

JOSÉ GERALDO PEREIRA DA CRUZ

EFEITOS DE POLIAMINAS MICROINJETADAS NA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS AVALIADOS  
NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia.

Florianópolis

1996

**PEREIRA-DA-CRUZ, J.G.** *Efeitos de poliaminas microinjetadas na matéria cinzenta periaqueduta dorsal de ratos avaliados no labirinto em cruz elevado.* Florianópolis, 1996. 107p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: **Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez**

Defesa: 30.08.1996

Drogas que atuam no receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) no interior da matéria cinzenta periaqueduta dorsal (MCPD), parece estar envolvido com as desordens de [ansiedade]. Nossos estudos investigam os efeitos comportamentais da espermidina (ED) ou espermina (EP) no interior da MCPD, sendo utilizado para análise ratos machos Wistar, cronicamente implantados com uma canula dirigida para este sítio e, posteriormente, testados no labirinto em cruz elevado (LCE). Nossos dados mostram uma ação ansiolítica das poliaminas microinjetadas no interior da MCPD, possivelmente, devido a sua ação sobre o sítio das poliaminas no NMDAR. Esses dados também mostram a interferência na ação ansiolítica das poliaminas aplicada na MCPD de compostos que se ligam ao sítio da glicina no complexo NMDAR.

[Ansiedade] [Poliaminas] [Labirinto em cruz elevado]

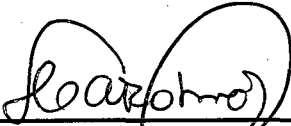
**"EFEITO DAS POLIAMINAS MICROINJETADAS NA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS SUBMETIDOS AO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO"**

POR

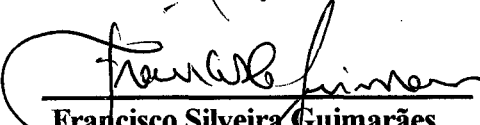
**JOSÉ GERALDO PEREIRA DA CRUZ**

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

**Banca Examinadora:**

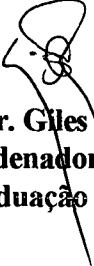
  
\_\_\_\_\_  
**Antônio de Pádua Carobrez**

**(FMC/UFSC-Orientador)**

  
\_\_\_\_\_  
**Francisco Silveira Guimarães**

**(FMRP/UDSP-Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Thereza Cristina M.L. Nogueira** **(FMC/UFSC-Membro Titular)**

  
**Prof. Dr. Giles Alexander Rae**  
**Coordenador do Curso de**  
**Pós-Graduação em farmacologia**

**Florianópolis, agosto de 1996.**

## *Agradecimentos*

● *Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela oportunidade e incentivo nesta etapa de minha carreira científica.*

● *Aos mestres, pois repartiram comigo os seus conhecimentos e sentimentos, colocando em minhas mãos as ferramentas com as quais abrirei novos horizontes, rumo à satisfação plena de meus ideais e realizações.*

● *Aos funcionários e amigos que estiveram comigo nos momentos difíceis, assim como nos momentos mais felizes em que aqui estive.*

● *Ao professor Dr. Francisco Silveira Guimarães e funcionários de seu laboratório, pela gentileza para execução dos cortes histológicos.*

● *A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.*

*A minha filha Júlia*

*As alegrias de hoje também são tuas, pois teu amor,  
estímulo e carinho foram as armas dessa vitória.*

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
1. REAÇÃO DE DEFESA .....	1
1.1. Ansiedade .....	1
1.2. Mecanismos Neurais .....	3
1.3. Sistema Cerebral Aversivo .....	5
1.4. Reações Comportamentais no Sistema Aversivo .....	8
2. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL .....	11
2.1. Considerações Anatômicas .....	11
2.2. Receptores de Aminoácidos Excitatórios .....	15
2.3. Envolvimento dos Aminoácidos Excitatórios Com a Reação de Defesa .....	16
2.4. Receptor NMDA .....	20
3. ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DAS POLIAMINAS .....	22
3.1. Síntese de Poliaminas .....	23
3.2. Regulação dos Canais no NMDAR pelas Poliaminas .....	24
3.3. Estrutura Molecular dos Sítios de Ação das Poliaminas no NMDAR .....	27
3.4. Antagonistas das Poliaminas .....	28
4. MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE .....	31
OBJETIVOS .....	35
MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
1. Animais .....	37
2. Estereotaxia .....	37
3. Drogas .....	38
4. Labirinto em Cruz Elevado .....	38
5. Procedimentos .....	40
6. Análise Estatística .....	41

RESULTADOS .....	42
Experimento 1 .....	43
Efeitos da Espermina .....	43
Efeitos da Spermidina .....	43
Experimento 2: Influência do tratamento com antagonistas das poliaminas no      efeito      da      espermina      no      LCE .....	46
Experimento 3: Influência do pré-tratamento com glicina no efeito da espermina no LCE .....	48
Experimento 4: Efeitos da espermina no labirinto em ratos pré-tratados com (±)HA-966 .....	48
DISCUSSÃO .....	51
CONCLUSÃO .....	60
RESUMO .....	61
ABSTRACT .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

# INTRODUÇÃO

## 1. Reação de Defesa

### 1.1. Ansiedade

A ansiedade está relacionada a um estado emocional normal, associado com eventos estressantes ou ameaçadores, sendo considerada patológica quando não está claramente ligada a eventos bem-definidos. Sabendo-se que os mecanismos neurais das respostas a circunstâncias que induzem medo são, provavelmente, similares em humanos e animais, modelos animais de ansiedade podem ter um bom valor preditivo das respostas de desordens de ansiedade (Handley, 1994).

O sistema comportamental relacionado à ansiedade é importante para a sobrevivência da espécie, estando relacionado com uma interação apropriada do organismo com o meio ambiente, possuindo a função de proteger individualmente a espécie contra os perigos que envolvem o animal, principalmente predadores. Walter B. Cannon em 1929, enfatizou que reações de fuga ou ataque são adaptativas, conduzindo à preservação da espécie.

As respostas comportamentais de defesa são acompanhadas por várias alterações autonômicas, neuroendócrinas e imunológicas, que visam capacitar os



animais a um melhor desempenho nas tarefas de se protegerem e evitarem as situações de perigo e ameaça (MacLean, 1957; Dunn e Kramercy, 1984; Graeff, 1990; Henry, 1993). Estas modificações ocorrem em segundos ou minutos e suprem de energia as estruturas orgânicas relacionadas ao comportamento defensivo, em resposta às ameaças do ambiente (Hofer, 1980; Brandão e cols., 1985).

Nos experimentos relacionados ao medo, os testes psicobiológicos são idealizados de tal forma, que os estímulos podem ser manipulados para fornecerem resultados comportamentais observáveis. É importante que estímulo e resposta, estejam dentro de parâmetros funcionais adaptativos do sistema comportamental (Bolles e Fanselow, 1980; Fanselow, 1991).

As experiências emocionais são, na verdade, mediadas pela combinação de três sistemas comportamentais básicos: o sistema motivacional exploratório (de recompensa); o de luta ou fuga e o de inibição comportamental. O primeiro está relacionado a estímulos de condicionamento clássico (alimento e água) e à ausência de punição (dor); sendo expresso pelo comportamento exploratório. O sistema de luta ou fuga, ao contrário do anterior, responde a eventos reforçadores não condicionados, tais como punição (dor) e ausência de recompensa. As manifestações da ativação deste sistema são a fuga ou a agressão diferencial, dependendo da circunstância. O sistema de inibição comportamental é ativado em resposta a estímulos condicionados, associados à antecipação da punição, ausência de recompensa e a estímulos não condicionados,

como modificação do ambiente (novidade) e medo inato. As respostas comportamentais desse sistema são o aumento da atenção e vigília. O animal interrompe o que estiver fazendo, aprende mais sobre o ambiente e se prepara para uma ação física vigorosa (Fanselow, 1991).

## **1.2. Mecanismos Neurais**

Dentro de uma perspectiva evolutiva, tanto o medo como a ansiedade podem ter suas origens nas reações de defesa do animal, sendo que ambas podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns (Graeff, 1984; 1993b).

De acordo com Adams (1979), os padrões de defesa não ocorrem todos ao mesmo tempo, mas são organizados numa hierarquia gradual, com a ameaça sendo induzida por baixas intensidades de estímulos aversivos, ataque ou fuga em alta intensidade. Estes padrões de defesa são aparentemente organizados no cérebro por meio de redes de conexões neurais que ligam mecanismos motivacionais de defesa com as vias de saída motora.

Muitas evidências apontam para a amígdala como ponto de convergência a vários estímulos de perigo, visto que lesões desta estrutura diminuem as respostas defensivas (congelamento e analgesia), para estímulos de perigo naturais ou aprendidos

por condicionamento (Helmestetter e cols., 1988; Oliveras e Besson, 1988). A amígdala recebe projeções de áreas corticais e subcorticais que enviam informações de todo sistema sensorial, enquanto fibras aferentes partem do núcleo central para o hipotálamo medial e matéria cinzenta central, bem como para núcleos regulatórios autonômicos no tronco cerebral. Assim, esta estrutura parece retransmitir estímulos inatos ou condicionados do medo para as estruturas caudais do sistema nervoso central, que são mais diretamente responsáveis por manifestações comportamentais e autonômicas do medo (Hitchcock e Davis, 1986).

Segundo Fanselow (1991), a amígdala teria a função de avaliar o grau de ameaça dos diferentes estímulos que sinalizam o perigo, enviando os resultados de tal avaliação para a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD). Esta última, por sua vez, seria a estrutura responsável por selecionar e organizar a resposta de defesa apropriada.

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP), parece ser a principal responsável pelo comando das respostas defensivas do tipo luta ou fuga, em situações onde o perigo proporcionado por estímulos incondicionados de medo é extremo e próximo.

Este modelo de interação, sugere que a MCP é estimulada pela amígdala, levando a manifestação de respostas defensivas através de diferentes vias, de outros sistemas neuroquímicos, já que a analgesia induzida por estímulos elétricos pode ser

bloqueada por antagonistas de opióides, mas não o congelamento (Helmestetter e Landeira-Fernandes, 1991).

O sistema amígdala-MCP, corresponde, portanto, ao sistema comportamental defensivo e representa a região de convergência dos impulsos sensoriais produzidos pelo medo, podendo induzir várias respostas comportamentais semelhantes para diferentes estímulos, sendo estas respostas separadas na MCP (Fanselow, 1991).

### **1.3. Sistema Cerebral Aversivo**

Hunsperger (1956) observou que as lesões da MCP que aboliam a reação de defesa facilitavam a reação de fuga quando o hipotálamo era estimulado, sugerindo sistema distintos para a integração destas respostas. Além do hipotálamo e da MCP, vários autores haviam sugerido o envolvimento da amígdala na organização do controle neural dos comportamentos defensivos e de fuga (Hilton e Zbrozyna, 1963). Schenberg e Graeff (1978) sugeriram que a MCP pode estar envolvida com os mecanismos neurais da ansiedade e que os benzodiazepínicos exerceriam seu efeito ansiolítico pela depressão desta ou de parte da MCP relacionada do sistema de defesa. Graeff em 1981 estabeleceu um sistema cerebral aversivo, formado por substratos neurais responsáveis por uma variedade de respostas a estímulos ameaçadores ou

dolorosos, sendo esse formado pela amígdala, juntamente com partes mediais do hipotálamo e MCP.

Blanchard e colaboradores (1981) chegaram a conclusão de que a MCP é parte de um mecanismo capaz de integrar as respostas defensivas de agressão e fuga a estímulos dolorosos e não dolorosos. A estimulação da MCP, que causa efeitos aversivos em várias espécies (Schmitt e cols., 1977; Schenberg e Graeff, 1978), causou experiências emocionais relatadas como “medo”, “pavor”, “sentimentos terríveis” e “vontade de chorar”, assim como, delírio persecutório em humanos (Nashold e cols., 1969; Amano e cols., 1978). De modo similar, a estimulação da amígdala de humanos, ao lado dos efeitos autonômicos, causou experiências de “medo”, “ansiedade” e “sentimentos estranhos terríveis” (Chapman e cols., 1954).

Panksepp (1980) postulou três mecanismos emocionais: raiva, medo e pânico. A raiva estaria associada com o ataque-efetivo, o medo com a fuga e o pânico com comportamento explosivos. Segundo o autor, quatro circuitos básicos inespecíficos comandariam vários componentes discretos, organizados por outros circuitos, geneticamente determinados, dependendo dos estímulos presentes no ambiente. Os circuitos básicos se excitariam ou inibiriam mutuamente, segundo padrões estabelecidos. Assim, a raiva inibiria o medo e o pânico, mas estes a facilitariam. Por sua vez, o medo e o pânico facilitariam-se mutuamente e inibiriam a

expectativa. Por fim, a expectativa inibiria o medo, pânico e raiva, sendo também inibida pela raiva.

Morgan e Liebeskind (1987), examinaram as respostas comportamentais de ratos quando os sítios ventrais, laterais e dorsais da matéria cinzenta periaquedutal eram estimulados eletricamente através de eletrodos implantados nestas áreas. A estimulação dos sítios laterais da matéria cinzenta periaquedutal (l-MCP), induz analgesia e atividade motora (correr, girar). Estas reações são semelhantes àquelas induzidas pelo choque elétrico, onde a movimentação brusca durante a estimulação pode ser rapidamente transferida para o congelamento. O sinal de perigo comunica-se com a região ventral (v-MCP), via amígdala, iniciando as respostas defensivas através do congelamento e analgesia-opiíide (LeDoux e cols., 1988). Esses dados sugerem que a l-MCP está relacionada ao comportamento de ataque, enquanto a v-MCP ao comportamento de defesa.

Quando um forte estímulo de perigo ativa a v-MCP há uma intensificação da comunicação e ativação da l-MCP resultando um comportamento de ataque. Este aumento no impulso só ocorre nos casos extremos de medo, como a aproximação do predador. Nestas condições a l-MCP inibe a v-MCP, ativando apropriadamente o comportamento de ataque e motricidade. A sucessão motora é acompanhada de analgesia não-opiíide e a ativação de eventos autonômicos apropriados, mediados por subdivisões da MCP (Morgan e Liebeskind, 1987; LeDoux e cols., 1988).

O comportamento de ataque ou defesa é bastante vigoroso, demonstrando certa coordenação de acordo com a localização do estímulo. Para fugir do predador o animal realiza rápidas modificações sensório-motora, saltando de acordo com um padrão já estabelecido, enquanto o predador é constantemente avaliado.

#### **1.4. Reações Comportamentais no Sistema Aversivo**

A sobrevivência de muitas espécies está relacionada com uma variedade de reações que envolvem a capacidade de perceber o perigo e agilidade de se afastar deste, através de várias vias neurais, que gera um comportamento defensivo ou de fuga (Fanselow, 1991). O perigo e a ameaça podem ser provocadas por alterações no ambiente natural do animal (tempestades, incêndio); por predadores ou estímulos associados (gato ou seu odor para o rato); por determinados estímulos ambientais (iluminação e altura do som para roedores) ou pelo ataque de animais da mesma espécie (Blanchard e cols., 1993; Graeff, 1993b). Frente a estas situações de perigo e ameaça os animais respondem de acordo com quatro estratégias comportamentais: fuga, imobilização, ataque defensivo ou submissão. A fuga ocorre quando o animal se encontra numa situação de perigo iminente de confronto com o predador, havendo uma rota de fuga no ambiente. No entanto, este animal pode manter-se em congelamento caso não haja condição de fuga ou o predador mantenha-se a certa distância; desta

forma diminui a probabilidade de ser localizado pelo predador. Nas situações de confronto real com o predador o ataque defensivo é a ação mais eficaz. No caso da submissão, o animal submisso é capaz de inibir o ataque de um animal com uma posição hierárquica mais alta no seu grupo social (Graeff, 1981; 1990).

MacLean em 1957, na tentativa de investigar funções do sistema límbico, injetou acetilcolina no hipocampo e verificou reações comportamentais como farejamento e olhar para cima, retração das orelhas, comportamento de lambar, micção, defecação, e, algumas vezes, aceleração cardíaca. Posteriormente, foi demonstrado que um padrão de comportamento emocional poderia ser eliciado em gatos por injeção de carbacol no hipotálamo, amígdala e hipocampo (Baxter, 1967) e matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD)(Baxter, 1968). Estas respostas incluem silvado, rosnado, piloereção, ataque e fuga.

