou ansiogênicas revertem os efeitos ansiolítico e/ ou ansiogênico de drogas administradas pela via IP. Por outro lado, não é possível ainda afirmar qual o mecanismo fisiológico é o responsável pela manifestação do estado de ansiedade. Estudos farmacológicos como os citados ao longo deste trabalho indicam que a ansiedade não é mediada por um único sistema neuronal. O que se tem observado é que vários sistemas neuronais funcionam de forma mais ou menos modulatória.

O que pode ser sugerido é que o rompimento do balanço homeostático entre esses sistemas neuroquímicos pode resultar no desenvolvimento e expressão da ansiedade, e que agentes que modulam seletivamente esse balanço, são os que podem exibir propriedades ansiolíticas ou ansiogênicas.

7 - CONCLUSÕES

Das respostas dos estudos comportamentais de ratos machos submetidos ao teste do LCE após a administração IC de drogas glutamatérgicas e IP de drogas GABAérgicas, obtivemos as seguintes conclusões:

- 1- O DZP administrado pela via intraperitoneal na dose de 0,75mg/kg mostrou o seu clássico efeito ansiolítico em ratos microinjetados com LA, enquanto que em doses superiores a esta os efeitos foram sedativos.
- 2- A GLI, quando administrada dentro da SCPD, antagonizou o efeito ansiolítico do DZP administrado pela via sistêmica;
- 3- Não foi observado antagonismo sobre o efeito sedativo de doses superiores (1,5 e 3,0 mg/Kg) do DZP pela GLI;
- 4- O 7CL-QUIN administrado dentro da SCPD potenciou o efeito depressor do DZP na dose de 0,75 mg/Kg;
- 5- O 7CL-QUIN administrado na SCPD reverteu o efeito ansiogênico do PTZ administrado pela via sistêmica;
- 6- Somente para os parâmetros FT, FEF, FAE e FL foi observado uma potenciação dos efeitos do PTZ pela administração de GLI na SCPD.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma ação seletiva do sistema glutamatergico da SCPD sobre o efeito ansiolítico /ou ansiogênico de drogas.

Sugere ainda que uma potenciação do sistema glutamatérgico da SCPD no efeito sedativo dos benzodiazepínicos deve ser limitado. Esses resultados também confirmam a hipótese do envolvimento da SCPD na ansiedade e apontam a neurotransmissão por AAE como um possível sítio de ação seletivo para o efeito de drogas ansiolíticas.

ABSTRACT

Periventricular structures such as the medial hypothalamus and the periaqueductal gray matter play an important role in the elicitation of flight and defense reactions in various animal species. The dorsal part of the midbrain periaqueductal gray (DPAG) has been suggested as an integrative region of neuroaxis involved in the maintenance of motivational states of animals. It has been shown that microinjection of drugs that either enhance or mimic the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA), here including benzodiazepine anxiolytics, as well as drugs that facilitate serotonergic neurotransmission, into the DPAG, decrease the aversive consequences of DPAG electrical stimulation (ES). Therefore, neurons in the DPAG controlling aversion seem to be under the inhibitory modulation of GABA and 5-HT. In contrast, endogenous excitatory amino acids (EAA) may play a modulatory role, after the demonstration that several EAA-antagonists applied to the DPAG, attenuated behavioral and cardiovascular defense reactions elicited by ES of either the DPAG or the medial hypothalamus. Recently, several NMDA antagonists have shown anxiolytic-like effects when administered peripherally in different animal models. These results suggest that NMDA receptors also play an important role in modulation of aversive reactions linked to DPAG. To investigate the possible DPAG glutamatergic influence on the anxiolytic or anxiogenic effects of systemic injected drugs, related to GABAergic neurotransmission, the elevated plus-maze test (EPM), was used in rats previously implanted with cannulas aimed to the DPAG. Systemic injections of PTZ (15 or 30 mg/kg) or DZP (0.375, 0.75, 1.5 e 3.0 mg/kg) were followed (15 min) by a single microinjection (0.4 μ l) of artificial cerebrospinal fluid (ACSF), 7Cl-QUIN (8 nmol) or GLI (80 nmol). In subsequent intervals of 5 min the animals were placed in a wooden arena, and in the EPM. Behavioral measures comprised: number of entries and of time spent on open (NEO, TSO, respectively) arms; number of stretch-attend postures (SAP); number of rearing (NR), number of grooming (NG) and number of aborted attempts (NA) to reach the open arms. In the first set of experiments we verified the actions of glutamatergic drugs (7Cl-QUIN and GLI) over the anxiolytic effects of DZP. We

first set of experiments we verified the actions of glutamatergic drugs (7Cl-QUIN and GLI) over the anxiolytic effects of DZP. We observed that DZP at the dose of 0,75 mg/kg, showed selective anxiolytic effect in the following parameters: NEO, TSO. No significant effects were observed in the other parameters. Microinjection of GLI into DPAG antagonized the anxiolytic effect of DZP showed by NEO reduction, however, the sedative effect induced by DZP at doses over 3.0 mg/kg was not blocked by GLI; this suggests a specific DPAG glutamatergic role only for the anxiolytic effects but not for the sedative effects of the DZP. Microinjection of 7Cl-QUIN into DPAG, depressed the EPM performance reducing all the parameters studied. In the second set of experiments, we verified the actions of the same glutamatergic drugs over the anxiogenic effects of PTZ. Microinjections of 7Cl-QUIN statistically increased all parameters studied, if compared with the ACSF curve, indicating that treatment with 7Cl-QUIN antagonized the anxiogenic effects of PTZ. Moreover, we verified that the microinjection of GLI did not change dose-response curve, when compared to control (ACSF curve). Our results confirm the participation of DPAG in anxiety, as well as suggest an interaction of both glutamatergic and GABAergic systems in the modulation of neuronal mechanisms associated to the anxioselective effects of drugs. However, additional experiments will be necessary to understand how this interaction occur.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.B. Brain mechanisms for offense, defense and submission. Behav. Brain Sci., 2: 201-241, 1979.
- ADDAE, J.I.; STONE, T.W. Effects of topically applied excitatory amino acid on evoked potentials and single cell activity in rat cerebral cortex. Eur. J. Pharmacol., 121: 337-343, 1986.
- ADVOKAT, C.; PELLEGRIN, A.L. Excitatory amino acids and memory-evidence from research on Alzheimer's disease and behavioral pharmacology, Neurosci. Biobehav. Rev., 16: 13-24, 1992.
- ALBIN, R.L.; MAKOWIEC, R.L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE IV, L.S.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. Neurosci. Lett., 118: 112-115, 1990.
- APPEL, S.H. Exitotoxic neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. Trends Neurosci., 16: 3-5, 1993.
- AUDI, E.A.; GRAEFF, F.G. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal gray mediated anti-aversive drug action. Eur. J. Pharmacol., 103 : 279-285, 1984.
- AUDI, E.A.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Mediation by serotonin of antiaversive effect of zimelidine and propranolol injected into the dorsal midbrain central gray. J. Psychopharmacol., 2: 26-32, 1984.
- AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, C.E.; GRAEFF, F.G. Serotonergic mediation of the anxiolytic effect of intracerebrally injected propranolol measured in the elevated plus-maze, Braz. J. Med. Biol. Res., 22: 699-701, 1989.
- AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, R.M.W.; GRAEFF, F.G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by

