

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITOS COMPORTAMENTAIS PRODUZIDOS PELA MICROINJEÇÃO DE
COMPOSTOS GLICINÉRGICOS AO LONGO DO EIXO ROSTROCAUDAL DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Farmacologia
do Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial
à obtenção do título de mestre
em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de
Padua Carobrez

Karina Valerim Teixeira

Florianópolis, SC

1997

TEIXEIRA, Karina Valerim. Efeitos Comportamentais Produzidos Pela Microinjeção De Compostos Glicinérgicos Ao Longo Do Eixo Rostrocaudal Da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal De Ratos. Florianópolis, 1997. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

**Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Defesa: 05.09.97**

A performance de ratos submetidos ao [labirinto em cruz elevado] após a microinjeção de [glicina] e do (\pm)-3-amino-l-hidroxi-2-pirrolidona (HA966) ao longo do eixo rostrocaudal da [Substância cinzenta Periaquedutal Dorsal] foi avaliada. Alterações seletivas na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos foram tidos com índices de ansiedade. A microinjeção de glicina desencadeou efeito ansiogênico dependente da dose e do sítio de microinjeção, enquanto que a microinjeção de [HA 966] produziu efeito ansiolítico nas doses utilizadas, independente do sítio de microinjeção. Os resultados reforçam a participação do receptor NMDA da SCPd nos [estados ansiosos] e sugerem que a saturação do [sítio de glicina acoplado ao receptor NMDA] pode variar ao longo do eixo rostrocaudal desta estrutura neural.

**“EFEITOS COMPORTAMENTAIS PRODUZIDOS PELA
MICROINJEÇÃO DE COMPOSTOS GLICINÉRGICOS AO LONGO
DO EIXO ROSTRO-CAUDAL DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS”**

POR

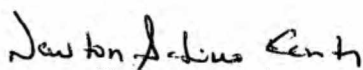
KARINA VALERIM TEIXEIRA

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

Banca Examinadora:



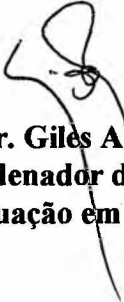
Antonio de Pádua Carobrez (FMC/UFSC-Membro-Titular)



Newton S. Canteras (ICB/USP)-Membro-Titular)



Cláudio Antônio Barbosa Toledo (CFS/UFSC)-Membro Titular)



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

Florianópolis, setembro de 1997.

"Nada temos a temer;

exceto, nosso próprio medo"

Roosevelt

A Deus,
pois sem Ele nada seria possível

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela valiosa orientação e pelo companheirismo nestes anos de convívio.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pela compreensão e contribuição à minha formação científica.

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria Especial de Farmacologia.

Ao prof^o Dr. Claudio A. B. Toledo e funcionários do laboratório de fisiologia do Centro de Ciências da Saúde da UFSC pelo auxílio em uma das etapas experimentais desse estudo.

Aos colegas do curso, em especial à Anna Paula, Patrícia, Rodrigo, Sandro e Solange, pela colaboração e amizade.

Minha gratidão eterna à minha família, em especial aos meus pais e ao Otto, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, ajudaram.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Substância Cinzenta periaquedutal (SCP)	02
1.1.A. Conexões da SCP	07
1.1.B. Aferentes e Eferentes da SCP dorsal (SCPd)	10
1.2. Aspectos Funcionais da SCP e Comportamento Defensivo..	11
1.3. Comportamento Defensivo e Ansiedade	16
1.4. Participação dos Aminoácidos Excitatórios no Comportamento Defensivo	19
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais	29
3.2. Cirurgia Estereotáxica	29
3.3. Cânulas	31
3.4. Microinjeção Intracerebral	31
3.5. Teste Comportamental	32
3.6. Dispositivo de Registro Comportamental	33
3.7. Protocolo Experimental	35
3.8. Histologia	36
3.9. Análise Estatística	36
3.10. Drogas e Soluções	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Experimento I.	39
4.2. Experimento II	48
5. DISCUSSÃO	57

6. CONCLUSÃO	69
7. RESUMO	70
8. ABSTRACT	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização dos sítios das microinjeções das drogas na SCPd, neste estudo	38
Figura 2 - Efeito do agonista glicinérgico (GLY) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos observados na arena de madeira (FL, FAL).....	43
Figura 3 - Efeito do agonista glicinérgico (GLY) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FEA, TPA).....	44
Figura 4 - Efeito do agonista glicinérgico (GLY) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FT, FEF).....	45
Figura 5 - Efeito do agonista glicinérgico (GLY) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FE, TPC).....	46
Figura 6 - Efeito do agonista glicinérgico (GLY) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FLT, FAT).....	47

Figura 7 - Efeito do antagonista glicinérgico (HA) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos observados na arena de madeira (FL, FAL).....	52
Figura 8 - Efeito do antagonista glicinérgico (HA) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FEA, TPA).....	53
Figura 9 - Efeito do antagonista glicinérgico (HA) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FT, FEF).....	54
Figura 10 - Efeito do antagonista glicinérgico (HA) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FE, TPC).....	55
Figura 11 - Efeito do antagonista glicinérgico (HA) microinjetado nas porções rostral, intermediária e caudal de ratos submetidos ao LCE (FLT, FAT).....	56

1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos são caracterizados primordialmente pela sua insaciável ânsia de saber. Desde os tempos antigos, os homens contemplavam o universo e tentavam descobrir seus mistérios. De igual valor, porém mais recente, é a tentativa de entender o 'universo' contido em nosso interior _ o Sistema Nervoso, que é responsável por tudo que somos e por tudo que podemos vir a ser (Carlson, 1991).