Têm sido sugerido que mecanismos GABAérgicos exercem um inibição tônica sobre circuitos neuronais responsáveis pela geração e elaboração de respostas aversivas no sistema nervoso central (Brandão e cols., 1982; Schmitt e cols., 1985; Graeff, 1990). Microinjeção de antagonistas GABAérgicos como a bicuculina dentro da MCPD mimetizam os efeitos da estimulação elétrica desta estrutura (Schmitt e cols., 1986). Resultados semelhantes foram obtidos pela microinjeção de picrotoxina, um bloqueador do canal iônico de cloro associado ao receptor GABA, que quando injetado



na MCPD produz efeitos comparáveis aos do bloqueio de receptores GABA-A (Brandão e cols., 1982).

Alguns achados sugerem que mecanismos serotoninérgicos exercem um papel modulatório na reação de defesa. Possivelmente, os efeitos antiaversivos do  $\beta$ -bloqueador e antagonista do receptor 5-HT, o propranolol, injetado na MCPD de ratos, seja devido a um aumento na liberação de 5-HT de terminais nervosos, resultante do bloqueio de autorreceptores pré-sinápticos do tipo 5-HT<sub>1B</sub>, e consequente aumento da concentração de 5-HT na fenda sináptica agindo em receptores 5-HT<sub>2</sub> (Audi, 1988). A microinjeção no interior da MCPD de isamoltana, um outro  $\beta$ -bloqueador e antagonista de auto-receptores 5-HT, aumenta de maneira dose-dependente o limiar de corrente elétrica necessário para induzir fuga em ratos colocados em uma caixa de duas vias. Este efeito antiaversivo foi antagonizado pela microinjeção prévia de ritanserina e cetanserina, antagonistas de receptores 5HT<sub>2</sub> (Nogueira e cols., 1991).

Evidências experimentais estabeleceram que os aminoácidos excitatórios, tais como o glutamato e o aspartato, evocam muitos componentes somáticos e autonômicos da reação de defesa. Em ratos, a microinjeção de aminoácidos excitatórios na MCPD induz comportamentos aversivos como saltos explosivos, corridas, rotações e posturas defensivas (Bandler e cols., 1985; Krieger e Graeff, 1985). Além disso, antagonistas de receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA, tais como fenciclidina, quetamina e ácido 2-amino-7-fosfoheptanóico (AP7) exibiram um efeito ansiolítico nos

testes de conflito, bem como em outros modelos animais de ansiedade (Wenger, 1974; Brandão e cols., 1980; Guimarães e cols., 1991). Estes estudos sugerem, em conjunto, que o glutamato atua sobre receptores específicos na matéria cinzenta periaquedutal dorsal, ativando sistemas endógenos envolvidos no comportamento defensivo.

A partir destes estudos parece não existir dúvidas de que mecanismos GABAérgicos, opióides, além da serotonina e de aminoácidos excitatórios, participam de alguma forma da modulação ou elaboração de respostas no sistema comportamental aversivo.

## **2. Matéria Cinzenta Periaquedutal**

### **2.1. Considerações Anatômicas**

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP), está localizada no mesencéfalo circundando o arqueduto de Sylvius (Paxino e Watson, 1986), continuando rostralmente com a matéria cinzenta que circunda o terceiro ventrículo, na parte caudal se liga com a matéria cinzenta que circunda o quarto ventrículo. Ventralmente se limita com os núcleos relacionados com o supra-oculomotor, dorsalmente pelas camadas que fazem parte do teto mesencefálico (Bandler e cols., 1991a).

Em ratos adultos mede aproximadamente 3,6 mm de comprimento; apresenta a forma de um funil, com a base localizada na região caudal e, o ápice, na rostral. O volume ocupado está ao redor de 8,16 mm<sup>3</sup>, sendo a densidade neuronal média de 16.300 células/mm<sup>3</sup>, quatro vezes menor que a média da densidade glial (64.408 células/mm<sup>3</sup>; Beitz, 1985).

A MCP anatomicamente foi subdividida em: média, dorsal e lateral. Estudos fisiológicos e comportamentais sugerem funções específicas relacionadas a estas subdivisões. Estão relacionados a analgesia, funções autonômicas, vocalização, reações de raiva, medo, movimento dos olhos, lordose, memória e regulação hormonal da glândula pituitária (Jacquet e cols., 1974; Sternberg e cols., 1992; Graeff, 1994). Reações autonômicas estão relacionadas à coordenação de respostas comportamentais para à sobrevivência do animal (Bandler e cols., 1991b; Shipley e cols., 1991).

A matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) recebe projeções do núcleo central da amígdala, zona incerta, área lateral hipotalâmica, substância negra; bem como de vários outros sítios, incluindo núcleo do trato solitário e medula ventrolateral rostral (Beitz, 1982; Bandler e cols., 1985). Estas vias são responsáveis por funções autonômicas e sensoriais.

A região da MCP da qual reações defensivas podem ser evocadas, fornecem projeções descendentes para os núcleos bulbares e medula espinhal, envolvidos em funções motoras, somáticas e autonômicas (Jordan, 1990). Elas se

projetam para o bulbo ventro-lateral e núcleos da rafe. Esta última área se projeta para o medula espinhal onde estão localizados neurônios pré-ganglionares simpáticos e somáticos (Loewy e Neil, 1981). Contudo, estas projeções são consideravelmente menos densas que a projeção da MCP à região ventro-lateral rostral. É provável que as projeções para a região ventro-lateral bulbar sejam de grande importância na integração somática e autonômica da reação de defesa, podendo influenciar as respostas somáticas simpáticas por vias diretas e indiretas (Loewy e Neil, 1981).

Carrive (1993) e Bandler (1991a) propuseram uma nova organização para a MCP, baseada na citoarquitetura funcional, utilizando-se de respostas neurovegetativas e comportamentais evocadas pela administração local de aminoácidos excitatórios. Segundo esses autores, a MCP pode ser subdividida de forma radial em cinco regiões distintas: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral e ventromedial, cada uma delas formando uma coluna longitudinal. Atualmente, essa é a subdivisão mais aceita, pois baseia-se em estudos que sugerem que a MCP não é uma estrutura cerebral funcionalmente homogênea.

A injeção de aminoácidos excitatórios no interior da região ventro-lateral produz uma diminuição da atividade autonômica e somatomora, sendo os efeitos opostos quando a injeção é lateral, estando associado a várias formas de comportamentos defensivos (Bandler e cols., 1991a).

A maior quantidade de projeções aferentes provém do cérebro anterior além do diencéfalo, com uma pequena quantidade de impulsos do tronco cerebral e cordão espinhal. A maioria dos impulsos aferentes provém do hipotálamo (Veening e cols., 1991), de algumas áreas corticais (Shipley e cols., 1991), podendo também ser mencionado a amígdala, colículo superior, colículo inferior, núcleo cuneiforme, núcleos da rafe, núcleos parabrancúais e locus ceruleus.

As projeções ascendentes da MCP de ratos foi descrita por Eberhart e cols. (1985), incluindo projeções para a zona incerta, septo lateral, núcleo accumbens, tubérculo olfatório, córtex frontal, núcleos intralaminares talâmicos, pedúnculo pontino tegumentar, dorsal da rafe, fundo mesencefálico, tegumento ventral e núcleo subceruleus. As projeções são em menor quantidade da MCP para o córtex cerebral, especialmente o frontal (Herrero e cols., 1991).

A região dorso-lateral está orientada espacialmente para receber impulsos do hipoglosso, substância negra, pars reticulata e colículo superior (Meller e Dennis, 1986; Holstege e Cowie, 1990). Recebe impulsos vestibulares e responde a mudanças de gravidade, servindo como elo integrativo das informações vestibulares com outros impulsos sensoriais, de forma a controlar apropriadamente as atividades autonômicas e somatomotoras (Kanfman e cols., 1992)..

Assim, as divisões anatômicas da MCP parecem interagir funcionalmente para o controle da pressão arterial, tônus vasoconstritor, respiração/vocalização, analgesia e comportamento defensivo (Bandler e cols., 1991a).

## **2.2. Receptores de Aminoácidos Excitatórios**

Com base em estudos de agonistas e antagonistas seletivos podem ser distinguidos no mínimo quatro subtipos diferentes de receptores para os aminoácidos excitatórios (AAE), possivelmente cinco (Collingridge e Lester, 1989; Monaghan e cols., 1989; Iversen, 1994).

Estes subtipos de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos foram classificados com base em agonistas seletivos em duas classes: receptores ionotrópicos e metabotrópicos ligados à proteína-G. Um dos subtipos ionotrópico é seletivamente ativado pelo NMDA, sendo bloqueado por derivados do ácido fosfônico (Watkins e cols., 1990; Patneau e Mayer, 1990). O outro subtipo é ativado pelos agonistas seletivos do ácido propiônico alfa-amino-3-hidroxi-4-metil-5-isoxazol (AMPA) e ácido caínico (Watkins e cols., 1990). Assim, foram classificados como NMDA, AMPA e cainato, de acordo com três agonistas seletivos: N-metil-D-aspartado (NMDA), ácido propiônico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) e cainato.

A distinção entre os receptores AMPA e cainato, por outro lado, é um pouco obscura, desde que não há antagonistas seletivos, frequentemente são classificados como receptores "não-NMDA". Tais receptores são todos diretamente acoplados a canais de cátions na membrana pós-sináptica. No início dos anos 80, a existência de um quarto subtipo de receptor foi proposto com base nas potentes propriedades do antagonista AP4, em subpopulações de sinapses excitatórias identificadas no cérebro e medula (Foster e Fagg, 1984; Cotman e Iversen, 1987; Monaghan e cols., 1988).

Posteriormente, foi descoberto um quinto subtipo de receptor - o receptor metabotrópico - que parece estar ligado ao metabolismo do fosfoinositol. Sua função ainda não está completamente esclarecida, mas possivelmente está envolvido com a regulação do desenvolvimento sináptico (Sladeczek e cols., 1988).

### **2.3. Envolvimento dos Aminoácidos Excitatórios Com a Reação de Defesa**

A partir do trabalho de Watkins e Evans (1981), veio a constatação de que há vários tipos de receptores para os AAE. As observações de que os antagonistas para estes receptores bloqueia a transmissão sináptica no sistema nervoso central, permitiu a elaboração de uma teoria para o papel destas substâncias nas reações de defesa. Os AAE são substâncias que causam despolarização de neurônios quando liberados diretamente sobre as membranas celulares. O  $^3\text{H}$ -D-aspartato foi usado para evidenciar

sua liberação. Este análogo é captado por terminações nervosas, mas não é metabolizado, sua liberação por despolarização mostra a dependência esperada de cálcio e outros elementos (Ganong, 1991).

Estudos com microinjeção na MCPD de gatos (Bandler e Carrive, 1988), demonstraram um repertório comportamental inteiramente compatível com as reações de defesa. Os resultados indicam que todos os sinais comportamentais da reação de defesa, incluindo ataque direto, estão relacionados com os AAE. Da mesma forma, a microinjeção de glutamato ou aspartato, além de induzir comportamento de ataque em gatos, mostrou comportamento de fuga em ratos quando a microinjeção era localizada na MCPD, mas não no revestimento mesencefálico circunvizinho. Por outro lado, a estimulação elétrica foi efetiva em ambas as áreas, indicando que os corpos celulares com receptores para AAE estão restritos à MCP (Bandler, 1991a).

Resultados semelhantes foram obtidos por Krieger e Graeff (1985) com microinjeção de glutamato em diferentes sítios do mesencéfalo de ratos. Estes autores verificaram que o aumento na pressão arterial, causada pela microinjeção de glutamato, era maior quando injetados nas bordas da MCPD. Além disso, antagonistas AAE no receptor de NMDA, como a fenciclidina, quetamina e ácido 2-amino-7-fosfoheptanóico (AP7), exibiram efeitos ansiolíticos nos testes de conflito bem como em outros modelos animais de ansiedade (Wenger, 1974; Brandão e cols., 1980; Guimarães e cols., 1991).



A microinjeção na MCPD de dietil-ester-ácido glutâmico, um antagonista não-seletivo para os receptores de quisqualato, como pré-tratamento para administração de glutamato nesta região, bloqueou as respostas comportamentais e neurovegetativas induzidas pelo glutamato, o mesmo não ocorrendo quando da administração de ácido caínico (Carobrez, 1987; Graeff., 1988). Também foi demonstrado que a estimulação elétrica na MCPD era abolida com administração de dietil-ester-ácido glutâmico. Esse último resultado levantou a possibilidade de que AAE endógenos (glutamato ou aspartato) atuarem como mediadores fisiológicos nos mecanismos de reação de defesa presente na MCPD. Estes dados em conjunto sugerem que o glutamato atua sobre receptores específicos, ativando sistemas endógenos envolvidos no comportamento defensivo. Baseado nesta premissa, é possível que fibras axonais e terminais nervosos contendo glutamato estejam presentes na MCPD. De fato, estudos com imunorreatividade tem mostrado uma das mais altas densidades de fibras glutamatérgicas, espalhadas por toda a estrutura mesencefálica (Ottersen e cols., 1984).

Embora alguns estudos descrevam que a MCPD receba uma densa inervação glutamatérgica, a origem destas fibras ainda é desconhecida. Alguns descrevem uma projeção excitatória do córtex pré-frontal de ratos (Christie e cols., 1986) e hipotálamo medial (Beart e cols., 1988).

Estudos adicionais realizados por Silveira e Graeff (1988), tentaram localizar grupos de neurônios comandando a reação de defesa. Estes autores injetaram doses

subtóxicas de ácido caínico (66 pmol), no hipocampo medial de ratos, e quando estes foram colocados numa caixa de esquiwa de duas vias ("Shuttle box"), apresentaram um aumento significativo no número de levantamentos, cruzamentos e saltos, em direção ao outro compartimento; sugerindo que estas estruturas contêm neurônios com receptores sensíveis à ação do ácido caínico que integram a reação de defesa.

Johnson e Acher (1987) demonstraram que a glicina amplifica acentuadamente as respostas do receptor NMDA. Esse efeito da glicina não é bloqueado pela estriquina, o que sugeriu a existência de um sítio de ligação para glicina no receptor NMDA. A ocupação do sítio para a glicina parece ser absolutamente requerida para ativar o receptor e tem lhe sido conferido o conceito de "co-agonista" para esse neurotransmissor (Kleckner e Dingledine, 1988). Os mecanismos que regulam o papel fisiológico da glicina com relação ao receptor NMDA não são ainda totalmente conhecidos. Embora as concentrações de glicina nos fluídos extracelulares e líquido estejam em proporções micromolares, estudos *in vivo* com agonista da glicina sugerem que o seu sítio parece não estar totalmente saturado.

Reforçando esta hipótese foi mostrado que a glicina e a D-serina microinjetadas na MCPD de ratos produzem efeitos ansiogênicos, reduzindo, de forma dependente da dose, o tempo e o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Schmitt e cols., 1995); sendo os sítios destes agonistas bloqueados pelos

antagonistas seletivos, HA-966 e 7-cloroquinurenato, causando efeitos ansiolíticos (Matheus e cols., 1994).

#### **2.4. Receptor NMDA**

O canal iônico no receptor de NMDA não é seletivo para a permeabilidade dos cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Ascher e Nowak, 1988), mas é bloqueado pelas concentrações fisiológicas de  $\text{Mg}^{2+}$  e outros cátions bivalentes (MacDonald e Nowak, 1990). O bloqueio causado pelo  $\text{Mg}^{2+}$  é dependente da voltagem, sendo revertido pela despolarização da membrana celular (Ascher e Nowak, 1988).

O bloqueio do canal pelo magnésio impede sua participação na geração do potencial pós-sináptico excitatório (PPSE). Então o PPSE depende da ativação dos receptores de glutamato não-NMDA como o cainato e o AMPA. Somente o componente final do PPSE é devido ao receptor NMDA. Contudo, quanto mais o neurônio é ativado pela despolarização do receptor não-NMDA, maior é o número de canais NMDA abertos e maior é o fluxo iônico.