- ritanserin. Psychopharmacology, 105: 553-557, 1991.
- BANDLER, R. Induction of "rage" following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. Neurosci. Lett. 30: 183-188, 1982.
- BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region, Prog. Psychobiol. Physiol. Psychol., 13: 67-222, 1988.
- BANDLER, R.J.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurons mediating defensive behavior in the rat by microinjection of excitatory amino acids, Behav. Brain Res., 15: 107-119, 1985.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZANG, S.P. Integration of somatic in the autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: vicerotopic, somatotopic and functional organization, Prog. Brain Res., 87: 269-305, 1991.
- BARBARESI, S.; MANFRINI, E. Glutamate descarboxy lase-immunoreactive neurons and terminal in the periaqueductal gray of the rat. Neuroscience, 27: 183-191, 1988.
- BASKYS, A. Metabotropic receptors and 'slow' excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. TINS, 15 (3): 92-95, 1992.
- BATISTA-DA-SILVA, A.P.; RAE, G.A.; CAROBREZ, A.P. Microinjection of D-2-amino-7-phosphonoheptanoate into the dorsal periaqueductal gray matter reduces the pressor response to glutamate injected at the same site. Braz. J. Med. Biol. Res., 23: 705-708, 1990.
- BEART, P.M.; SUMMERS, R.J.; STEPHENSON, J.A.; COOK, C.J.; CHRISTIE, M.J. Excitatory amino acid projections to the

- periaqueductal gray in the rat: a retrograde transport study utilizing D[³H]aspartate and [³H]GABA. Neuroscience, 34: 163-176, 1990.
- BEHBEHANI, M.M.; FIELDS, H.L. Evidence that an excitatory connection between periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia, Brain Res., 170: 85-93, 1979.
- BEITZ, A.J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. Neuroscience, 7 (1): 133-159, 1982.
- BEITZ, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions, J. Comp. Neurol., 237: 445-459, 1985.
- BEITZ, A.J. Possible origin of glutamatergic projections to the midbrain periaqueductal gray and deep layer of the superior colliculus of the rat. Brain Res. Bull, 23: 25-35, 1989.
- BEITZ, A.J.; WILLIAMS, F.G. Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG-Raphe magnus pathway, The Midbrain Periaqueductal Gray Matter. New York: Plenum Press, 1991. p. 305-327.
- BETZ, H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain, Tins, vol. 14, 10: 458-461, 1991.
- BLANCHARD, D.C.; RODGERS, R.J.; HORI, K.; HENDRIE, C.A. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. Psychopharmacology, 97: 269-278, 1989.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; TOM, P.; RODGERS, R.J. Diazepam alters risk assessment in an anxiety/defensive test battery. Psychopharmacology, 101: 511-518, 1990.

- BRANDAO, M. L.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA Mediation of the antiaversive action of minor tranquilizers. Pharmacol. Biochem. Behav. 16: 397-402, 1982.
- BRANDÃO, M.L.; LOPES-GARCIA, J.A.; ROBERTS, M.H.T. Electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT₂ receptors in the antiaversive action of 5-HT in the dorsal periaqueductal gray. In: SLANGEN J.L.; OLIVIER, B.; MOS, J. (Eds) Animal Models of Psychopharmacology. Birkhauser : Basel, 1991. p. 75-79.
- BRANDÃO, M.L. Involvement of opioid mechanisms in the dorsal periaqueductal gray in drug abuse. Neurosci., 4: 397-405, 1993.
- BRANDÃO, M.L.; MELO, L.L.; CARDOSO, S.H. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. Behav. Brain Res., 58: 49-55, 1993.
- BRETT, R.R.; PRATT, J.A. Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus maze. Eur. J. Pharmacol. 178: 135-138, 1990.
- BURT, D.R.; KAMATCHI, G.L. GABA A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. The FASEB journal, 5: 2916-2918, 1991.
- CARLSSON, M.; CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease. Trends Neurosci., 13: 272-276, 1990.
- CAREY, G.J.; COSTALL, B.; DOMENEY, A.M.; JONES, D.N.C.; NAYLOR, R.J. Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. Pharmac. Bioch. Behav., 42: 143-153, 1992.
- CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In: BRANDÃO M.L. (Ed.) Neuroscience and Behavior. Vitória : UFES, 1987. p. 21-29.

- CARRIVE, P.; BANDLER, R.; DAMPNEY, R.A.L. Viscerotopic control of regional vascular beds by discrete groups of neurons within the midbrain periaqueductal gray. Brain Res., 493: 385-390, 1989.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization, Behav. Brain Res., 58: 27-47, 1993.
- CASTRO, M. F. S.; SCHENBERG, L. C. Cardiovascular change in response to prolonged defense area stimulation in freely moving rats. Braz J. Med. Biol. Res., 22: 115-119, 1989.
- CELIS, M.E.; TORRE, E. Measurement of grooming behavior. Meth. Neurosci., 14: 378-388, 1993.
- CHOI, D. W.; MAULUCCI-GEDDE, M.A.; KRIEGSTEIN, A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J. Neurosci., 7: 357-368, 1987.
- CHOI, D.W. Glutamate toxicity and diseases of the nervous system. Neuron, 1: 623-624, 1988.
- CHOI, D.W.; ROTHAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Ann. Rev. Neurol., 13: 171-182, 1990.
- CHRISTMAS, A.J.; MAXWELL, D.R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. Neuropharmacology, 9: 17-29, 1970.
- COIMBRA, C.N.; BRANDÃO, M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. Behav. Brain Res., 59: 131-139, 1993.
- COLLINGRIDGE, G.L.; BLAKE, J.F.; BROWN, M.W. et al. Involvement of excitatory amino acid receptors in long-term potentiation in the

- Schaffer collateral commissural pathway of rat hippocampal slices. Can. J. Physiol. Pharmacol. 69: 1084-1090, 1991.
- CORBETT, R.; FIELDING, S.; CORNFELDT, M.; DUNN, R.W. GABA_A mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus maze procedures, Psychopharmacology, 104: 312-316, 1990.
- CORBETT, R.; DUNN, R.W. Effects of HA-966 on conflict, social interaction and plus maze behaviors, Drug Dev. Res., 24: 201-203, 1991.
- CORDA, M.G.; ORLANDI, M.; GIORGI, O. Decrease in GABA_A receptor function induced by pentylenetetrazole kindling in the rat: Role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. In: BIGGIO, G.; COSTA, E. GABAergic Synaptic Transmission. New York : Raven Press, 1992. p. 235-247.
- CRAWLEY, J.N.; MOODY, T.W. Anxiolytics block excessive grooming behavior induced by ACTH_{1-24}} and bombesin. Brain Res. Bull., 10: 399-401, 1983.
- CUNHA, J.M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test, Pharmacology, 16: 259-267, 1978.
- CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W.; XXINS, J.C. Chemical excitation of spinal neurones. Nature, 183: 611-612, 1959.
- DA-SILVA, S.L.; BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C. Behavioral effects of neurotensin applied to periventricular structures of rats. Braz. J. Med. Biol. Res., 22: 711-715, 1989.
- DAVIS, M. Diazepam and flurazepam: effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. Psychopharmacology, 62: 1-7, 1979.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. Ann.

Rev. Neurosci., 15: 353-375, 1992.

DEAKIN, J.F. A review of clinical efficacy of 5-HT_{1A} agonists in anxiety, J. Psychopharmacol., 7(3):283-289, 1993.

DELGADO, J.M.R.; ROBERTS, W.W.; MILLER, N.E. Learning motivated by electrical stimulation of the brain. Am. J. Physiol., 179: 587-593, 1954.

DEPAULIS, A.; VERGNER, M. Elicitation of intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of picrotoxin, a GABA antagonist, into the midbrain periaqueductal gray matter, Bray Res., 367: 87-95, 1986.

DINGLEDINE, R.; McBAIN, C.J.; McNAMARA, J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Trends Pharmacol. Sci., 11: 334-338, 1990.

Di SCALA, G.; MANA, M.J.; JACOBS, W.J.; PHILLIPS, A.G. Evidence for Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal gray in the rat. Physiol. Behav., 40: 55-63, 1987.

DUNN, A.J.; GUILD, A.L.; KRAMARCY, N.R.; WARE, M.D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or β -endorphin. Pharmacol. Biochem. Behav., 15: 605-608, 1981.

DUNN, R.W.; HURT, R.W. ACTH acts via an anterior ventral third ventricular site to elicit grooming behavior. Peptides, 7: 651-657, 1986.

DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. Eur. J. Pharmacol., 169: 1-10, 1989.

DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT_{1A} receptor

agonists and NMDA in the social interaction test and the elevated plus maze. Eur. J. Pharmacol., 169: 1-10, 1989.

EMMETT-OGLESBY, M.W.; ABDEL-MALEK, S.L. Assessment of zolpidem and CI-966 for anxiolytic and anxiogenic properties by using the discrimination of pentylentetrazole by rats. Drug Dev. Res., 21: 243-252, 1990.

EMMETT-OGLESBY, M.W.; MATHIS, D.A.; MOON, R.T.Y.; LAL, H. Animal models of drug withdrawal symptoms. Psychopharmacol., 101: 292-309, 1990.

ERDO, S.L. Excitatory amino acid receptors in the mammalian periphery. TIPS, 12: 426-429, 1991.

ETIENNE, P.; BAUDRY, M. Role of excitatory amino acid neurotransmission in synaptic plasticity and pathology - an integrative hypothesis concerning the pathogenesis and evolutionary advantages of schizophrenia - related genes. J. Neural Transm., 39-48, 1990.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In A. Depaulis and R. Bandler (Eds.) The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization. New York : Plenum, 1991. p. 151-173.

FAZELI, M.S. Synaptic plasticity: on the trail of the retrograde messenger, TINS, vol.15, 4: 115-117, 1992.

FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Central representation of affective reaction in forebrain and brainstem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. J. Physiol., 145: 251-265, 1959.

FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Organization of the

subcortical system governing defense and flight reaction in the cat. J. Physiol. (London) 160: 200-213, 1962.

FILE, S.E.,; LISTER, R.G. Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylenetetrazole indicate anxiogenic actions? Neuropharmacology, vol.23, 7A: 793-796, 1984.

FILE, S.E. The search for novel anxiolytics. TINS, vol.10, 11: 461-463, 1987.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S.; ANDREWS, N. Diazepam withdrawal responses measured in the social interaction test of anxiety and their reversal by baclofen, Psychopharmacology, 104: 62-66, 1991.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOT, J. M.; HEAL D.J.; MARSDEN C.A. (Eds). Experimental approaches to anxiety and depression. New York : Bendley, 1992. p.25-44.

FLETCHER, E. J.; MILLAR, J. D.; LADGE, D. Non-Competitive antagonism of N-methyl-D-aspartate by displacement of an endogenous glycine-like substance. Eur. J. Neurosci. 1: 196-203, 1989.

FONTANA, D.J.; McCLOSKEY, T.C.; JOLLY, S.K.; COMMISSARIS, R.L. The effects of beta-antagonists and anxiolytics on conflict behavior in the rat, Pharmacol. Biochem. Behav., 32: 807-813, 1989.