Entretanto, muito dos efeitos que ocorrem após ativação do NMDAR são devidos, parcialmente, à concentração intracelular de cálcio (Choi, 1988). A entrada de cálcio causada pela abertura de canais do NMDAR parece ativar uma cascata de segundos mensageiros dependentes de cálcio. Estes são importantes no

desencadeamento de mudanças bioquímicas responsáveis pela modificação de certas formas sinápticas (Schwartz e Kandel, 1991).

O antagonista clássico para o receptor de NMDA é o ácido 2-amino-5-fosfoheptanóico (AP5) que compete com o glutamato e aspartato pelo sítio de ligação (Foster e Fagg, 1984). Adicionalmente, outros agentes farmacológicos exercem o papel de antagonistas não-competitivos, atuando em sítios localizados dentro do canal iônico, entre estes estão incluídos o anestésico quetamina (Honey e cols., 1985), o alucinógeno fenciclidina (Anis e cols., 1983) e o anticonvulsivante MK-801 (maleato de dizocilpina)(Wong e cols., 1986). A fenciclidina e a quetamina são fixadas somente pela despolarização (Schwartz e Kandel, 1991).

A glicina atua como co-agonista para aumento dos efeitos do glutamato em ensaios eletrofisiológicos (Mayer e cols., 1987). Foi sugerido que na ausência de glicina, a estimulação do sítio sensível ao AP5 pode ser ineficaz em abrir o canal iônico (Johnson e Ascher, 1987). A despolarização da membrana deve ser suficientemente alta para que o magnésio possa ser conduzido para fora do canal, permitindo a entrada de cálcio e sódio na célula (Thomson, 1989).

A interação dos sítios pode ser positiva ou negativa, ou seja, a ocupação de um pode modificar a afinidade do outro, aumentando ou diminuindo sua ligação. A questão é particularmente importante quando se observa a habilidade da glicina em desensibilizar o receptor NMDA (Sather e cols., 1990). Foi proposto que o glutamato,

alostericamente, diminui a afinidade do receptor pela glicina. Assim, baixas concentrações de glicina causariam declínio da corrente no receptor de NMDA, pela dissociação da glicina de seu sítio na presença de glutamato, enquanto altas concentrações de glicina superam o decréscimo de afinidade produzido pelo glutamato. (Hood e cols., 1990).

### **3. Aspectos Fisiológicos e Farmacológicos das Poliaminas**

As poliaminas espermina, espermidina e putrescina, são compostos que ocorrem naturalmente no sistema nervoso central de mamíferos (Shaw, 1979; Seiler, 1981). Estudos bioquímicos e funcionais indicam que as poliaminas espermina e espermidina possuem um papel de neurotransmissor e/ou neuromodulador. A liberação de espermina ou espermidina é  $Ca^{2+}$ -dependente quando há estimulação química ou elétrica (Harman e Shaw, 1981; Fage e cols., 1992); podendo sua atividade ser determinada por suas concentrações extracelulares (Gilad e Gilad, 1991; Fage e cols., 1992).

### 3.1. Síntese de Poliaminas

As poliaminas são aminas alifáticas com carga negativa em pH fisiológico.

Os grupos amínicos carregados estão distribuídos ao longo da cadeia carbônica, sendo estas cargas negativas consideradas importantes para a interação eletrostáticas das poliaminas com as proteínas (Seiler, 1991).

As poliaminas endógenas como a putrescina, espermidina, espermina são produzidas pelo metabolismo da ornitina, que é parte do ciclo da uréia no metabolismo celular (Lehninger, 1994). No ciclo da uréia, a enzima arginase converte o aminoácido arginina em ornitina. Nas células de mamíferos, a ornitina descarboxilase (ODC), descarboxiliza a ornitina para formar a putrescina (1,4-diaminobutano). A conversão de putrescina em espermidina e, espermidina em espermina, ocorre pela ação catalítica de aminopropiltransferases, utilizando proprilaminas derivadas da descarboxilação da adenosilmetionina. A velocidade-limite para a conversão da ornitina em poliaminas está diretamente relacionada ao grau de atividade da ODC (Lehninger, 1994).

As poliaminas são encontradas em altas concentrações no meio intracelular de neurônios. No cérebro de várias espécies a putrescina está presente nas concentrações de 4-70 nmoles/g de tecido, enquanto espermidina e espermina apresentam níveis de 50-1400 nmoles/g de tecido. (Shimizu e cols., 1964; Seiler e Schmidt-Glenewinkel, 1975).

### 3.2. Regulação dos Canais no NMDAR pelas Poliaminas

Ranson e Stec (1988), foram os primeiros a demonstrar que em baixas concentrações (micromolares), as poliaminas endógenas como espermina e espermidina, aumentavam o bloqueio da ligação do MK-801 nos canais do NMDAR. Em altas concentrações as poliaminas não afetavam a ligação do MK-801. Resultados semelhantes foram observados no cérebro de ratos (Williams e cols., 1989; Yoneda e cols., 1991) e membranas corticais humanas (Steele e cols., 1990).

As poliaminas mostram uma variação funcional muito grande em diferentes regiões cerebrais (Subramaniam e McGonigle, 1991; Subramaniam e McGonigle, 1993). O aumento do bloqueio na ligação dos canais ocorre na presença de altas concentrações de glutamato e glicina, indicando que as poliaminas atuam de forma distinta de acordo com o grau de ligação de agonistas e co-agonistas (Ranson e Stec, 1988; Williams e cols., 1989; Yoneda e cols., 1991).

Estudos eletrofisiológicos mostram que espermina ou espermidina aumentam a corrente e a voltagem no NMDAR em *Xenopus oocytes* injetados com mRNA do cérebro de ratos (McGurk e cols., 1990; Maciver e cols., 1991), sendo que em altas concentrações de espermina (>250  $\mu\text{M}$ ) há uma diminuição (McGurk e cols., 1990). Estes efeitos das poliaminas são causados pelo aumento na afinidade da glicina

(McGurk e cols., 1990; Benveniste e Mayer, 1993), demonstrado em preparações corticais (Vorobjev e cols., 1993) e registros extracelulares *in vivo* (Chida e cols., 1992). Desta forma, as poliaminas aumentam as correntes no NMDAR na presença de altas concentrações de NMDA e glicina, indicando que a ação das poliaminas é dependente dos efeitos destes sítios (Benveniste e Mayer, 1993).

As poliaminas endógenas como a espermina, apresentam múltiplos efeitos nos subtipos de receptores para o glutamato e o NMDA. Estes incluem estímulos dependente de glicina, independente de glicina e inibição dependente da voltagem (Rock e MacDonald, 1992; Williams e cols., 1994).

A estimulação dependente de glicina ocorre em baixas concentrações de glicina, estando associado a uma baixa afinidade da glicina (McGurk e cols., 1990; Benveniste e Mayer, 1993). A estimulação independente de glicina, que ocorre na presença de altas concentrações de glicina, se caracteriza pelo aumento da corrente e da frequência de abertura dos canais nos receptores de NMDA (Rock e MacDonald, 1992; Benveniste e Mayer, 1993; Williams e cols., 1994). O efeito inibitório da espermina dependente da voltagem é bastante pronunciado em potenciais de membrana hiperpolarizadas, representado por um bloqueio maior dos canais abertos no receptor de NMDA e/ou por modificações das cargas em sua superfície (Rock e MacDonald, 1992; Benveniste e Mayer, 1993; Williams e cols., 1994).



A espermina induz efeito bifásico para a ligação do [<sup>3</sup>H]dizocilpine (MK-801), com uma fase estimulatória em baixas concentrações e uma fase inibitória em altas concentrações (Sacaan e Johnson, 1990; Maravizón e Baudry, 1994). O efeito estimulatório da espermina aumenta a velocidade de associação do [<sup>3</sup>H]dizocilpine, enquanto o efeito inibitório causa uma diminuição no equilíbrio da ligação (Maravizón e Baudry, 1994), sugerindo que a espermina apresenta dois efeitos diferentes no receptor de NMDA, mediados por sítios distintos (Sacaan e Johnson, 1990).

Interpretações semelhantes foram obtidas em experimentos eletrofisiológicos, mostrando que a espermina aumenta a frequência de abertura dos canais em baixas concentrações, mas diminui a amplitude da abertura em altas concentrações (Rock e MacDonald, 1992).

Muitos dos cátions bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), monovalentes ( $\text{Na}^{+}$  e  $\text{K}^{+}$ ) e MK-801, são afetados por altas concentrações de poliaminas (Enomoto e cols., 1992).

As poliaminas afetam a ligação de agonistas e antagonistas do glutamato e da glicina. A espermina aumenta a ligação de antagonistas competitivo do glutamato (Reynolds, 1994), espermina e espermidina aumentam a ligação da glicina (Ranson, 1991). Estes efeitos alostéricos das poliaminas regulam os sítios no NMDAR.

Usando os dados sobre ligação no receptor de vários agonistas, agonistas inversos e antagonistas das poliaminas, o grupo de Molinoff propôs um modelo para a

interação das poliaminas no NMDAR. Neste modelo há pelo menos dois pontos de interação na superfície do NMDAR, um apresentando afinidade em baixas e outro em altas concentrações de poliaminas (Romano e cols., 1992).

### **3.3. Estrutura Molecular dos Sítios de Ação das Poliaminas no NMDAR**

Muito dos estudos demonstram que os efeitos das poliaminas sobre o NMDAR depende do sistema estudado já que os diferentes sistemas possuem variações nos subtipos NR1 e NR2. Em oócitos o NR1 homomérico se expressa quando a subunidade NR1 não possui o N-terminal do aminoácido-21 inserido e contém seis aminoácidos carregados positivamente (NR1a). Esta substituição aumenta a corrente do NMDAR em resposta a espermina. Quando a subunidade NR1 homomérica possui o N-terminal inserido esta resposta das poliaminas não ocorre (Durand e cols., 1992; Durand e cols., 1993). Estas modificações no N-terminal dos aminoácidos modifica sensivelmente os efeitos das poliaminas (Zhong e cols., 1994).

A subunidade NR2 também parece ter papel na ação das poliaminas sobre o NMDAR. A co-expressão de NR2B-NR1a resulta um efeito glicina-dependente ou glicina-independente (Williams e cols., 1994), enquanto NR1a-NR2A mostram apenas um efeito glicina-dependente (Williams e cols., 1994; Lynch e cols., 1994). A co-

expressão das subunidades NR1a-NR2C não apresentam efeitos das poliaminas (Williams e cols., 1994).

Estes estudos demonstram que as subunidades NR1 e NR2 possuem um papel determinante na sensibilidade do NMDAR pelas poliaminas.

### **3.4. Antagonistas das Poliaminas**

Foi demonstrado que ocorre aumento da ligação MK-801 no canal aberto do complexo NMDAR quando as poliaminas se encontram presentes. Por causa desta característica, espermina e espermidina foram classificadas como agonistas para o sítio das poliaminas. Pelo fato das poliaminas atuarem no reconhecimento de diferentes sítios, seria razoável supor a existência de compostos que seletivamente antagonizam os efeitos da espermina e da espermidina.

É vantajoso classificar os antagonistas dos sítios das poliaminas como compostos que não afetam os ensaios bioquímicos e funcionais do receptor de NMDA, quando os agonistas das poliaminas não estão presentes.

Assim, é importante uma distinção semântica entre compostos classificados como antagonistas do sítio das poliaminas daqueles iguais ao  $Mg^{2+}$ , que são antagonistas funcionais não-competitivos do receptor de NMDA. Neste caminho, os antagonistas dos sítios das poliaminas possivelmente afetam os efeitos funcionais

dos receptores de NMDA *in vivo* ou em sistemas celulares intactos, bloqueando os efeitos endógenos dos agonistas das poliaminas.

Avaliações farmacológicas específicas das poliaminas sobre os receptores de NMDA foram realizadas utilizando arcaina (1,4-diguanidinobutano), sendo esta referida como antagonista do sítio das poliaminas (Reynolds, 1990). Na presença de concentrações efetivas máximas de glutamato e glicina, a arcaina inibe a ligação do [<sup>3</sup>H]MK-801 em membranas preparadas a partir do cérebro de ratos. O aumento na concentração de arcaina causa modificações na curva dose-resposta da espermidina (Reynolds, 1990).

Entretanto, experimentos de clampeamento ("patch-clamp") com membranas de neurônios, mostraram que a arcaina apresentava um comportamento semelhante ao Mg<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup>, bloqueando as respostas induzidas pelo NMDA (Donevan e cols., 1992). Os estudos de Donevan e colaboradores mostraram que a arcaina reconhece sítios nos canais do receptor complexo de NMDA, mas não reconhece o sítio das poliaminas. A microinjeção de arcaina no interior da matéria cinzenta periaqueductal mostra um bloqueio do receptor de NMDA apenas quando as poliaminas diminuem as correntes iônicas neste receptor, mas não quando estas se encontram aumentadas, possivelmente, pelo fato da arcaina atuar como antagonista do sítio das poliaminas e não dos sítios presentes nos canais no complexo receptor NMDA (Maione e cols., 1994a).

O ifenprodil é um análogo do SL 82.0715, atua como agente anti-hipertensivo ou agente protetor da neurotoxicidade que ocorre após isquemia cerebral (Gotti e cols., 1988). Poliaminas aumentam (Sacaan e Johnson, 1990) e o ifenprodil diminui (Ranson, 1991) a afinidade da glicina por seu sítio. Entretanto, o ifenprodil não é um antagonista competitivo dos efeitos estimulatórios da espermina sobre a ligação da [<sup>3</sup>H]glicina (Ranson, 1991; Carter e cols., 1991).

Aparentemente o ifenprodil apresenta dois efeitos sobre o receptor de NMDA, sendo estes sensível a glicina e insensível a glicina. Estes efeitos estariam relacionados com os subtipos de unidades heteroméricas presentes na estrutura do receptor de NMDA (Williams, 1993). A ação dependente de glicina está ligada a uma mediação do sítio poliamina-sensível que modula a afinidade da glicina pelo seu sítio. Quando o sítio da glicina se encontra saturado, a modulação da afinidade da glicina por seu sítio é irrelevante, não havendo inibição da resposta do NMDAR pelo ifenprodil.

Em membranas cerebrais de ratos a ligação do ifenprodil ocorre em dois sítios diferentes de acordo com a sensibilidade para as poliaminas. No córtex cerebral de ratos adultos e no cerebelo de ratos imaturos, mas não no cerebelo de ratos adultos, o ifenprodil atua como antagonista competitivo no sítio do glutamato no receptor de NMDA (Schoemaker e cols., 1992). Numerosos experimentos sugerem que o sítio do ifenprodil é bastante heterogêneo. Estudos de clampeamento do hipocampo mostram que o ifenprodil inibe a curva bifásica das poliaminas do NMDAR (Legendre e

Westbrook, 1992). Pode ocorrer um sinergismo entre antagonistas do sítio da glicina e ifenprodil, com efeitos potencializadores (Voltz e cols., 1994). Independente da afinidade do ifenprodil por seu sítio ser baixa ou alta, sua sensibilidade é deslocada pelas poliaminas (Dana e cols., 1991). Estes dados sugerem que os múltiplos efeitos do ifenprodil estão relacionados com o receptor de NMDA.

#### **4. Modelos Animais de Ansiedade**

Muito do conhecimento existente sobre a ansiedade e o medo foram obtidos pela experimentação animal. Através do emprego de modelos animais procura-se reproduzir em laboratório determinados aspectos da sintomatologia, da etologia ou do tratamento da ansiedade. No entanto, nenhum dos modelos existentes isoladamente é capaz de reproduzir por si só todos estes aspectos (Dawson e Tricklebank, 1995).

Muitos trabalhos foram realizados com modelos de animais de ansiedade etologicamente fundamentados (Lister, 1990). Estes modelos baseiam-se nas respostas inatas de medo em diferentes espécies de animais frente a situações e/ou estímulos naturais aversivos, como lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-espécies ou o confronto com predadores (Handley, 1991).

Os modelos animais de ansiedade devem reproduzir situações de medo que sejam equivalentes em humanos. Esta validação do modelo é muito difícil já que implica em uma correspondência direta.