FOSTER, A.C.; WILLIS, C.L.; TRIDGETT, R. Protection against N-methyl-D-aspartate receptor mediated neuronal degeneration in rat brain by 7-chlorokynurenate and 3-amino-1-hydroxypyrrolid-2-one, antagonists at the allosteric site for glycine, Eur. J. Neurosci., 2: 270-277, 1990.

FUKUDA, N.; WADA, T. Pharmacologic profile of a new anxiolytic, DN-2327: effect of RO-15-1788 and interaction with diazepam rodents. Psychopharmacology, 103-314-322, 1991.

- GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on parachlorophenylanine (PCPA) attenuation of conflict behavior. Eur. J. Pharmacol., 9: 319-324, 1970.
- GERRITS, P.O.; CROON, D.H.; HOLSTEGE, G. A new subdivision of the rat periaqueductal gray based on its myeloarchitecture. Neurosci. Lett., 16:232-236, 1993.
- GISPEN, W. H.; ISAACSON R. L., ACTH-induced excessive grooming in the rat. Pharmacol. Ther., 12: 209-246, 1981.
- GIUSTI, P.; GUIDETTI, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. The preferential antagonism of pentylentetrazole proconflict responses differentiates a class of anxiolytic benzodiazepines with potential antipanic action. J. Pharmacol. Exper. Ther., 257 (3): 1062-1068, 1991.
- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. Braz. J. Med. Biol. Res. 14: 239-265, 1981.
- GRAEFF, F.G. The antiaversive action of drugs. In: THOMPSON, T.; DEWS, P. B.; BARRETT, J. E. (Ed.) Advances in Behavioral Pharmacology, Vol 6 - Neur. Pharm. Erlbaum : Hillsdale, NJ 1987. p. 156.
- GRAEFF, F.G. Brain defense systems in anxiety. In: ROTH, M.; BURROWAS, G.D.; NOYES, R. (Eds.) Handbook of Anxiety. Amsterdam: Elsevier, 1990. v. 3, p. 307-354.
- GRAEFF, F.G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: BRILEY, M.; FILE, S.E. (Eds.) New Concepts in Anxiety, London : MacMillan, 1991. p. 288-312.
- GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. Neurobiologia das doenças mentais. São Paulo : Lemos, 1993a. p. 109-144.

- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. Neuroscience, 4: 181-211, 1993b.
- GRAEFF, F.G.; SCHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. J. Pharmacol. Exp. Ther., 173: 277-283, 1970.
- GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; AUDI, E.A.; SCHUTZ, M.T.B. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. Behav. Brain Res., 21: 65-72, 1986.
- GRAEFF, F.G.; CAROBREZ A.P.; SILVEIRA, M.C.L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: CAVALHEIRO, E.A.; LEHMAN, J.; TURSKI L. (Eds) Frontiers in excitatory amino acids research. New York : Liss, 1988 p. 325-332.
- GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. Behav. Brain Res., 58(1-2): 123-131, 1993.
- GRANT, E.C.; MACKINTOSH, J.H. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents, Behavior, 21: 246-259, 1963.
- GRAY, J.A. The behavioral inhibition system: a possible substrate for anxiety. In: FELDMAN, R.S.; BROADHURST, P.L. Theoretical and Experimental Basis of the Behaviour Therapies. New York : John Wiley, 1976. p. 3-41.
- GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE-AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptors antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray, Psychopharmacology, 103: 91-94, 1990.
- GUY, A.P.; GARDNER, C.R. Pharmacological characterisation of a modified social interaction model of anxiety in the rat. Neuropsychopharmacol., 13: 194-200, 1985.

- HAEFELY, W.E. Pharmacology of the benzodiazepine receptor. Eur. Arch Psychiat. Neurol. Sci., 238: 294-301, 1989.
- HAEFELY, W.E. The GABA_A-Benzodiazepine Receptor Complex and Anxiety, In: SARTORIUS, N.; ANDREOLI, V.; CASSANO, G.; EISENBERG, L.; KIELHOLZ, P.; PANCHERI, P.; RACAGNI, G. (Eds.) Anxiety. Psychobiological and Clinical Perspectives. New York : Hemisphere Publishing Corporation, 1990. p. 23-36.
- HAEFELY, W.E.; FACKLAM, M.; SCHOCH, P.; MARTIN, J.R.; BONETTI, E.P.; MOREAU, J.L.; JENK, F.; RICHARDS, J.G. Partial agonists of benzodiazepine receptors for the treatment of epilepsy, sleep, and anxiety disorders. In: GABAergic Synaptic Transmission. [S.l.: s.e.], 1992. p. 379-394.
- HALPAIN, S.H.; WIECZOREK, C.M.; RAINBOW, T.C. Localization of L-glutamate receptors in rat brain by quantitative autoradiography. J. Neurosci., 4: 2247-2258, 1984.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour, Naunnyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol., 327: 1-5, 1984.
- HANDLEY, S.L.; McBLANE, J.W. 5-HT drugs in models of anxiety. Psychopharmacology , 112: 13-20, 1993.
- HANDLEY, S.L. Future Prospects for the Pharmacological Treatment of Anxiety. Drug Therapy, 5: 397- 414, 1994.
- HARRIS, E.W.; GANONG, A.H.; COTMAN, C.W. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors, Brain Res., 323: 132-137, 1984.
- HARRIS, C.M.; EMMETT-OGLESBY, M.W.; LAL, H. Sensitivity of pentylenetetrazol discrimination increased by a stimulus fading technique. Psychopharmacology, 98 (4): 460-464, 1989.

- HARVERY, S.G. Hipnoticos e sedativos. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Eds.) Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1991. p. 228-252.
- HESS, W.R.; BRUGER, M. Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 1: 33-52, 1943.
- HILTON, S.M.; REDFERN, W.S. A research for brain system cell groups integrating the defence reaction in the rat. J. Psychophysiol., 378: 213-228, 1986.
- HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic affects on punished responding but not discrimination. Psychopharmacology, 92:491-504, 1987.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors, Ann. Rev. Neurosci., 17: 31-108, 1994.
- HOLSTEGE, G. An anatomical study on the final common pathway for vocalization in the cat, J. Comp. Neurol., 284: 242-262, 1991.
- HÖKFEIT, T.; LJUNDAHL, Å. Cellular localization of labelled gamma-aminobutyric acid (³H-GABA) in rat cerebellar cortex: an autoradiographic study, Brain Res., 22: 391-396, 1970.
- HUETNNER, J.E. Indole-2-carboxylic acid: a competitive antagonist of potentiation by glycine at the NMDA receptor. Science, 243: 1611-1613, 1989.
- HUGHES, R.N. Effects on open-field behavior of diazepam and buspirone alone and in combination with chronic caffeine. Life Sci., 53: 1217-1225, 1993.
- HUSPEGER, R.W. Affektreaktionen auf elektrische reizung in hirmstamm der katze. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 14: 70-92, 1956.