Outro aspecto relevante a ser considerado são os diferentes estados de ansiedade humana. Geralmente incluem vários tipos de desordens de ansiedade: ansiedade, pânico, fobias, obsessão-compulsiva e estresse pós-traumático (Lister, 1990). Estas condições são bem diferenciadas, incluindo sintomas e terapias específicas, devendo ser salientado que os benzodiazepínicos são muito mais efetivos na desordem de ansiedade generalizadas (Nutt e Glue, 1989). Assim, muitos modelos animais de ansiedade podem ser invalidados em alguns aspectos diferenciais da ansiedade (File, 1992).

O labirinto em cruz elevado (LCE), é um modelo experimental empregado inicialmente por Handley e Mithani em 1984. Estes pesquisadores observaram que ratos colocados no centro de um labirinto elevado constituído por dois braços abertos opostos e dois braços circundados lateralmente por paredes, apresentavam uma clara preferência pela exploração destes últimos.

A preferência pela exploração dos braços fechados em relação aos braços abertos de um labirinto, já havia sido descrito por Montgomery (1955) utilizando um labirinto em forma de "Y". Este pesquisador atribuiu esta preferência ao conflito gerado nos animais entre os seus impulsos exploratórios e seus impulsos de medo. Os impulsos

exploratórios seriam evocados com a mesma intensidade tanto nos braços fechados como nos abertos. A exposição dos ratos a situações naturalmente ameaçadoras a sua espécie como a altura e espaços abertos explicaria o maior aversão pela exploração dos braços abertos.

As informações anteriores fornecem uma idéia de que é a altura dos braços abertos ou a iluminação os responsáveis pelos níveis de ansiedade nos animais, com diminuição da atividade exploratória nos braços abertos. Entretanto, a exploração nos braços abertos não se modifica quando a altura aumenta ou diminui, sendo evidenciado que a ausência de proteção lateral dos braços abertos é mais importante no desencadeamento do medo (Falter e cols., 1992; Treit e cols., 1993).

Alterações na luminosidade, geralmente, também não afetam o desempenho basal de roedores no labirinto (Treit e cols., 1993). Quando a iluminação e a altura são mantidas constantes, com variação apenas do espaço aberto, pode-se observar que o medo do espaço aberto é um estímulo predominantemente ansiogênico (Treit e cols., 1993). Drogas que não induzem mudanças na atividade locomotora, quando aumentam o tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos são classificadas como ansiolíticas, sendo que o número de entradas nos braços fechados permite identificar o grau de atividade locomotora (Lister, 1990).

Os braços abertos do labirinto combinam o medo com a novidade, onde o braço aberto iluminado e brilhante, causa medo balanceado, com a relativa aproximação da



plataforma elevada. Em contraste, os braços fechados com a forma de um muro alto, apresentam todos os recursos para uma boa proteção contra predadores.

Permite-se para ratos e camundongos a exploração por determinado tempo, usualmente fixado em 5 minutos, onde normalmente é gasto 20 a 25% deste tempo explorando os braços abertos. Além disso, há aumento dependente da dose para os benzodiazepínicos no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto (Handley e Mithany, 1984; Pellow e cols., 1985).

A utilidade do LCE como modelo a ser explorado é bastante plausível para estudos relacionados a ansiedade. Certamente este tem contribuído para o entendimento das bases psicológicas e fisiológicas da ansiedade.

Nosso trabalho procura demonstrar os efeitos das poliaminas microinjetadas no interior da MCPD de ratos submetidos ao LCE e a interferência sobre estes efeitos de compostos que interagem no complexo receptor NMDA com o sítio da glicina.

## OBJETIVOS

Há evidências na literatura que a matéria cinzenta periaquedutal dorsal comanda as reações aversivas juntamente com outras estruturas clássicas do sistema de defesa como o hipotálamo medial e amígdala. A mediação química das reações comportamentais aversivas, que são processadas na matéria cinzenta periaquedutal parecem envolver os aminoácidos excitatórios. Assim, drogas que aumentam o efeito dos aminoácidos excitatórios apresentam um perfil ansiogênico, enquanto aquelas que antagonizam este comportamento, efeito ansiolítico, detectável em modelos animais de ansiedade.

As poliaminas, tais como espermidina e espermina, são compostos endógenos que influenciam a atividade dos aminoácidos excitatórios através da modulação alostérica no receptor de NMDA. No entanto, não há, até o momento, qualquer estudo que investigue a participação das poliaminas na mediação química das reações comportamentais aversivas, processadas na matéria cinzenta periaquedutal.

Assim, o presente trabalho procura investigar o papel das poliaminas na modulação de estados aversivos processados nesta estrutura. Para atingir esses objetivos foram estudadas:

1. Efeito de diferentes doses de espermina e espermidina, microinjetadas no interior da MCPD de ratos machos de 4 meses de idade;

2. Ação da espermina sobre os efeitos da arcaína e ifenprodil, antagonistas dos sítios das poliaminas no complexo receptor NMDA;
  
3. A interferência na ação das poliaminas injetadas na MCPD de compostos que se ligam ao sítio da glicina no complexo receptor NMDA.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar machos com 4 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pesando entre 300-350g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração "*ad libitum*". A temperatura e a luminosidade no interior da sala era controlada artificialmente (temperatura:  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; ciclo regular claro/escuro de 12 horas).

### 2. ESTEREOTAXIA

Os animais foram anestesiados com Equitesin® (3 ml/kg, intra-peritoneal) e fixados ao aparelho estereotáxico. Uma cânula de aço (o.d.: 0,7 mm; comprimento: 13 mm) foi implantada diretamente na MCPD para administração intracerebral direta das drogas. A cânula guia foi introduzida 1,9 mm lateralmente ao lâmbda, num ângulo de  $22^{\circ}$  em relação ao plano sagital (horizontalmente à cabeça), a uma profundidade de 2.0 mm a partir da superfície da cabeça. A cânula foi fixada ao osso por dois parafusos e cimento acrílico. A possível obstrução da cânula guia foi impedida pela introdução de um estilete no seu interior.

### 3. DROGAS

As drogas utilizadas foram: cloridrato de espermina (RBI), cloridrato de espermidina (RBI), sulfato de arcaina (RBI), tartarato de ifenprodil (RBI), ( $\pm$ )HA-966 (RBI) e glicina (Sigma, EUA). As drogas foram dissolvidas em líquido céfalo raquidiano artificial (líquor) de acordo com a fórmula: NaCl (8.1 g), KCl (0.25 g), CaCl<sub>2</sub> (0.14 g), MgCl<sub>2</sub> (0.11 g) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.0 g) (Elliot e Jaspers, 1949). Foram microinjetadas num volume final de 0.4  $\mu$ l cinco minutos antes do teste.

### 4. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Os testes comportamentais foram realizados utilizando o labirinto em cruz elevado de acordo com o método descrito por Pellow e colaboradores (1985), posteriormente utilizado experimentalmente (Schmitt e cols., 1995). Este equipamento apresenta a forma de uma cruz grega de madeira formado por dois braços abertos opostos (50 x 10 x 1 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), estendidos a partir de uma plataforma central (10 x 10 cm). O soalho do labirinto foi pintado com resina impermeável para evitar a impregnação de urina. O labirinto fica elevado a 50 cm do chão. As bordas dos braços abertos é circundada por um plástico

transparente com 1 centímetro de altura. Os testes foram realizados numa sala com isolamento acústico, luminosidade baixa e indireta.

## 5. PROCEDIMENTOS

Sete dias após a cirurgia, os ratos foram agrupados ao acaso. A microinjeção na MCPD foi realizada por intermédio de uma agulha odontológica (o.d.: 0.3 mm; comprimento: 16.3 mm), inserida no interior da cânula guia. Um cateter de polietileno (PE 10), foi interposto entre o exterior da agulha e de uma microseringa Hamilton<sup>®</sup> de 5.0 µl. Uma injeção bem sucedida foi avaliada imediatamente através do movimento de uma pequena bolha de ar na interfase droga/água destilada no interior do tubo de polietileno.

Apenas no experimento 1 os ratos recebem uma única microinjeção de 0.4 µl, enquanto nos outros experimentos eles recebem duas microinjeções de 0.2 µl, separada por um período de 5 minutos.

Cinco minutos após o término da microinjeção os animais foram colocados no interior de uma arena de madeira (60 x 60 x 35 cm), por 5 minutos, com a finalidade de aumentar a atividade geral no labirinto em cruz elevado por uma habituação ao estresse, como foi sugerido por Pellow e colaboradores (1985). Posteriormente, os ratos foram colocados no centro do labirinto, com a face voltada

para o braço fechado, permitindo-se a exploração de seus ramos por 5 minutos. O observador se manteve a 1 metro do labirinto em cruz elevado, sendo anotado o número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo de permanência em cada um deles. Após os testes comportamentais, os ratos foram sacrificados pela administração de uma dose elevada do anestésico Equitesin<sup>®</sup> (4 ml/kg, intra-peritoneal). Posteriormente, os ratos foram microinjetados com 0,3 µl de azul de Evans a 2%. Cortes histológicos de 50 µm foram obtidos utilizando o criostato (Cryocut<sup>®</sup> 1800) para identificação do sítio de injeção, sendo excluído da análise estatística os ratos onde este sítio não era a MCPD. Para análise, a atividade de entrada nos braços abertos foi transformada em porcentagem de entradas (razão entre entradas nos braços aberto e total de entradas X 100) e, o tempo dispendido nos braços abertos em porcentagem do tempo total em ambos os braços. Drogas que induzem aumento no tempo e número de entradas nos braços abertos, ou ambas, são indicativas de efeitos ansiolíticos, caso contrário, indicam uma ação ansiogênica.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. Quando foram detectadas diferenças entre as variâncias pelo teste de Bartlett, os dados foram transformados pela raiz quadrada, para tornar as médias mais homogêneas, sendo

realizada uma análise de variância (ANOVA), nos dados transformados. As comparações entre os tratamentos e os respectivos grupos controle foram seguidas pelo teste de Dunnett, já as comparações entre cada tratamento foram feitas pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).



## RESULTADOS

Na figura 1 estão representados os cortes obtidos a partir do atlas de Swanson (1992), mostrando os sítios de microinjeções na região da MCPD. Estes sítios já foram descritos em outros trabalhos (Guimarães e cols., 1991; Matheus e cols., 1994; Schmitt e cols., 1995).

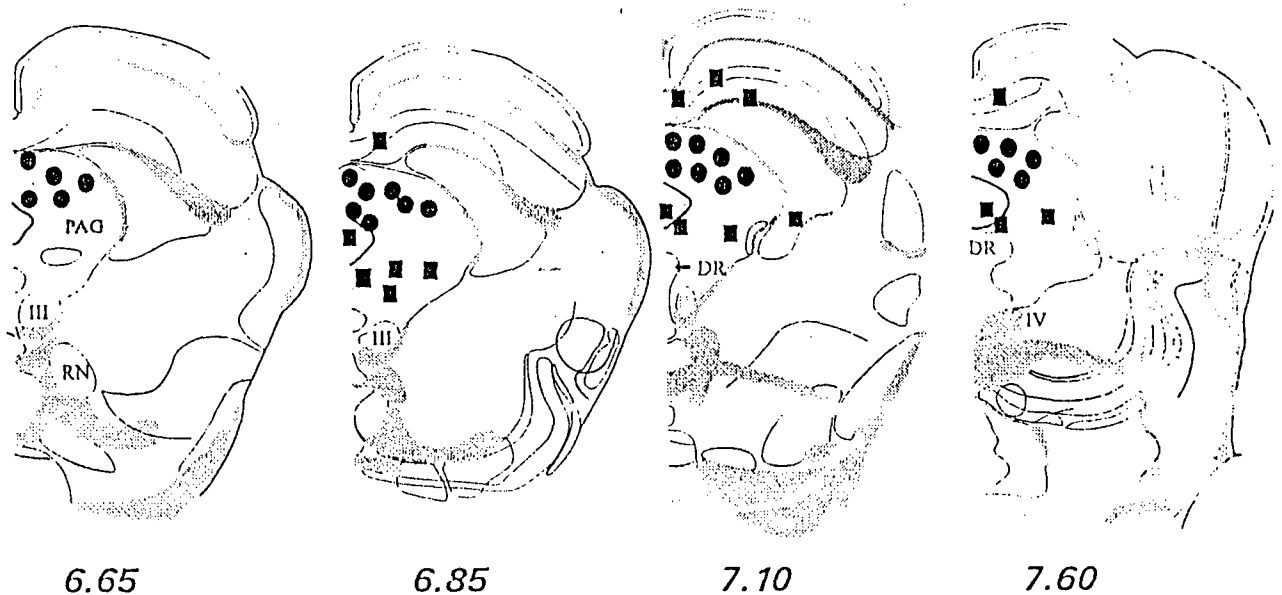


Figura 1: Diagrama de cortes da região frontal do cérebro de ratos (Swanson, 1992), mostrando os sítios de microinjeções com azul de Evans que estavam na MCPD (●) ou não (■). O número de pontos é menor que o número de ratos devido a sobreposição dos sítios em diferentes animais dos diversos grupos. -DR- núcleo da rafe dorsal, -RN- núcleo vermelho, -PAG- matéria cinzenta periaquedutal.

## **Experimento 1: Efeitos das poliaminas na exploração do labirinto em cruz elevado**

### **Efeitos da Espermina**

A microinjeção de diferentes doses de espermina no interior da MCPD produz efeito significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{6,58}=2.03$ ,  $P<0.05$ ) e no tempo de permanência nos braços abertos ( $F_{6,58}=1.85$ ,  $P<0.05$ ); não afetando o número de entradas nos braços fechados ( $F_{6,58}=1.69$ , NS). A análises “post hoc” dos dados pelo teste de Dunnett mostrou um aumento significativo ( $P<0.05$ ), no tempo de permanência nos braços abertos quando se empregou a dose de 2.5 nmol, o mesmo não ocorrendo para porcentagem de entradas nos braços abertos, mas uma análise na figura 2 mostra uma tendência para o aumento deste parâmetro na dose de 2.5 nmol.

### **Efeitos da Espermidina**

A microinjeção de diferentes doses de espermidina no interior da MCPD produz um efeito significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{7,78}=0.02$ ,  $P<0.05$ ) e no tempo de permanência nos braços abertos ( $F_{7,78}=3.61$ ,  $P<0.005$ ); mas não afeta o número de entradas nos braços fechados ( $F_{7,78}=1.69$ , NS). A análise “post hoc” pelo teste de Dunnett, mostrou um aumento significativo ( $P<0.05$ ), no tempo de permanência nos braços abertos para a dose de 0.62 nmol, o que não ocorreu em relação a porcentagem de entradas nos braços abertos, sendo que a análise da figura 3 mostra uma tendência para o aumento deste parâmetro na dose de 0.62 nmol.

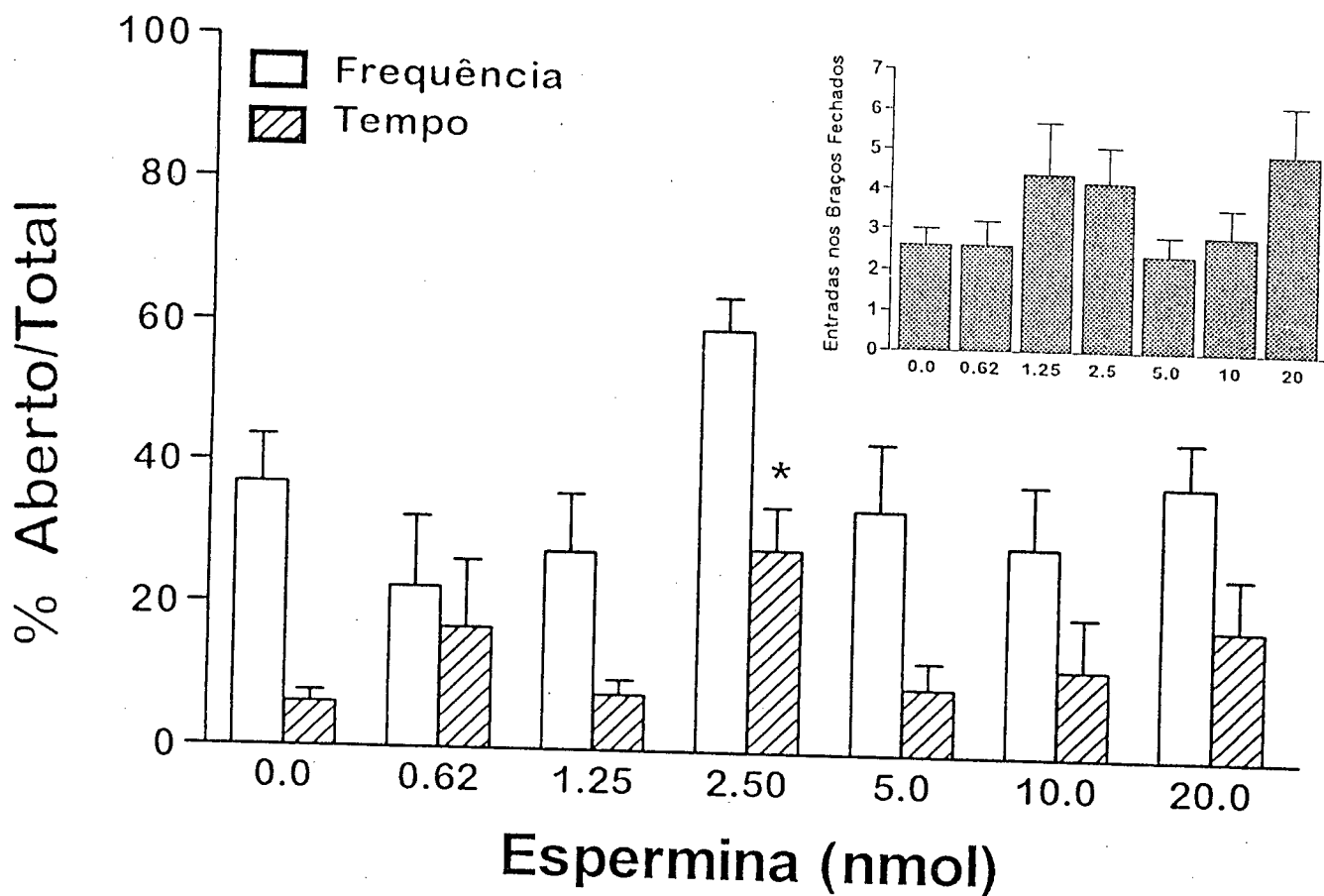


Figura 2: Efeito da espermina microinjetada (0.4  $\mu$ l), dentro da MCPD de ratos, 10 min antes de serem submetidos ao LCE. As colunas representam as médias e as barras os erros padrões da média de 8-10 animais. \* $P < 0.05$  (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

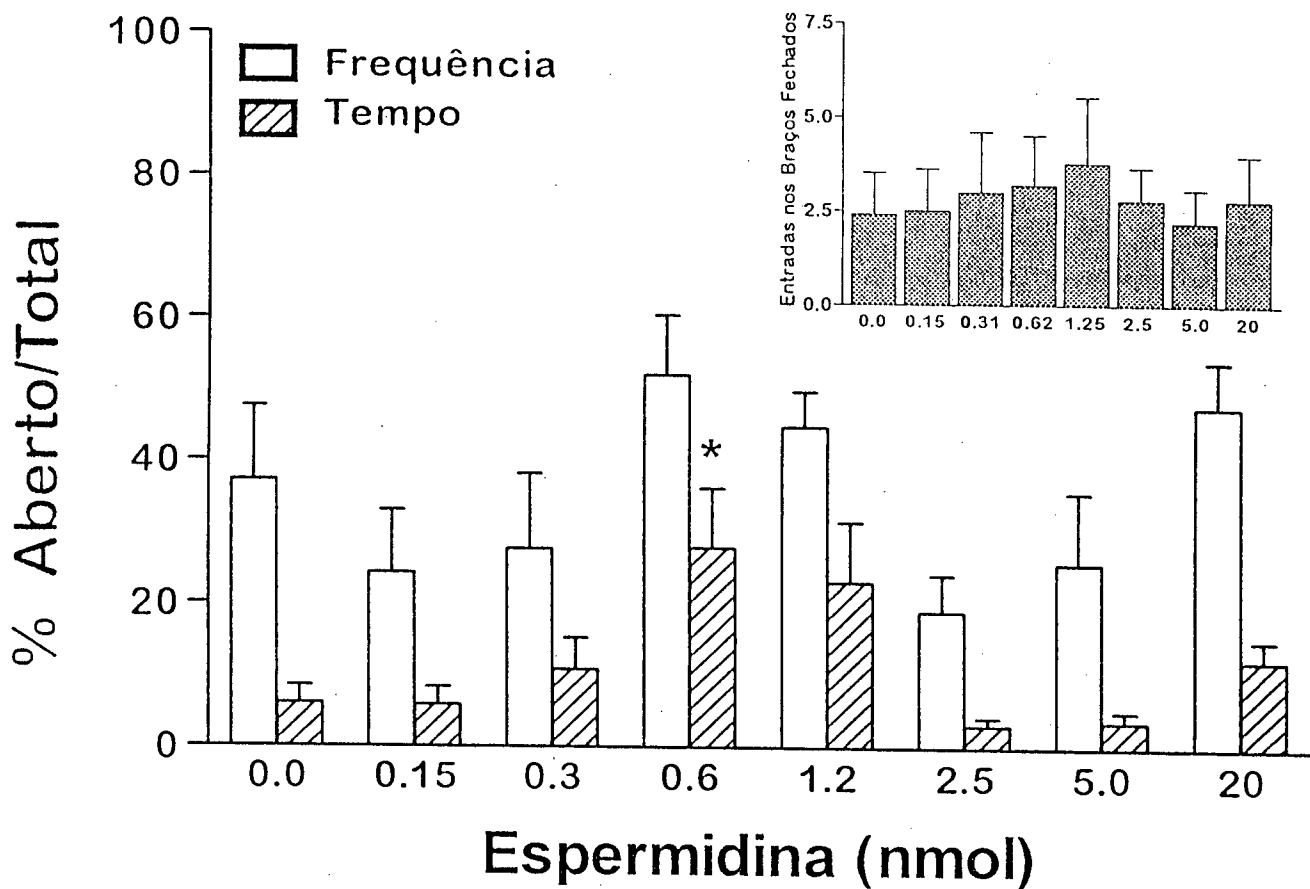


Figura 3: Efeito da espermidina microinjetada (0,4  $\mu$ l) no interior da MCPD de ratos, 10 min antes de serem submetidos ao LEC. As colunas representam as médias e as barras os erros padrões da média de 9-12 animais. \*  $P < 0.05$  (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

## **Experimento 2:** Influência do tratamento com antagonistas das poliaminas no efeito da espermina no LCE

A microinjeção de espermina (2.5 nmol) produz efeito significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{6,64}=3.35$ ,  $P<0.01$ ) e no tempo de permanência nos braços abertos ( $F_{6,64}=6.41$ ,  $P<0.0001$ ); não afetando o número de entradas nos braços fechados ( $F_{6,64}=1.84$ , NS). A análise “post hoc” dos dados feitas pelo teste de Tukey, mostrou um aumento significativo ( $P<0,05$ ) na porcentagem de entradas nos braços abertos, em animais que receberam espermina seguida de líquor, para as doses de 2.5 nmol de espermina. Animais microinjetados com arcaina ou ifenprodil seguida de líquor ou espermina, não mostraram alterações nos parâmetros baseados no controle, não houve aumento na porcentagem de entradas ou no tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 4).

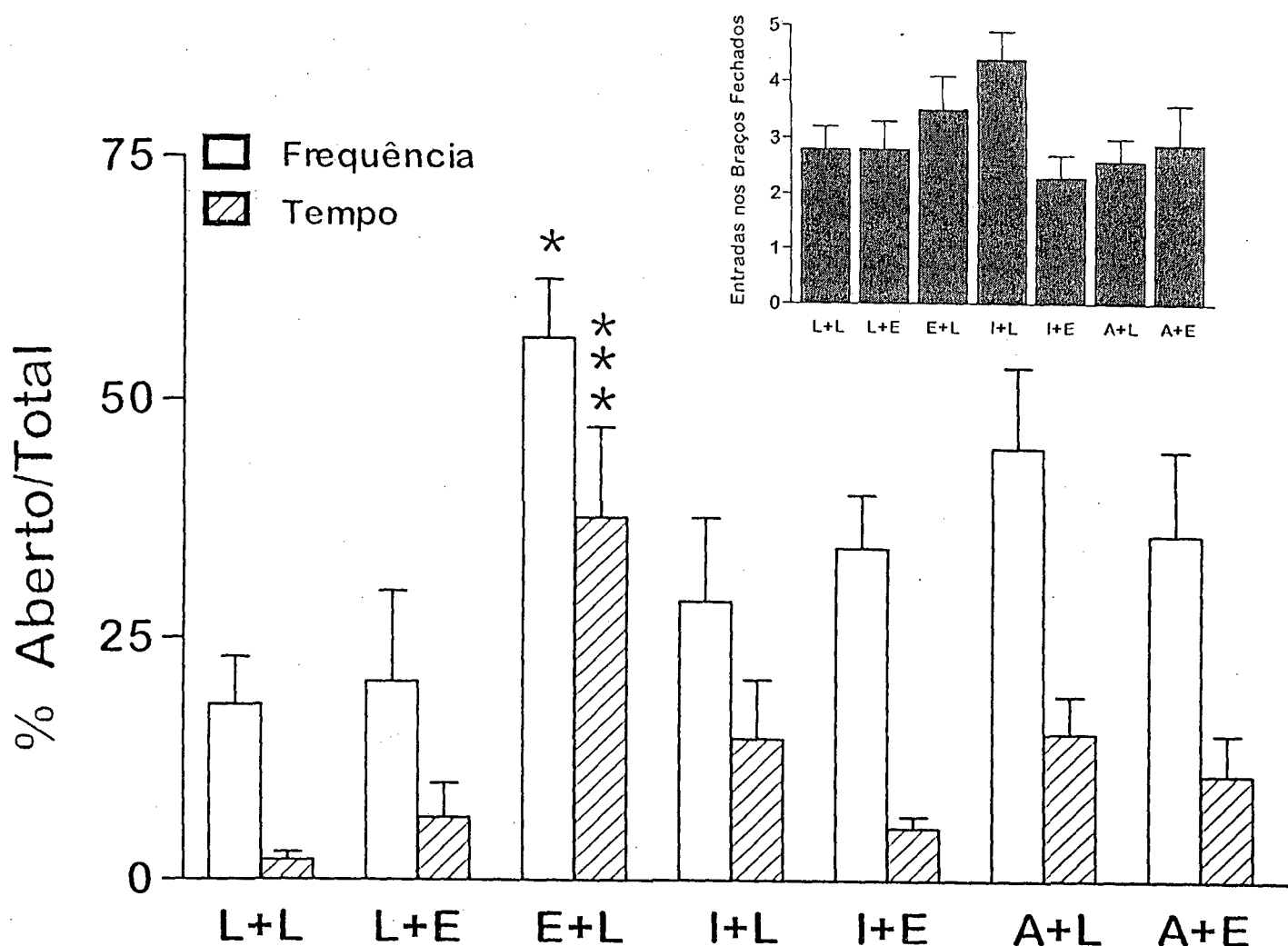


Figura 4: Efeitos da microinjeção de espermina (2.5 nmol) administrada simultaneamente com ifenprodil (5 nmol) ou arcaína (4 nmol), num intervalo de 5 min entre a primeira e a segunda injeção, em ratos submetidos ao LCE. O resultados foram analisados pelo teste de Tukey. As colunas representam as médias e as barras os erros padrões da média de 9-12 animais ( $P < 0.05$ ). L = Líquor, E = Espermina, I = Ifenprodil, A = Arcaina.

### **Experimentos 3:** Influência do pré-tratamento com glicina no efeito da espermina no LCE

A administração simultânea de glicina (80 nmol) com espermina (2.5 nmol), em intervalos de 5 min entre as microinjeções, produz efeito significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{4,45}=2.77$ ,  $P<0.05$ ) e no tempo de permanência nos braços abertos ( $F_{4,45}=13.53$ ,  $P<0.01$ ); mas não afeta o número de entradas nos braços fechados ( $F_{4,45}=1.13$ , NS). A análise “post hoc” dos dados pelo teste de Tukey, mostrou um aumento significativo ( $P<0.05$ ), na porcentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos para as doses de 2.5 nmol de espermina. Esta análise dos dados não mostrou efeitos nos parâmetros estudados em ratos que receberam microinjeções simultâneas de glicina e líquido ou espermina e glicina (Fig. 5).

### **Experimento 4:** Efeitos da espermina no labirinto em ratos pré-tratados com ( $\pm$ )HA-966

A microinjeção de  $\pm$ HA-966 antes da espermina (1.25 nmol) produz efeito significativo no tempo de permanência nos braços abertos ( $F_{3,37}=4.30$ ,  $P<0.05$ ), mas não afeta a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{3,37}=0.42$ , NS) ou o número de entradas nos braços fechados ( $F_{3,37}=1.13$ , NS). A análise “post hoc” dos dados pelo teste de Tukey, mostrou um aumento significativo ( $P<0.05$ ) no tempo de permanência nos braços abertos para as doses de 1.25 nmol de espermina em ratos pré-tratados com  $\pm$ HA-966 (Fig 6).

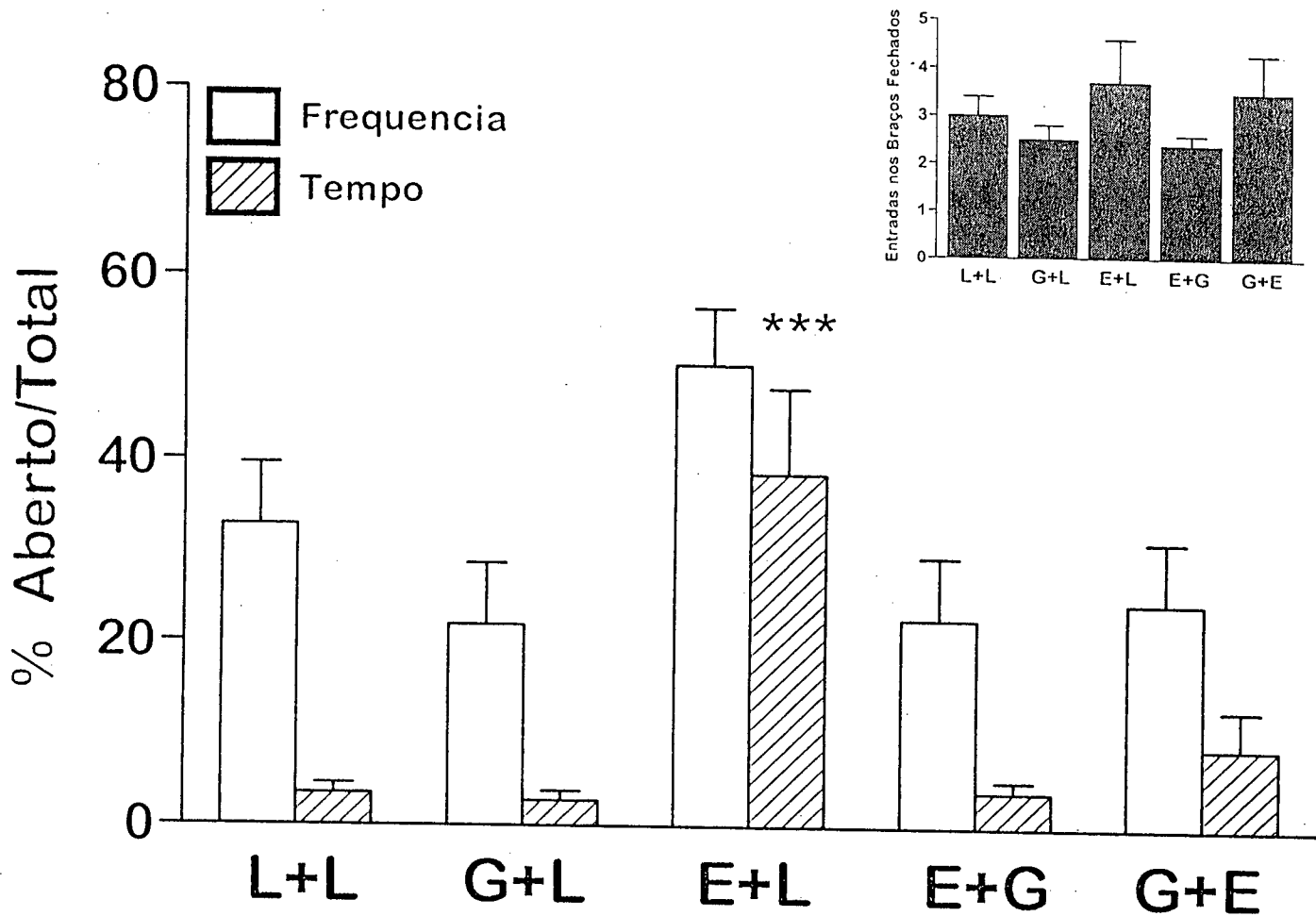


Figura 5: Efeito da microinjeção de espermina (2.5 nmol) administrada simultaneamente com glicina (80 nmol), num intervalo de 5 min entre a primeira e a segunda injeção, em ratos submetidos ao LCE. O dados foram analisados pelo teste de Tukey. As colunas representam as médias e as barras os erros padrões da média de 9-12 animais ( $P < 0.05$ ). L = Líquor, G = Glicina, E = Espermina.