- IMPERATO, A.; DiCHIARA, G. Behavioural effects of GABA-agonists infused in the mesencephalic reticular formation-deep layers of superior colliculus, Brain Res., 224: 185-194, 1981.
- IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory, Trends Pharmacol. Sci., 12: 128-129, 1991.
- JACQUET, Y.F.; LAJTHA, A. The periaqueductal gray: site of morphine analgesia and tolerance as shown by 2-way cross tolerance between systematic and intracerebral injections, Brain Res., 103: 501-513, 1976.
- JACQUET, Y.F.; LAJTHA, A. Paradoxical effects after microinjection of morphine in the periaqueductal gray matter. Science, 185: 1055-1057, 1974.
- JANSEN, K.L.R.; FAULL, R.L.M.; DRAGUNOW, M. Excitatory amino acid receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of [³H]TCP, [³H]GLYCINE, L-[³H]GLUTAMATE, [³H]AMPA and [³H]KAINIC acid binding sites, Neurosci., 32 (3): 587-607, 1989.
- JENCK, F.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: an intensity discrimination study. Brain Res., 378: 274-284, 1986.
- JOBE, D.C.; LAIRD II, H.E. Neurotransmitter systems and the epilepsy models. Distinguishing features and unifying principles. New York : Humana Press, 1987. p. 336-339.
- JOHNSON, J.W.; ACHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, Nature, 325: 529-531, 1987.
- JURASKA, J.M., HENDERSON, C.; MÜLLER, J. Differential rearing experience, gender, and radial maze performance, Develop. Psychobiol., 17: 209-215, 1984.

- JURGENS, U.; PRATT, R. Role of the periaqueductal gray in vocal expression of emotion, Brain Res., 167: 367-378, 1989.
- KATAOKA, Y.; SHIBATA, K.; YAMASHITA, K.; UEKI, S. Differential mechanisms involved in the anticonflict action of benzodiazepines injected into the central amygdala and mammillary body, Brain Res., 416: 243-247, 1987.
- KAESERMANN, H.P. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. Psychopharmacology 89: 519, 1986.
- KEAY, K.A.; BANDLER, R. Deep and superficial noxious stimulation increases fos-like immunoreactivity in different regions of midbrain periaqueductal gray. Neurosci. Lett., 154: 23-26, 1993.
- KEAY, K. A.; REDGRAVE, P.; DEAN, P. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus, Brain Res. Bull., 20: 13-26, 1988.
- KEHNE, J.H.; McCLOSKEY, T.C.; BARON, B.M.; SHI, E.M.; HARRISON, B.L.; WHITTEN, J.P.; PALFREYMAN, M.G. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation induced ultrasonic vocalization. Eur. J. Pharmacol., 193: 283-292, 1991.
- KIM, J.J.; RISON, A.R.; FANSELOW, S.M. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. Behav. Neurosci., 107: 1093-1098, 1993.
- KLECKNER, N.W.; DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes, Science, 241: 835-837, 1988.
- KNOFLACH, F.; RHYNER, T.; VILLA, M. The γ subunit of GABA_A-receptor confers sensitivity to benzodiazepines receptor ligands. FEBS Lett., 293: 191-194, 1991.

- KOPCHIA, K.L.; AHMAN, H.J.; COMMISSARIS, R.L. Effects of lesion of the central nucleus of amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 43: 453-461, 1992.
- KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat, Braz. J. Med. Biol. Res., 18: 61-67, 1985.
- KUPFERBERG, H.J. Strategies for identifying and developing new anticonvulsant drugs. [S.l.] : Pharmaceutisch Weekblad-Scientific, 1992. p. 132-138.
- LAEMLE, L.K. Neuronal populations of the periaqueductal gray, nucleus lateralis, J. Comp. Neurol., 186: 93-108, 1977.
- LAL, H.; SHERMAN, G.T. Interoceptive discriminative stimuli in the development of CNS drugs and a case of an animal model of anxiety. Ann. Rep. Med. Chem., 15: 51-58, 1980.
- LAUNAY, J.M.; CALLEBERT, J.; BONDOUX, P.; LORIC, S.; MAROTEAUX, L. Serotonin receptors and therapeutics. Cel. Mol. Biol., 40 (3): 327-336, 1994.
- LEESON, P.D. Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: Drug Design for Neuroscience. New York : Raven Press, 1993. p. 339-381.
- LIPTON, S.A. Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor? TINS, 15 (3): 75-79, 1992.
- LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse, Psychopharmacol., 92: 180-185, 1987a.
- LISTER, R.G. Interactions of Ro 15-4513 with diazepam, sodium pentobarbital and ethanol in a hole-board test. Pharmac. Biochem. Behav., 28: 75-79, 1987b.

- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders, Pharmac. Ther., 46: 312-340, 1990.
- LISÝ, V.; DVORÁKOVÁ, L.; STASTNÝ, F. Altered glutamate binding following quinolinate lesions in developing rat brain, Exper. Neurol., 125: 82-86, 1994.
- LOPES-DA-SILVA, N. Alteração no comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado em função da idade, do sexo e do isolamento social. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1994.
- LOPES-DE-SOUZA, A.S.; CAROBREZ, A.P. Avaliação quantitativa e qualitativa da ansiedade no labirinto em cruz elevado através do índice de conflito. VII Reunião Anual da FESBE. Caxambu, 1992. Resumos... 1.21.
- LU, CHANG-LIN.; SHAIKH, M.B.; SIEGEL, A. Role of NMDA receptors in hypothalamic facilitation of feline defensive rage elicited from the midbrain periaqueductal gray, Brain Res., 581: 123-132, 1992.
- MAC DONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABA_A receptor channels. Annu. Rev. Neurosci., 17: 569-602, 1994.
- MARAGOS, W.F.; CHU, D.C.M.; GREENAMYRE, J.T.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. High correlation between the localisation of [³H]-TCP binding and NMDA receptors. Eur. J. Pharmacol., 123: 173-174, 1986.
- MATHEUS, M.G.; NOGUEIRA, R.L.; CAROBREZ, A.P.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. Psychopharmacology, 113: 565-569, 1994.