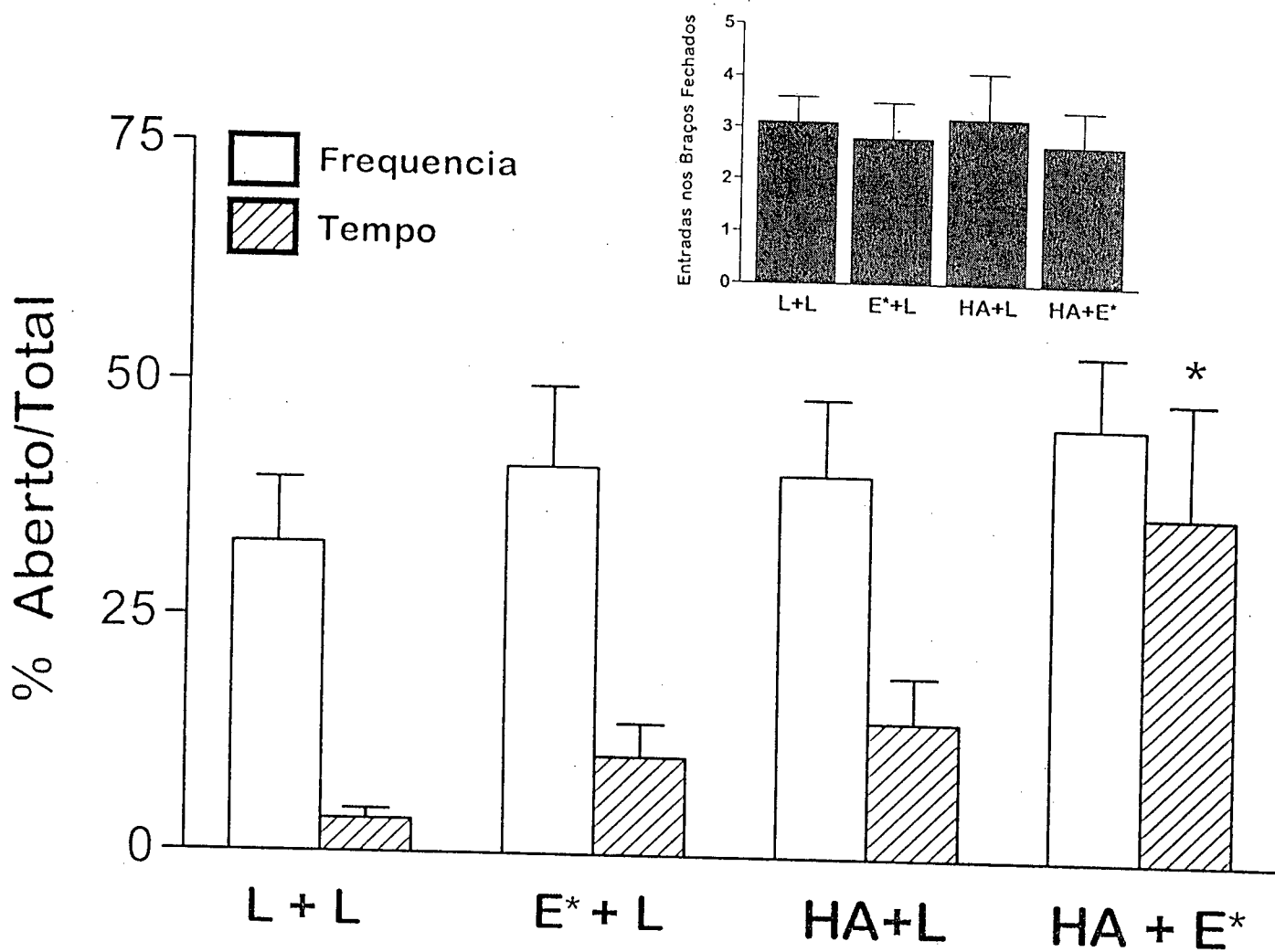


Figura 6: Efeitos da espermina em ratos pré-tratados com ( $\pm$ )HA-966. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média de 10-12 animais ( $P < 0,05$ ). L = Líquor, E = Espermina, H =  $\pm$ HA-966.

## DISCUSSÃO

Os resultados de nossos estudos demonstram que a microinjeção das poliaminas espermidina e espermina no interior da MCPD, aumenta a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, sendo que a porcentagem de entradas nos braços abertos acompanha este aumento. Estes efeitos ocorrem sem modificações na atividade exploratória geral, considerando que não há mudanças na frequência de entradas nos braços fechados. Assim, os resultados obtidos sugerem que a microinjeção de espermidina e espermina no interior da MCPD causa um efeito ansiolítico, baseado no fato que o aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência no seu interior são indicativos de medo/ansiedade (File, 1992). Estes efeitos ocorrem numa estreita faixa de ação, como se observa na curva dose-resposta em forma de sino.

Quando os animais foram pré-tratados com arcaina ou ifenprodil, antagonistas dos sítios das poliaminas (Reynolds, 1990; Ranson, 1991), não foi observado um bloqueio do efeito ansiolítico da espermina microinjetada no interior da MCPD. Apesar de serem antagonistas seletivos das poliaminas, a espermina pode atuar em sítios onde não há interação com a arcaina e o ifenprodil. Nossos dados também sugerem que a ação ansiolítica das poliaminas ocorrem no sítio do receptor de NMDA presentes na MCPD causando: 1. Sinergismo de uma

dose sub-efetiva de espermina pelo ( $\pm$ )HA-966 e, 2. Bloqueio do efeito da espermina pela administração prévia de glicina.

Existe uma maior quantidade de dados eletrofisiológicos e bioquímicos obtidos *in vitro* que *in vivo*, relacionado as funções das poliaminas. Assim, a microinjeção bilateral de espermidina ou espermina no núcleo accumbens de ratos, inibe a hiperatividade induzida pela microinjeção de anfetamina neste sítio (Hirsch e cols., 1987). Em coelhos, injeções intracerebroventricular (ICV) de espermina, causam sincronização das ondas cerebrais associada com sedação parcial, dependente da dose e, a injeção de espermidina induz sincronização cortical em baixas doses, enquanto altas doses causam, simultaneamente, desincronização cortical e estado de vigília (Bo e cols., 1990). Ferchmin e Eterovi (1990), demonstraram que injeções intraperitoniais de baixas doses de putrescina diminui apenas o comportamento exploratório no labirinto em cruz grega e, em altas doses, diminui também a exploração dos compartimentos claro e escuro.

Injeções sistêmicas de poliaminas em ratos submetidos ao labirinto em T de 14-unidades, mostrou que as mesmas também modulam os processos de memória envolvidas com o NMDAR (Shimada e cols., 1994). Além disso, as poliaminas atuam como um modulador positivo no receptor de NMDA, inibindo a ligação do CPP no córtex pré-frontal, causando uma estereotipia característica

nestes animais, que se manifestava por corridas, giros e saltos quando estes se encontravam no campo aberto (Crawley e cols., 1992).

Investigando os efeitos das poliaminas, Maione e colaboradores (1994a; 1994b) mostraram que a microinjeção de baixas doses de espermidina (0.01  $\mu\text{g}$ ) no interior da MCP, aumenta a pressão arterial e a frequência cardíaca, obtidos pela injeção de NMDA neste sítio e que altas doses de espermidina (0.1 - 1  $\mu\text{g}$ ), diminuem estas alterações cardiovasculares previamente obtidas, podendo estes efeitos serem revertidos pela arcaina.

Ransom e Steck (1988) revelaram que as poliaminas espermidina e espermina produzem em concentrações micromolares aumento da afinidade do [ $^3\text{H}$ ]MK-801, através de sítios diferentes daqueles para agonistas do glutamato e da glicina. Efeitos opostos são observados em doses milimolares, onde a espermidina e espermina não aumentaram a ligação do [ $^3\text{H}$ ]MK-801 (Williams e cols., 1989). Estas respostas bifásicas se devem ao bloqueio da ligação nos canais do NMDAR, como foi demonstrado por recentes dados eletrofisiológicos. Segundo Rock e Macdonald (1995), as poliaminas aumentam as correntes no NMDAR através do aumento na frequência de abertura destes canais e da afinidade do receptor da glicina. De acordo com estas observações as poliaminas modificam a corrente no NMDAR, produzindo alterações voltagem-dependente para abertura ou bloqueio dos canais. Estes efeitos bifásicos das poliaminas,

possivelmente, ocorrem pela mediação de dois sítios separados no NMDAR (Sacaan e Johnson, 1990).

Foi demonstrado no LCE, uma ação ansiolítica para compostos que reduzem a atividade do NMDAR quando microinjetados no interior da MCPD (Schmitt e cols., 1990; Guimarães e cols., 1991; Matheus e cols., 1994) e uma ação ansiogênica para aqueles que aumentam a atividade do NMDAR (Schmitt e cols., 1995).

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que as doses de 0.6 nmol de espermidina ou 2.5 nmol de espermina revelaram um efeito ansiolítico. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Maione e colaboradores (1994a; 1994b), onde o aumento da pressão arterial e frequência cardíaca induzidos pela microinjeção de NMDA no interior da MCP são reduzidos pela administração simultânea de espermidina, sendo estes efeitos compatíveis com as alterações neurovegetativas relacionados à reação de defesa (Abrahams e cols., 1960). Vários trabalhos tem demonstrado que a espermidina apresenta uma potência maior que espermina em estudos eletrofisiológicos (Lehmann e cols., 1990; Reynolds, 1994), esse fato está de acordo com nossos resultados onde a potência a espermidina apresenta uma potência maior que a espermina na indução de respostas comportamentais ansiolíticas nos ratos submetidos ao LCE.

Apesar dos estudos *in vivo* e *in vitro* mostrarem que o efeito bifásico da espermina parece ser dependente da dose, não foi possível demonstrar esta relação nas doses de espermidina e espermina utilizadas. Estas observações podem estar relacionadas ao fato de que o LCE é um modelo animal de ansiedade onde os efeitos de drogas dependem dos níveis da linha de base do controle.

Admitindo-se que as poliaminas são substâncias endógenas que modulam o receptor de NMDA com efeitos bifásicos, espera-se que resultados experimentais obtidos não dependam apenas das doses de poliaminas administradas, mas também do estado emocional basal em que se encontra o animal. Assim, a administração simultânea de espermina (2.5 nmol) e líquido cefalorraquidiano fornece diferentes resultados, dependendo da ordem em que estas substâncias foram administradas (experimento 2), sendo observado efeito ansiolítico apenas quando a microinjeção de espermina (0.2  $\mu$ l) antecede a de líquido cefalorraquidiano.

Como as poliaminas podem modular alostericamente o sítio da glicina no NMDAR (Rock e Macdonald, 1995), nossos dados poderiam ser explicados através de modificações na concentração de glicina endógena, dependendo da ordem das substâncias microinjetadas, quando o animal se encontra imobilizado. A administração de espermina (2.5 nmol) seguida de líquido causa efeito ansiolítico, possivelmente, pela diminuição da ação da glicina sobre o seu sítio e

bloqueio da liberação endógena posterior. A concentração basal de glicina seria suficiente baixa para permitir uma inibição do NMDAR pela espermina (McGurk e cols., 1990; Benveniste e Mayer, 1993), sendo a inativação deste receptor o responsável pelo efeito observado (Schmitt e cols., 1990; Guimarães e cols., 1991; Matheus e cols., 1994). Entretanto, quando se administra líquor seguida de espermina, não há alterações dos parâmetros quando comparado aos níveis dos grupos controle, possivelmente, nesta situação o líquor não influencia a atividade do receptor e os níveis endógenos de glicina se elevam de tal forma que quando se administra espermina, esta passa a não modular o sítio da glicina devido ao aumento na concentração endógena deste co-agonista do glutamato. Outra hipótese estaria relacionada com o tempo necessário para ação das poliaminas, já que esses são diferentes, de acordo com a ordem de administração.

O pré-tratamento destes animais com arcaina (4 nmol) ou ifenprodil (5 nmol), antagonistas das poliaminas, não bloqueou o efeito ansiolítico da espermina (2.5 nmol). É importante destacar que a administração das doses entre 0.1-1 µg de espermidina no interior da MCP reduz os efeitos cardiovasculares do NMDA, sendo este efeito bloqueado por 1 µg de arcaina (Maione e cols., 1994b). Utilizando a mesma dose de arcaina (4 nmol), não conseguimos reverter o efeito de 0.8 µg (2.5 nmol) de espermina microinjetada na MCPD. O mesmo ocorreu com o outro antagonista das poliaminas, o ifenprodil. A espermina microinjetada

no interior do ventrículo lateral facilita a potencialização a longo prazo dependendo da dose, através da ativação do NMDAR, sendo este efeito bloqueado pela microinjeção prévia de 5 nmol de ifenprodil (Chida e cols., 1992). O ifenprodil apresenta uma atividade glicina-sensível e quando o sítio da glicina se encontra saturado não há inibição da resposta do NMDAR pelo ifenprodil (Williams, 1993), o mesmo não ocorrendo com a arcaina, já que na presença de altas concentrações de glicina a arcaina inibe a atividade do NMDAR (Reynolds, 1990). Entretanto, a microinjeção de arcaina no interior da matéria cinzenta periaquedutal lateral de ratos, previne apenas os efeitos negativos, ou seja, a inativação do NMDAR induzido pelo atividade moduladora das poliaminas (Maione e cols., 1994b).

Nos referimos anteriormente, que o efeito ansiolítico ocorre pela inativação do NMDAR e diminuição na concentração endógena de glicina. Estas seriam as condições ideais para a manifestação dos efeitos da arcaina ou ifenprodil, onde a inativação do NMDAR permitiria a atuação da arcaina e as baixas concentrações de glicina um antagonismo gerado pelo ifenprodil.

Nossos resultados mostram que o efeito da espermina (2.5 nmol) é revertido pela glicina (80 nmol), independente da ordem em que estas drogas foram microinjetadas. Apesar do efeito ansiogênico obtido por Schmitt e



colaboradores (1995) utilizando o LCE como modelo animal de ansiedade, no presente trabalho o mesmo não foi observado para esta dose de glicina.

As poliaminas endógenas como a espermina apresentam múltiplos efeitos nos subtipos de receptor para glutamato e NMDA, sendo um deles a estimulação independente da glicina, onde as poliaminas na presença de altas concentrações de glicina aumentam a corrente e a frequência de abertura do canal no NMDAR (Rock e MacDonald, 1992; Benveniste e Mayer, 1993; Williams e cols., 1994).

Nossos dados mostram que microinjeção de glicina no interior da MCPD reverte o efeito da espermina, sendo que animais pré-tratados com ( $\pm$ )HA-966 (50 nmol), um antagonista clássico do sítio da glicina no NMDAR, não induz efeito ansiolítico nesta dose no LCE, como obtido anteriormente por Matheus e colaboradores (1994). Contudo, quando da administração simultânea com uma dose de espermina (1.25 nmol), observa-se um sinergismo do efeito desta dose inicialmente ineficaz de espermina.

O efeito ansiolítico do ( $\pm$ )HA-966 se deve exclusivamente ao enantiômero R-(+), enquanto que o enantiômero S-(-) é responsável por efeitos sedativos (Dunn e cols., 1992). Aparentemente o ( $\pm$ )HA-966 interage com o sítio da glicina atuando funcionalmente como antagonista (Meiners e cols., 1989).

Nossos dados mostram que a interação do ( $\pm$ )HA-966 com uma dose não efetiva de espermina leva a um sinergismo dos efeitos dessas drogas, induzindo uma ação ansiolítica em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado, sugerindo que a espermina pode modular o sítio da glicina no NMDAR. Esse resultado pode estar relacionado às modificações que ocorrem no sítio da glicina e/ou de seu antagonista induzidas pelo efeito modulador das poliaminas, podendo aumentar ou diminuir a afinidade deste sítio para seu agonistas ou antagonistas.

Em resumo, nossos dados mostram uma ação ansiolítica das poliaminas microinjetadas no interior da MCPD, não permitindo evidenciar sua ação sobre o sítio das poliaminas no NMDAR. Por outro lado mostram a interferência na ação ansiolítica das poliaminas aplicada na MCPD de compostos que se ligam ao sítio da glicina no complexo NMDAR. Considerando que as poliaminas são componentes naturais do cérebro, estes resultados sugerem que o sistema de poliaminas na MCPD podem modular a aversão e possivelmente a ansiedade. Outros estudos devem ser desenvolvidos com antagonistas mais seletivos para os vários sítios de ação das poliaminas no NMDAR, no sentido de elucidar o papel dessas drogas na MCPD e seu efeito na ansiedade.

## CONCLUSÃO

1. As poliaminas espermidina e espermina possuem uma papel modulador na transmissão mediada por aminoácidos excitatórios presentes no interior da MCPD, podendo induzir efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE.
2. O efeito ansiolítico da espermina microinjetada no interior da MCPD não foi bloqueado em ratos pré-tratados com arcaina ou ifenprodil, antagonistas das poliaminas no NMDAR.
3. O efeito ansiolítico da espermina é revertido pela glicina, independente da ordem em que estas substâncias são microinjetadas no interior da MCPD.
4. Observa-se um sinergismo na interação de doses inefetivas de espermina e de ( $\pm$ )HA-966 no interior da MCPD.

## RESUMO

A relação entre a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) e o efeito de drogas que atuam no receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) tem sido estudadas recentemente. A injeção de compostos no interior da MCPD que deprimem o NMDAR/receptores-glicina, mostram efeitos ansiolíticos, enquanto agonistas para o sítio da glicina exibem efeitos ansiogênicos. O complexo NMDAR também possui sítios para a ligação das poliaminas, sendo obtido efeitos de potencialização ou inibição da corrente no canal do NMDAR, dependentes da dose.

Nossos estudos investigam os efeitos comportamentais da espermidina (ED) ou espermina (EP) no interior da MCPD, sendo utilizado para análise ratos machos Wistar, cronicamente implantados com uma canula dirigida para a MCPD e, posteriormente, testados no labirinto em cruz elevado (LCE).

O aumento ( $P < 0.05$ ) na exploração dos braços abertos é observado após a microinjeção (0.4  $\mu$ l) de 0.62 nmol de ED ou 2.5 nmol de EP no interior da MCPD. O efeito ansiolítico de 2.5 nmol de EP (0.2  $\mu$ l) não é bloqueado pelo pré-tratamento (5 min) por microinjeção (0.2  $\mu$ l) de ifenprodil (5 nmol) ou por arcaina (4 nmol) no interior da MCPD. Além disso, EP (2.5 nmol, 0.2  $\mu$ l) não mostrou aumento na exploração dos braços abertos de ratos pré-tratados (5 min) com

glicina (80 nmol, 0.2  $\mu$ l). Contudo, tratamento prévio (5 min) com  $\pm$ HA-966 (50 nmol, 0.2  $\mu$ l) mostrou aumento na exploração dos braços abertos numa dose inicialmente inefetiva de EP (1.25 nmol, 0.2  $\mu$ l).

Nossos dados mostram uma ação ansiolítica das poliaminas microinjetadas no interior da MCPD, possivelmente, ocorre devido a sua ação sobre o sítio das poliaminas no NMDAR, não sensível a arcaina e ifenprodil. Esses dados também mostram a interferência na ação ansiolítica das poliaminas aplicada na MCPD de compostos que se ligam ao sítio da glicina no complexo NMDAR.

## ABSTRACT

The relationship of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) and anxiolytic effects of drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) have been examined recently. In brief, compounds applied within DPAG, that depress NMDAR/glycine-receptors, showed anxiolytic effects, whereas agonists of the glycine-site at the NMDAR exhibit an anxiogenic profile. NMDAR complex also supports binding sites for polyamines and a dose-dependent effect, potentiation or inhibition of the NMDAR channel currents can be obtained.

In the current studies the behavioral effects of spermidine (SD) or spermine (SP) injected into DPAG were analysed using male Wistar rats, with a chronically implanted cannula aimed to DPAG, tested in the elevated plus-maze test (EPM).

An increase ( $P < 0.05$ ) in open arm exploration, was observed after the microinjection (0.4  $\mu$ l) of 0.62 nmol of SD or of 2.5 nmol of SP into DPAG. The anxiolytic effect of 2.5 nmol SP (0.2  $\mu$ l) was blocked in rats previously (5 min) microinjected (0.2  $\mu$ l) with ifenprodil (5 nmol) or arcaine (4 nmol) into DPAG. In addition, SP (2.5 nmol, 0.2  $\mu$ l) failed to show an increase in open arms exploration

of rats pre-treated (5 min) with glycine (80 nmol, 0.2  $\mu$ l). However, previous (5 min) treatment with  $\pm$ HA-966 (50 nmol, 0.2  $\mu$ l) revealed an increase in open arms exploration in an ineffective dose of SP (1.25 nmol, 0.2  $\mu$ l).

The data obtained show that the anxiolytic action of the polyamines microinjected into DPAG is due to its action at the polyamine site of the NMDAR. They data obtained also show an interference on the anxiolytic action of polyamines applied to DPAG with compounds that bind at the glycine sites of the NMDAR channel complex.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMS, V.C.; HILTON, S.M.; ZBROZYNA, A.W. Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defense reaction. *Journal of Physiology*, **154**:491-513, 1960.
- ADAMS, D.B. Brain mechanisms for offense, defense and submission. *Behav. Brain.Sci*, **2**:201-241, 1979.
- AMANO, K.; TANIKAWA, T.; ISEKI, H.; KAWABATAKE, H.; NOTANI, M.; KAWAMURA, H.; KITAMURA, K. Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum (rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief). *Appl. Neurophysiol.*, **41**:66-78, 1978.
- ANIS, N.A.; BERRTM, S.C.; BURTON, N.R.; LODGE, D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phenilcyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-D-aspartate. *Br. J. Pharmacol.*, **79**:565-575, 1983.
- ASCHER, P.; NOWAK, L. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons. *J. Physiol.*, **399**:247-66, 1988.
- AUDI, E.A.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Mediation by serotonin of the antiaversive effect of zimelidine and propranolol injected into the dorsal midbrain central grey. *Psychopharmacol*, **2**:26-32, 1988.



- BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behav. Brain Res.*, **15**:107-119, 1985.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory aminoacid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. *Brain Res.*, **439**:95-106, 1988.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In "*The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, anatomical and neurochemical organization*". A. Depaulis and R. Bandler, (Eds.); pp. 1-8. Plenum. New York, 1991a.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: Viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog. Brain Res.*, **87**:269-305, 1991b.
- BAXTER, B.L. Comparison of the behavioral effects of electrical and chemical stimulation applied to the same brain loci. *Federation. Proc.*, **26**:289 (Abstract 188), 1967.
- BAXTER, B.L. Elicitation of emotional behavior by electrical or chemical stimulation applied at the same loci in cat mesencephalon. *Experimental Neurology*, **21**:1-10, 1968.

- BEART, P.M.; NICOLOPOULOS, L.S.; WEST, D.C.; HEADLEY, P.M. An excitatory amino acid projection from ventromedial hypothalamus to periaqueductal gray in the rat: autoradiographic and electrophysiological evidence. *Neurosci. Lett.*, **85**:205-211, 1988.
- BEITZ, A.J. The nuclei of origin of brain stem enkephalin and substance P projections to the rodent nucleus raphe magnus. *Neuroscience.*, **7**:2753-2768, 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.
- BENVENISTE, M.; MAYER, M.L. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartate acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J. Physiol.*, **464**:131-63, 1993.
- BLANCHARD, D.C.; WILLIAMS, G.; LEE, E.M.C.; BLANCHARD, R.J. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiol. Psychol.*, **9**:157-163, 1981.
- BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain Res.*, **58**:155-166, 1993.

- BO, P.; GIORFETTI, A.; CAMANA, C.; SAVOLDI, F. EEG and behavioural effects of polyamines (spermine and spermidine) on rabbits. *Pharmacol. Res.*, **22**:481-491, 1990.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav. Brain Sci.*, **3**:291-301, 1980.
- BRANDÃO, M.L.; FONTES, J.C.S.; GRAEFF, F.G. Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **13**:1-4, 1980.
- BRANDÃO, M.L.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizer. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **16**:399-402, 1982.
- BRANDÃO, M.L.; VASQUEZ, E.C.; CABRAL, A.M.; SCHMITT, P. Clordiazepoxide and morphine reduce pressor to brain stimulation in awake rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **23**:1069-1071, 1985.
- CANNON, W.B. *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. Charles T. Bradford Boston., 1929.
- CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In: Brandão M.L. (Ed.). *Neuroscience and Behavior*. Vitória: UFES, pp. 21-29, 1987.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res.*, **58**:27-47, 1993.

- CHAPMAN, W.P.; SCHROEDER, H.R.; GEYER, G.; BRAZIER, M.A.B.; GANGER, C.; POPPEN, S.L.; SOLOMON, H.C.; IAKOVLEV, J. Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science*, **120**:949-950, 1954.
- CHIDA, N. ; SAITO, H. ; ABE, K. Spermine facilitates the generation of long-term potentiation of evoked potential in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Brain Res.*, **593**:57-62, 1992.
- CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.*, **1**:623-34, 1988.
- CHRISTIE, M.J.; JAMES, L.B.; BEART, P.M. An excitatory amino acid projection from rat prefrontal cortex to periaqueductal grey. *Brain Res. Bull.*, **16**:127-129, 1986.
- COLLINGRIDGE, G.L.; LESTER, R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, **40**:142-210, 1989.
- COTMAN, C.W. ; IVERSEN, L.L. Excitatory amino acids in the brain: focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, **10**:263-302, 1987.
- CRAWLEY, J.N.; EVERS, R.J.; PAUL, S.M. Polyamines inhibit N-methyl-D-aspartate antagonist-induced darting behavior in the rat prefrontal cortex. *Brain Research*, **586**:6-11, 1992.

- DANA, C., BENAVIDES, J.; SCHOEMAKER, H.; SCATTON, B. Pharmacological characterisation and autoradiographic distribution of polyamine-sensitive [<sup>3</sup>H]ifenprodil binding sites in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, **125**:45-57, 1991.
- DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents, *TIPS*, **16**:33-36, 1995.
- DONEVAN, S.D.; JONES, S.M. ; ROGAWSKI, M.A. Arcaine blocks N-methyl-D-aspartate receptor responses by an open channel mechanism: whole-cell and single-channell recording studies in cultured hippocampal neurons. *Molec. Pharmac.*, **41**:727-735, 1992.
- DUNN, A.J.; KRAMERCY, N.R. Neurochemical responses in stress. Relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and the catecholamine systems. Em: L.L. Iverson, D.S. Iverson and S.H. Snyder (Eds.), *Handbook of Psychopharmacology*, 8, pp. 455-515, 1984.
- DURAND, G.M.; GREGOR, P.; ZHENG, X.; BENNETT, M.L.V.; UHL, G.R. The cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:9359-9363, 1992.
- DURAND, G.M.; BENNETT, M.L.V. ; ZUKIN, R.S. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by

- polyamines and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6731-6735, 1993.
- EBERHART, J.A.; MORREL, J.I.; KRIEGER, M.S.; PFAFF, D.W. An autoradiographic study of projections ascending from the midbrain central gray, and from the region lateral to it, in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **241**:285-310, 1985.
- ENOMOTO, R.; OGITA, K., HAN, D. ; YONEDA, Y. Differential modulation by divalent cations of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding in brain synaptic membranes. *J. Neurochem.*, **59**:473-81, 1992.
- FAGE, D.; VOLTZ, C.; SCATTON, B. ; CARTER, C. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation *in vivo*. *J. Neurochem.*, **58**:2170-75, 1992.
- FALTER, U.; GOWER, A.J.; GOBERT, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influence. *Behav. Pharmacol.*, **3**:123-128, 1992.
- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: A. Depaulis and R. Bandler (Ed.). *The Midbrain periaqueductal gray matter - functional, anatomical and neurochemical organization*. Plenum Press, New York, pp. 151-173, 1991.
- FERCHMIN, P.A.; ETEROVIC, V.A. Putrescine decreases exploration of a black and white maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **37**:445-449, 1990.

- FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, **160**:200-213, 1962.
- FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. Wiley, Chichester, pp. 25-44, 1992.
- FOSTER, A.C. ; FAGG, G.E. Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristic and relationship to synaptic receptors. *Brain Res. Rev.*, **7**:103-164, 1984.
- GANONG, W.F. *The autonomic nervous system*. Em: Ganong, W.F. (Ed.), Review of Medical Physiology, 15a ed., Lange, New York, pp. 207-214, 1991.
- GIBB, A.J. ; COLQUHOUN, D. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus. *J. Physiol.*, **456**:143-79, 1992.
- GILAD, G.M. ; GILAD, V.H. Polyamine uptake, binding and release in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **193**: 41-46, 1991.
- GOODCHILD, A.K.; DANPNEY, R.A.L.; BANDLER, R.A. Method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies but not axons of passage within localized regions of the central nervous system. *J. Neurosci. Methods.*, **6**:351-363, 1982.

- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz. J. Med Biol. Res.*, **14**:239-265, 1981.
- GRAEFF, F.G. *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. São Paulo. Edusp, 1984.
- GRAEFF, F.G. *Brain defense systems and anxiety*. Em: Cavalheiro, E.A.; Lehman, J.; Turski, L. (eds.). *Frontiers em Excitatory Aminoacids Ressearch*. Liss, New York, pp. 325-332, 1988.
- GRAEFF, F.G. *Brain defense systems and anxiety*. Em: M. Roth; G.D. Burrows e ReNoyes. (eds.). *Handbook of Anxiety*, vol.3, Amsterdam Elsevier Science Publisher, pp. 307-354, 1990.
- GRAEFF, F.G. *Ansiedade*. In: F.G. Graeff e M.L. Brandão (eds.). *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo. Ed. Lemos. pp. 109-144, 1993a.
- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev. Neurosci.*, **4**:181-211, 1993b.
- GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **27**:811-829, 1994.
- GRAEFF, F.C.; RAWLINS, J.N.P. Dorsal periaqueductal gray punishment, septal lesions and the mode of action of minor tranquilizers. *Pharmac. Biochem. Behav.*, **12**:41-45, 1980.



- GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the periaqueductal gray. *Psychopharmacol.*, **103**:91-94, 1991.
- HANDLEY, S.L. Serotonin in animal models of anxiety: The importance of stimulus and response. In: *Serotonin, sleep and mental disorder* (eds. C. Idzikowski and P.J. Cowen). Wrightson Biomedical, Petersfield, pp. 98-115, 1991.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alfa-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **327**:1-5, 1984.
- HANDLEY, S.L. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. *CNS Drugs*, **2**:397-414, 1994.
- HARMAN, R.J.; SHAW, G.G. The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **73**:165-74, 1981.
- HELMSTETTER, F.J.; LEATON, R.N.; FANSELOW, M.S.; CALCAGNETTI, D.J. The amygdala is involved in the expression of conditional analgesia. *Soc. Neurosci. Abst.*, **14**:1227, 1988.
- HELMSTETTER, F.J.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrexone applied to the periaqueductal gray. *Brain. Res.*, **537**:88-92, 1991.