- MAYER, M.L.; MILLER, R.J. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. TIPS, 11: 254-260, 1990.
- MCCABE, R. T.; WAMSLEY, J. K. Autoradiographic localization of subcomponents of the macromolecular GABA receptor complex. Life Sci., 39: 1937-1945, 1986.
- MCENTEE, W.J.; CROOK, T.H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain, Psychopharmacology, 111: 91-401, 1993.
- MELCHIOR, C.L.; RITZMANN, R.F. Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice on the plus maze, Pharmacol. Biochem. Behav., 47 (3): 437-441, 1994.
- MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease, TIPS, 11: 379-387, 1990.
- MERLIS, J.K. The effect of changes in the calcium content of the cerebrospinal fluid on spinal reflex activity in the dog. Am. J. Physiol., 90: 1011-1034, 1940.
- MODY, I.; DE KONICKY, D.; OTIS, T.S.; SOLTESZ, I. Bridging the cleft at GABA synapse in the brain. Trends Neuropharmacol. Sci., 17: 12, 1994.
- MOODY, T.W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J.N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior, Proc. Natl. Acad. Sci.: 281-290, 1985.
- MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.; COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29: 365-402, 1989.

- MONAGHAN, D.T.; COTMAN, C.W. The distribution of [³H] kainic acid binding in rat CNS as determined by autoradiography. Brain Res., 252: 91-100, 1982.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. J. Comp. Physiol. 48: 254-260, 1958.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour, J. Comp. Physiol. Psychol., 48: 254-260, 1955.
- MORRIS, R.G.M. 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, 1989.
- MOTTA, V.; BRANDÃO, M.L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. Pharmacol. Biochem. Behav., 44: 119-125, 1993.
- NAGY, J.; ZAMBO, K.; DECSI, L. Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid applications in the rat. Neuropharmacology, 18: 573-576, 1979.
- NASHOLD Jr., B. S.; WILLIAM, P. M. D.; SLAUGHTER, G. D. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. J. Neurosurg. 30: 14-24, 1969.
- NASHOLD Jr., B.S.; WILSON, N. P.; SLUGTTER, G. S. The midbrain and pain. In: BONICA, J. J. Advances in Neurology. New York : Raven press, New York, 1974. p. 191-196.

- NESTLER, E.J.; HOPE, B.T.; WIDNELL, K.L. Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. Neuron, 11: 995-1006, 1993.
- OLDS, M.E.; OLDS, J. Approach avoidance analysis of rat diencephalon. J. Comp. Neurol., 120: 259-295, 1963.
- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze test in the rat. J. Pharmacol., 39: 917-928, 1982.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2.ed., San Diego : Academic Press, 1986.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat, Psychopharmacol. Biochem. Beh., 24: 525-529, 1986.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, J. Neurosci. Met., 14: 149-167, 1985.
- PETERSEN, E.N.; BRAESTRUP, C.; SCHELL-KRUGER, J. Evidence that the anticonflict effect of midazolam in amygdala is mediated by specific benzodiazepine receptors. Neurosci. Lett., 53: 285-288, 1985.
- PETERSON, L.S. Anticonvulsant drug potentiation by glycine in maximal electroshock seizures is mimicked by D-serine and antagonized by 7-chlorokynurenic acid. Eur. J. Pharmacol., 199: 341-348, 1991.
- PETERSON, L.S. Diazepam potentiation by glycine in pentylenetetrazol seizures is antagonized by 7-chlorokynurenic acid. Pharm. Biochem. Behav., 47: 241-246, 1994.

- PITTALUGA, A.; RAITERI, M. Release-enhancing glycine-dependent presynaptic NMDA receptors exist on noradrenergic terminals of hippocampus. Eur. J. Pharmacol., 191: 231-234, 1990.
- PRICHARD, S.M.; BEITZ, A.J. A Golgi analysis of the rodent periaqueductal gray, Neuroscience Abs., 6: 429, 1980.
- RANSOM, R.W.; DESCHENES, N.L. Polyamines regulate glycine interaction with the N-Methyl-D-Aspartate receptor, Synapse, 5: 294-298, 1990.
- RASON, S.W.; MAGOUN, H.W. The hypothalamus. Ergeb. Physiol., 41: 56, 1939.
- REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. Science, 164: 444-445, 1969.
- REYNOLDS, I.J.; MILLER, R.J. Allosteric modulation of N-methyl-D-aspartate receptors. Adv. Pharmacol., 21: 101-126, 1990.
- REYNOLDS, I. J.; MURPHY, S.N.; MILLER, R.J. MK801 binding to the excitatory amino acid receptors from rat brain is enhanced by glycine. Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 84: 7744-7748, 1987.
- RICHARDSON, D.E.; AKIL, H. Pain reduction by electrical brain stimulation in man - Part 1: Acute administration in periaqueductal and periventricular sites, Journal Neurosurgery, 47: 178-183, 1977.
- RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T.; BEHBEHANI, M. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. J. Comp. Neurol., 303: 121-131, 1991.

- ROBERTS, V.J.; COX, V.C. Active avoidance conditioning with dorsal central gray stimulation in a place preference paradigm. Psychobiology, 15: 167-170, 1987.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus-maze by immediate prior exposure to social stressors, Physiol. Behav., 53: 383-388, 1993.
- RODGERS, R.J.; LEE, C.; SHEPHERD, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. Psychopharmacology, 106: 102-110, 1992.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDRIE, C.A. (Eds.) Ethology and Psychopharmacology. New York : John Wiley, 1994. p. 9-44.
- RODIN, E.A.; CALHOUN, H.D. Metrazol tolerance in a 'normal' volunteer population. J. Psychiatr. Res., 13: 65-76, 1970.
- ROELING, T.A.P.; VAN ERP, A.M.M.; MELLIS, W.; KRUK, M.R.; VEENING, J.G. Behavioural effects of NMDA injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat, Brain Res., 550: 220-224, 1991.
- ROELING, T.A.P.; VEENING, J.G.; PETERS, J.P.W.; VERMELIS, M.E.J.; NIEUWENHUYIS, R. Efferent connections of the hypothalamic "Grooming Area" in the rat, Neuroscience, vol 56, 1: 199-225, 1993.
- ROGAWSKI, M.A. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2, 3-benzodiazepines, TIPS, 14: 325-331, 1993.