- HENRY, P.J. Biological bases of the stress response. *Nips*, **8**:69-73, 1993.
- HERRERO, M.T.; INSAUSTI, R.; GONZALO, L.M. Cortically projecting cells in the periaqueductal gray matter of the rat: A retrograde fluorescent tracer study. *Brain Res.*, **543**:201-212, 1991.
- HILTON, S.M.; ZBROZYNA, A.W. Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brain stem. *J. Physiol. (Lond.)*, **165**:160-173, 1963.
- HIRCH, S.R.; RICHARDSON-ANDREWS, R.; COSTALL, B.; KELLY, M.E.; DE BELLEROCHE, J.; NAYLOR, R.J. The effects of some polyamines on putative behavioral indices of mesolimbic vs. striatal dopaminergic function. *Psychopharmacology*, **93**:101-104, 1987.
- HITHCOCH, J.; DAVIS, M. Lesions of amigdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.*, **100**:11-12, 1986.
- HOFER, M.A. Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobility in wind rodents. *Psychosom. Med.*, **32**:633-647, 1980.
- HOLSTEGE, G.; COWIE, R.J. Nucleus prepositus hypoglossi projects to the dorsolateral PAG: A link between visuomotor and limbic systems. *Soc. Neurosci. Abst.*, **16**:3033-3037, 1990.

- HONEY, C.R.; MILJKOVIC, Z.; MACDONALD, J.F. Ketamine and phencyclidine cause a voltage-dependent block of responses to L-aspartate acid. *Neurosci. Lett.*, **61**:135-139, 1985.
- HOOD, W.F.; CAMPTON, R.P.; MONHAN, J.B. N-methyl-D-aspartate recognition site ligands modulate activity at the coupled glycine recognition site. *J. Neurochem.*, **54**:1040-1045, 1990.
- HUNSPERGER, R.W. Affektreaktionen auf elektrische Reizung in Hirnstamm der Katze. *Helv. Physiol. Acta*, **14**:70-92, 1956.
- IVERSEN, L.L. MK-801 (dizocilpine maleate)-NMDA receptor antagonist. *Res. Biochem. Intern.*, **10**:2-4, 1994.
- JACQUET, Y.F.; LAJTHA, A. Paradoxical effects after microinjection of morphine in the periaqueductal grey matter. *Science.*, **185**:1055-1057, 1974.
- JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.*, **325**:529-531, 1987.
- JORDAN, D. *Autonomic changes in affective behavior*. Em: A.D. Loewy e K. Michael Spyer (eds.). Central Regulation of Autonomic Functions. Oxford University Press. 19; pp. 349-366, 1990.
- KANFMAN, G.D.; ANDERSON, J.H.; BEITZ, A.J. Fos-defined activity in brainstem following centripetal acceleration. *J. Neurosci.*, **12**:4489-4500, 1992.

- KLECKNER, N.W.; DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Science*, **241**:835-837, 1988.
- KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G. Defensive behaviour and hypertension by glutamate in the midbrain central gray of rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **18**:61-67, 1985.
- LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.*, **8**:2517-2529, 1988.
- LEGENDRE, P.; WESTBROOK, G.L. Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol. Pharmacol.*, **40**:289-295, 1992.
- LEHMANN, J.; COLPAERT, F.; CANTON, H. Glutamate and glycine co-activate while polyamines merely modulate the NMDA receptor complex. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiat.*, **15**:183-190, 1991.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. Ed. Sarvier. 1994.
- LISTER, R. G. Ethologically-based, animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.*, **46**:321-340, 1990.
- LOEWY, A.D.; NEIL, J.J. The role of descending monoaminergic systems in central control of blood pressure. *Fed. Proc.*, **40**:2778-2785, 1981.
- LYNCH, D.R.; ANEGAWA, N.J.; VERDOORN, T.A.; PRITCHETT, D.B. N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of

- glutamate antagonist, glycine antagonist and channel-blocking agents. *Mol. Pharmacol.*, **45**:540-545, 1994.
- MACIVER, C.R.; BEDNAR, D.L.; KARBON, W. Opposite effects of spermine and arcaine on responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Neurosci. Lett.*, **132**:146-50, 1991.
- MACLEAN, P.D.; FLANIGAN, S.; FLYNN, P.; KIM, C.; STEVENS, J.R. Hippocampal function: tentative correlation of conditioning EEG, drug and radioautographic studies. *Yale J. Biol. & Med.*, **28**:380-395, 1957.
- MAIONE, S.; BERRINO, L.; PIZZIRUSSO, A.; LEYVA, J.; STELLA, L.; ROSSI, F. Evidence that arcaine increases the N-methyl-D-aspartate-induced cardiovascular effects into the periaqueductal gray area of anesthetized rats. *Neurosci Lett.*, **165**:164-166, 1994a.
- MAIONE, S.; BERRINO, L.; PIZZIRUSSO, A.; LEYVA, J.; FILIPELLI, A.; VITAGLIANO, S.; ROSSI, F. Effects of the polyamine spermine on NMDA-induced arterial hypertension in freely moving rats. *Neuropharmacology.*, **33**:789-793, 1994b.
- MARAVIZÓN, J.C.; BAUDRY, M. Allosteric interaction and modulator requirement for NMDA receptor function. *Eur. J. Pharmacol.*, **269**:165-175, 1994.

- MATHEUS, M.G.; NOGUEIRA, R.L.; CAROBREZ, A.P., GRAEFF, F.G.; GIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacol.*, **113**:565-569, 1994.
- MAYER, D.J.; MACDERMOTT, A.B.; WESTBROOK, G.L.; SMITH, S.J.; BARKER, J.L. Agonist and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp measured using arsenazo-III. *J. Neurosci.*, **7**:3230-3240, 1987.
- MCGURK, J.F.; BENNETT, M.L.V.; ZUKIN, R.S. Polyamines potentiate the responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:9971-74, 1990.
- MEINERS, B.A.; PULLAN, L.M.; KEITH, R.A.; BRITT, M.; KLIČKA, A.B., MANGANO, T.J.; STUMPO, R.J.; LAMA, A.I. Glycine antagonists characterized at the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Soc. Neurosci. Abstr.* **87**:14, 1989.
- MELLER, S.T.; DENNIS, B.J. Afferent projections of the periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience*, **19**:927-964, 1986.
- MONAGHAN, D.T.; OLVERMAN, N.J.; NGUYEN, J.C.; WATKINS, J.C.; COTAMAN, C.W. Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**:9836, 1988.

- MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.; COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and disitinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **29**:345-342, 1989.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **48**:254-260, 1955.
- MORGAN, M.M.; LIEBESKIND, J.C. Site specificity in the development of tolerance to stimulation-produced analgesia from the periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res.*, **425**:356-359, 1987.
- NASHOLD, Jr. B.S.; WINSON, W.P.; SLAUGHTER, G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, **30**:14-24, 1969.
- NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. 5-HT mediation of the antiaversive effect of isamoltane injected into the dorsal periaqueductal grey. *Behavioral Pharmacology.*, **2**:73-77, 1991.
- NUTT, D.J.; GLUE, P. Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: A psychopharmacological perspective. *Pharmacol Ther*, **44**:309-334, 1989.
- OLIVERAS, J.L.; BESSON, J.M. Stimulation-produced analgesia in animals: behavioural investigations. *Prog. Brain. Res.*, **77**:141-157, 1988.
- OTTERSEN, OP.; STORM-MATHISEN, J.; MADSEN, S.; SKUMLIEN, S.; STRONHARUG, J. Evaluation of the immunocytochemical method for amino acids. *Med. Biol.*, **64**:147-158, 1984.

- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behav. Brain. Sci.*, **5**:407-467, 1980.
- PATNEAU, D.K.; MAYER, M.L. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J. Neurosci.*, **10**:2385-99, 1990.
- PAXINO, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Second Edition. Academic Press, London, 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. Methods.*, **14**:149-167, 1985.
- RANSON, R.W. Polyamine and ifenprodil interactions with the NMDA receptor's glycine site. *Eur. J. Pharmacol.*, **208**:67-72, 1991.
- RANSON, R.W.; STEC, N.L. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor - ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. *J. Neurochem.*, **51**:830-836, 1988.
- REYNOLDS, I.J. Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **177**:215-216, 1990
- REYNOLDS, I.J. [3H]CGP 39653 binding to the agonist site of the N-methyl-D-aspartate receptor is modulated by Mg<sup>2+</sup> and polyamines independently of the arcaine-sensitive polyamine site. *J. Neurochem.*, **62**:54-62, 1994.



- ROCK, D.M.; MACDONALD, R.L. The polyamine spermine has multiple actions on N-methyl-D-aspartate receptor single-channel currents in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, **41**:83-88, 1992.
- ROCK, D.M.; MACDONALD, R.L. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**:463-82, 1995.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. *The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology*. In: Cooper SJ, Hendrie, CA (eds) *Ethology and psychopharmacology*. Wiley, Chichester, pp 9-44, 1994.
- ROMANO, C.; WILLIAMS, K.; DePRIEST, S.; SESHADRI, R.; MARSHALL, G.R. Effects of mono-, di-, and triamines on the N-methyl-D-aspartate receptor complex: a model of the polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.*, **41**:785-92, 1992.
- SACAAN, A.I.; JOHNSON, K.M. Spermine enhances binding to the glycine site associated with the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol. Pharmacol.*, **36**:836-839, 1990.
- SATHER, W.; JOHNSON, J.W., HENDERSON, G.; ASCHER, P. Glycine-insensitive desensitization of NMDA responses in cultured mouse embryonic neurons. *Neuron*. **4**:725-729, 1990.

- SCHENBERG, L.C.; GRAEFF, F.G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmac. Biochem. Behav.*, **9**:287-295, 1978.
- SCHMITT, P.; ABOU-HAMED, H.; KARLI, P. Effects aversifs et appetitifs induits par stimulation mesencephalic et hypothalamic. *Brain. Res.*, **130**:521-530, 1977.
- SCHMITT, P.; DISCALA, G.; BRANDÃO, M.L.; KARLI, P. Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus on the mesencephalic central gray. *Eur. J. Pharmacol.*, **117**:149-153, 1985.
- SCHMITT, P.; PASCAL; CARRIVE, P.; DI SCALA, G.; JENCK, F.; BRANDÃO, M.; BAGRI, A.; MOREAU, J.L.; SANDNER, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behavioural Brain Research.*, **22**:181-190, 1986.
- 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. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **23**:677-679, 1990.
- SCHMITT, M.L.; COELHO, W.; LOPES-DE-SOUZA, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; 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.

- SCHOEMAKER, H.; PIGASSE, S.; ZIVKOVIC, B. The NMDA antagonist [3H]ifenprodil binds to heterogenous polyamine-sensitive sites in rat brain. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **18**:1154-1163, 1992.
- SCHWARTZ, J.H.; KANDEL, E.R. *Synaptic transmission mediated by second messengers*. Em: E.R. Kandel; J.H. Schwartz; T.M. Jessell (eds.), Principles of Neural Science. **12**:173-193, 1991.
- SEILER, N.; SCHMIDT-GLENEWINKEL, T. Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. *J. Neurochem.*, **24**:791-795, 1975.
- SEILER, N. Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem. Int.*, **3**:95-110, 1981.
- SEILER, N. Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Prog. Drug Res.*, **37**: 107-60, 1991.
- SHAW, G.G. The polyamines in the central nervous system. *Biochem. Pharmacol.*, **28**:1-6, 1979.
- SHAW, G.G.; PATEMAN, A.J. The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. *J. Neurochem.*, **20**:1225-1230, 1984.

- SHIMADA, A.; SPANGLER, E.L.; LONDON, E.D.; IGRAM, D.K. Spermidine potentiates dizocilpine induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *Eur. J. Pharmacol.*, **263**:293-300, 1994.
- SHIMIZU, H.; KAKIMOTO, Y.; SANO, I. The determination and distribution of polyamines in mammalian nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **143**:199-20, 1964.
- SHIPLEY, M.T.; ENNIS, M.; RIZVI, T.A.; BEHBEHANI, M.M. *Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray*: In "The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, anatomical and neurochemical organization". A. Depaulis and R. Bandler, Eds.), pp. 417-448. Plenum, New York, 1991.
- SILVEIRA, M.C.; GRAEFF, F.G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid in the medial hypothalamus of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **21**:569-571, 1988.
- SLADDECZEK, F.; PIN, J.P.; RECASENS, M.; BOCKAERT, J.; WEISS, S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, **317**:717-719, 1988.
- STEELE, J.E.; BOWEN, D.M.; FRANIS, P.T.; GREEN, A.R.; CROSS, A.J. Spermine enhancement of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex in human cortical membrane. *Eur. J. Pharmacol.*, **189**:195-200, 1990.

- STERNBERG, E.M.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; GOLD, P.W. The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann. Intern. Med.*, **117**:854-866, 1992.
- SUBRAMANIAM, S.; MCGONIGLE, P. Quantitative autoradiographic characterization of the binding of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzola[a,b]cyclohepten-5,10-imine ( $[^3\text{H}]$ MK-801) in rat brain: regional effects of polyamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**:811-19, 1991.
- SUBRAMANIAM, S.; MCGONIGLE, P. Regional heterogeneity of polyamine effects on the N-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. *J. Neurochem.*, **60**:2276-2284, 1993.
- SWANSON, L.W. *Brain maps: structure of the rat brain*. Elsevier, The Netherlands, 1992.
- THOMSON, A. Glycine modulation of the NMDA receptor/channel complex. *Trends Neurosci.*, **12**:349-353, 1989.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **44**:463-469, 1993.
- VEENING, J.; BUMA, P.; TER HORST, G.J.; ROELING, T.A.P.; LUITEN, P.G.M.; NIEUWENHUYS, R. *Hypothalamic projections to the PAG in the rat: Topographical, immunoelectromicroscopical and functional aspects*. In "The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, anatomical and neurochemical

- organization". A. Depaulis and R. Bandler, Eds.), pp. 387-415. Plenum, New York, 1991.
- VOLTZ, C.; FAGE, D.; CARTER, C. Synergism between the NMDA receptor antagonistic effects of ifenprodil and the glycine antagonist, 7-chlorokynurenate, *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.*, **255**:197-202, 1994.
- VOROBEV, V.S.; SHARONOVA, I.N.; WALSH, I.B.; HAAS, H.L. Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron.*, **11**:837-44, 1993.
- WATKINS, J.C.; EVANS, R.H. Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**:165-204, 1981.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharmacol Sci.*, **11**:25-33, 1990.
- WENGER, G.R. Effects of phencyclidine and ketamine on food maintained behavior in the pigeon. *Pharmacologist.*, **16**:263-268, 1974.
- WILLIAMS, K.; ROMANO, C.; MOLINOFF, P.B. Effects of polyamines on the binding of [<sup>3</sup>H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.*, **36**:575-583, 1989.

- WILLIAMS, K.; ROMANO, C.; DICHTER, M.A.; MOLINOFF, P.B. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sciences.*, **48**:469-98, 1991.
- WILLIAMS, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.*, **44**:851-858, 1993.
- WILLIAMS, K.; ZAPPIA, A.M.; PRITCHETT, D.B., SHEN, Y.M.; MOLINOFF, P.B. Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol. Pharmacol.*, **45**:803-809, 1994.
- WONG, E.H.; KENP, J.A.; PRIESTLEY, T.; KNIGHT, A.R.; WOODRUFF, G.; IVERSEN, L.L. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**:7104-7108, 1986.
- YONEDA, Y.; OGITA, K.; ENOMOTO, R.. Characterization of spermidine-dependent [<sup>3</sup>H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,b]cyclohepten-5,10-imine (MK-801) binding in brain synaptic membranes treated with triton X-100. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**:1161-1172, 1991.
- ZHONG, J.; RUSSELL, S.L.; PRITCHETT, D.B.; MOLINOFF, P.B.; WILLIAMS, K. Expression of mRNAs encoding subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, **45**:846-853, 1994.