- RUSSO, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF F.G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. Psychopharmacology, 110: 198-202, 1993.
- SAKUMA, Y.; PFAFF, D.W. Mesencephalic mechanisms for integration of female reproductive behavior in the rat. Am. J. Physiol., 237: R285-R290, 1979.
- SCHELL-KREUGER, J.; PETERSEN, E.N. Anticonflict effect of benzodiazepines mediated by a GABAergic mechanism in the amygdala. Eur. J. Pharmacol., 82: 115-116, 1982.
- SCHENBERG, L.C. Aferências da matéria cinzenta periaqueductal do rato. VI Reunião Anual da FESBE. Caxambu, 1991. Resumos... 1.07, p. 6.
- SCHENBERG, L.C.; GRAEFF, F.G. Role of the periaqueductal gray substance in the anti-anxiety action of benzodiazepines, Pharmacol. Biochem. Behav., 9: 287- 295, 1978.
- SCHENBERG, L.C.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA modulation of the defence reaction induced by brain electrical stimulation. Physiol. Behav., 31: 429-437, 1983.
- SCHMITT, M.L.; GRAEFF, F.G.; CAROBREZ, A.P. Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test, Braz. J. Med. Biol. Res., 23: 677-679, 1990.
- SCHMITT, M.L.; COELHO, W.; LOPES-DE-SOUZA, A.S.; GUIMARÃES, F.S. and CAROBREZ, A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats, Neurosc. Letters, 189: 93-96, 1995.
- SCHMITT, P.; Di SCALA, G.; BRANDÃO, M.L.; KARLI, P. Behavioral effects of microinjections of SR 95 103, a new GABA_A antagonist,

into medial hypothalamus on the mesencephalic central gray. Eur. J. Pharmacol., 117: 149-152, 1985.

SCHOEPP, D.D.; CONN, J.P. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. TIPS, 14: 13-25, 1993.

SCHOEPP, D.D.; SACAN, A.I. Metabotropic glutamate receptors and neuronal degenerative disorders. Neurobiol. Aging, 15 (2): 261-263, 1994.

SCHUTZ, M.T.B.; DE AGUIAR J.C.; GRAFF, F.G. Antiaversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal gray matter. Psychopharmacol., 85: 340-345, 1985.

SHAPIRA, Y.; YADID, G.; COTEV, A.; SHOMANI, E. Protective effect of MK 801 in experimental brain injury. J. Neurotrauma, 7: 131-139, 1991.

SHEPHERD, J.K.; GREWAL, S.S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J.; DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterization of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. Psychopharmacology, 116: 56-64, 1994.

SHEPHERD, J.K.; GREWAL, S.S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J.; DOURISH, C.T. Pharmacological evaluation of the elevated zero-maze as a model of anxiety in rats. Br. J. Pharmacol., 110: 13, 1993.

SHERMAN, A.D.; GEBHART, G.F. Morphine and pain: effects on aspartate GABA and glutamate in four discrete areas of mouse brain. Brain Res., 110: 276-281, 1976.

SHIBATA, S.; YAMASHITA, K.; YAMAMOTO, E.; OZAKI, T.; UEKI, S. Effects of benzodiazepines and GABA antagonists on anticonflict effects of antianxiety drugs injected in the rat amygdala in a water-lick suppression test. Psychopharmacol., 98: 38-44, 1989.

- SHILLITO, E.E. A method for investigating the effect of drugs on the exploratory behavior of mice, Br. J. Pharmacol., 40: 113-123, 1970.
- SHIPLEY, M.T.; ENNIS, M.; RIZVI, T.A.; BEHBEHANI, M.M. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Eds.) The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization, New York : Plenum, 1991. p. 417-448.
- SIMMONDS, M.A. Classification of some GABA antagonists With regard to site of action and potency in slices of rat cuneate nucleus, Eur. J. Pharmacol., 80:347-358, 1982.
- SIVILOTTI, L.; NISTRÌ, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system, Prog. Neurobiol., 36: 35-92, 1991.
- SKINNER, B.F. The behavior of organisms. New York : Appleton Century Crofts, 1938.
- SMITH, D.H.; OKIYAMA, K.; TOMAS, M.J.; MCINTOSH, T.K. Effects of the excitatory amino acid receptor antagonists kynurenate and Indole-2 carboxylic acid on behavioral and neurochemical outcome following experimental brain injury. J. Neurosci., 13 (12): 5383-5392, 1993.
- SONG, Y.; HUANG, L.Y.M. Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons, Nature, vol. 348 (6298): 242-245, 1990.
- SPRUIJT, B.M.; COOLS, A.R.; GISPEN, W.H. The periaqueductal gray: a prerequisite for ACTH induced excessive grooming, Behav. Brain Res., 20: 19-25, 1986.

- STEPHENS, D.N.; KEHR, W. β carbolines can enhance or antagonise the effects of punishment in mice. Psychopharmacol., 85: 143-147, 1985.
- STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTZNER, M. Does the excitatory amino-acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? Psychopharmacology, 90: 166-169, 1986.
- STEPHENS, D. N., TURSKI, L., TURNER, J.D.; SCHNEIDER, H. H. Are changes in glutamatergic mechanisms responsible for kindling to the benzodiazepine receptor inverse agonist FG 7142? Br. J. Pharmacol., 98: 837, 1989.
- STOREY, E.; KOWALL, N.W.; FINN, S.F. The cortical lesion of Huntington's disease - further neurochemical characterization, and reproduction of some of the histological and neurochemical features by N-methyl-D-aspartate lesions of rat cortex. Ann. Neurol., 32: 526-34, 1992.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. Neurosci. Biochem. Rev., 9: 203-222, 1985.
- TAXT, T.; STORM-MATHISEN, J. Uptake of D-aspartate and L-glutamate in excitatory axon terminals in hippocampus: autoradiographic and biochemical comparison with γ -amino butyrate and other amino acids in normal rats and in rats with lesions. Neurosci., 11: 79-100, 1984.
- THIÉBOT, M.-H.; SOUBRIÉ, P.; SANGER, D. Anxiogenic properties of β -CCE and F67142: A review of promises and pitfalls. Psychopharmacol., 94: 542-463, 1988.
- TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats, Pharm. Biochem. Behav. 31: 959-962, 1988.

- TRULLAS, R.; FOLIO, T.; YOUNG, A.; MILLER, R.; BOJE, K.; SKOLNICK, P. 1-aminocyclopropanecarboxylates exhibit antidepressant and anxiolytic actions in animal models, Eur. J. Pharmacol., 203: 379-385, 1991.
- TRULLAS, R.; JACKSON, B.; SKOLNICK, P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine-insensitive glycine receptors. Pharmacol. Biochem. Behav., 34: 313-316, 1989.
- VAN DER POEL, A.M. A note on "stretched attend", a behavioral element indicative of an approach-avoidance conflict in rats. Animal Behav., 27: 446-450, 1979.
- VAN ERP, A.M.M.; KRUK, M.R.; MEELIS, W.; VEENING J.G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming induced electrically. Behavioural Brain Research, 59: 95-101, 1993.
- VERBENE, A.J.M.; GUYENET, P.G. Midbrain central gray: influence on medullary sympathetic excitatory neurons and the baroreflex in the rats. Am J. Physiol., 263: R24-R33, 1992.
- VITORICA, J.; PARK, D.; DE BLAS, A.L. Immunocytochemical localization of the GABA_A receptor in the rat brain. Eur. J. Pharmacol., 136: 451-453, 1987.
- VIVIAN, J.A.; MICZEK, K.A. Diazepam and gepirone selectively attenuate either 20-32 or 32-64 kHz ultrasonic vocalizations during aggressive encounters. Psychopharmacology, 12: 66-73, 1993.
- WADA, T.; FUKUDA, N. Pharmacologic profile of a new anxiolytic, DN-2327: effect of Ro 15-1788 and interaction with diazepam in rodents, Psychopharmacology, 103: 314-322, 1990.

- WADA, T.; FUKUDA, N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone on exploratory activity of the rat in an elevated plus- maze. Psychopharmacology, 104: 444-450, 1991.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORÉ, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists, Trends Pharmacol. Sci., 11: 25-33, 1990.
- WILKINSON, L.O.; DOURISH, C.T. Serotonin and behavior. Serotonin Receptor Subtypes: Basic and Aspects, 147-210. 1991.
- WILKLUND, L.; BEHZADI, G.; KALEN, P.; HEADLEY, P.M.; NICOLOPOULOS, L.S.; PARSONS, C.G.; WEST, D.C. Autoradiographic and electrophysiological evidence for excitatory amino acid transmission in the periaqueductal gray projection to nucleus raphe magnus in the rat, Neurosci. Lett., 93: 158-163, 1988.
- WILLIS, W.D. Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review, Prog. Brain Res., 77: 1-29, 1988.
- WILSON, D.E.; BENNETT, D. A. Pentylentetrazole discriminative stimuli are selective for identifying benzodiazepine receptor modulating agents. Drug Dev. Res., 17: 237-243, 1989.
- WISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the rat brain. Science, 17: 180-183, 1972.
- WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*, Pharmacol. Biochem. Behav., 47 (1): 1-4, 1994.

- YAMAMOTO, T.; UEKI, S. A new test for screening anxiolytic drugs in rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 26: 111-117, 1986.
- YAMASHITA, K.; KATAOKA, Y.; SHIBATA, K.; OZAKI, T.; MIYAZAKI, A.; KAGOSHIMA, M.; UEKI, S. Neuroanatomical substrates regulating rat conflict behavior evidenced by brain lesioning. Neurosci. Lett., 104: 195-200, 1989.
- YASUMATSU, H.; MORIMOTO, Y.; YAMAMOTO, Y.; TAKEHARA, S.; FUKUDA, T.; NAKAO, T.; SETOGUCHI, M. The pharmacological properties of Y-23684, a benzodiazepine receptor partial agonist. Br. J. Pharmacol., 111 (4): 1170-1178, 1994.
- YEH, G.C.; BONHAUS, D.W.; McNAMARA, J.O. Evidence that zinc inhibits NMDA receptor gated ion channel activation by noncompetitive antagonism of glycine binding, Mod. Pharmacol, 38: 14-19, 1990.
- YEZIERSKI, R.P. Spinomesencephalic tract: projections from the lumbosacral spinal cord to the rat, cat and monkey. J. Comp. Neurol., 287: 131-148, 1988.
- YONEDA, Y.; OGITA, K. Neurochemical aspects of the N-methyl-D-aspartate receptor complex, Neurosci. Res., 10: 1-33, 1991.
- YOUNG, W.S.; KUHAR, M.J. Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain, Pharmacol. Exp. Ther., 212: 337-346, 1980.
- ZANGROSSI JR., H.; FILE, S.E. Chlordiazepoxide reduces the generalized anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to the cat odor. Pharmacol. Biochem. Behav., 43: 1195-1200, 1992.
- ZHANG, S.P.; BANDLER, R.; CARRIVE, P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of

the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. Brain Res., 520: 73-82, 1990.

ZHANG, S.P.; DAVIS, P.J.; CARRIVE, P.; BANDLER, R. Vocalization and marked pressor effect from the nucleus retroambigualis in the caudal ventrolateral medulla of the cast, Neurosci. Lett., 140: 103-107, 1992.

ZORUMSKI, C.F.; ISENBERG, K. Insights into structure and function of GABA-benzodiazepines receptors: Ion channels and Psychiatry. Am. J. Psychiat., 148: 163-173, 1991.

ZORUMSKI, C.F.; THIO, L.L. Properties of vertebrate glutamate receptors-calcium mobilization and desensitization, Prog. Neurobiol., 39: 295-336, 1992.