O estudo do Sistema Nervoso e do comportamento humano datam de longo tempo e possuem raízes profundas em diversas áreas, como fisiologia, biologia e psicologia (Carlson, 1991). Porém, foi somente a partir da década de 30 que, com o advento da técnica de estereotaxia associada a metodologia de estimulação elétrica, foi possível o estudo mais detalhado de algumas estruturas cerebrais, dentre elas a substância cinzenta periaquedutal (Carobrez, 1987).

Na década de 40 (Hess e Brugger, 1943), demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo perifornical, era capaz de produzir um comportamento complexo, caracterizado por uma postura imóvel com o dorso levemente arqueado, exposição dos dentes e garras, retração auricular, silvar, rosar, piloereção e

acentuada midríase, denominado reação afetiva de defesa ("affektiven Abwehrreaktion").

Posteriormente verificou-se que as respostas comportamentais observadas por Hess e Brugger (1943) em gato, poderiam ser obtidas a partir de estimulação elétrica de uma área que se estendia desde a matéria cinzenta da área pré-óptica até a substância cinzenta periaquedutal (Hunsperger, 1956; Fernandez-de-Molina e Hunsperger, 1959, 1962).

1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)

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

A partir da década de 70, a citoarquitetura da SCP passou a ser alvo de bastante atenção, e estudos anatômicos passaram a sugerir que esta estrutura poderia ser subdividida em regiões distintas. Hamilton (1973), baseando-se em métodos de coloração de Nissl, em gatos, subdividiu a SCP em três subnúcleos, cada um com uma citoarquitetura e conectividade distinta. Os subnúcleos

foram denominados: dorsal, medial e lateral. O núcleo dorsal foi descrito como sendo composto de células pequenas, fortemente coradas, de forma fusiforme a esférica, com projeções apenas para a região pré-tectal e habênula lateral. O núcleo medial era composto de células pequenas contendo microtúbulos que se coravam fortemente com o violeta de cresila. Essas células pareciam se projetar apenas para os campos de Forel e área tegmental ventral. O núcleo lateral, foi descrito como contendo neurônios esféricos e triangulares que se coloriam fracamente com a técnica de Nissl e, se projetavam para os núcleos paraventricular e parafascicular do tálamo e para o hipotálamo posterior.

Na década de 80, Mantyh (1982; 1982*) alegou que a subdivisão prévia realizada na SCP estava incorreta, sendo dois os principais argumentos utilizados por ele para apoiar tal declaração. Primeiramente, a divisão em subnúcleos realizada por Hamilton (1973) foi baseada apenas na coloração de Nissl, enquanto que Mantyh (1982; 1982*) utilizou não somente esta coloração, como também as técnicas de Weil, Golgi e Peroxidase da raiz forte (HRP), o que mostrou que as subdivisões descritas previamente (Hamilton, 1973) não eram compostas por populações neuronais únicas e que possuíam muitas conexões em comum. O outro argumento foi o fato de Hamilton (1973) ter utilizado somente gatos em seus

experimentos, enquanto que Mantyh (1982; 1982*) utilizou três espécies, ratos, gatos e macacos.

Enfim, o estudo de Mantyh (1982; 1982*) sugere a existência de populações neuronais heterogêneas distribuídas por todas as regiões da SCP, sendo 5 os principais tipos de células: neurônios fusiformes, neurônios multipolares, células estreladas, células piramidais e células ependimárias presentes ao redor do aqueduto. O autor relatou ainda que, enquanto qualquer destes tipos de células podem ser encontrados por todas as regiões da SCP, o tamanho do corpo celular aumenta gradativamente de acordo com a distância do aqueduto. Sendo este gradiente centro-periferia, também aparente no que diz respeito ao diâmetro dos processos dendríticos e ao grau de mielinização (Mantyh, 1982; 1982*).

Apesar da idéia de heterogeneidade permanecer, uma nova subdivisão da SCP foi proposta somente alguns anos depois. Em 1985, Beitz por intermédio de análise quantitativa ("cluster analysis"), em ratos, subdividiu morfológicamente a SCP em quatro regiões: dorsal, dorsolateral, ventrolateral e medial. A região medial parecia conter neurônios pequenos e apresentar baixa densidade; a dorsolateral e ventrolateral pareciam conter os maiores neurônios enquanto, a região dorsal apresentou a maior densidade neuronal. Em adição, foram obtidos dados qualitativos e quantitativos quanto ao tamanho,

forma e densidade neuronal, sendo que esta última parece decrescer ao longo do eixo rostro-caudal.

Esta subdivisão (Beitz, 1985) foi compatível com uma outra divisão realizada posteriormente, baseada em estudos histoquímicos (Conti et al., 1988). Porém, apesar de haver uma certa concordância quanto a citoarquitetura da SCP, a distribuição topográfica das diversas funções nesta estrutura ainda era, na época, um tópico cheio de controvérsias (Ricardo, 1987).

Muitas das reações tidas como mediadas pela SCP foram primeiramente desencadeadas por estimulação elétrica (Bovier et al., 1982; Mos et al., 1982; Nashold et al., 1969; Pfaff et al., 1973; Skultety, 1963). Conseqüentemente, pode-se dizer que a estimulação elétrica teve um papel importante no estudo da resposta defensiva mediada pela SCP (Hunsperger, 1956). Porém, esta técnica apresentava um grande inconveniente, que era o fato da corrente elétrica excitar tanto corpos neuronais, como também axônios de passagem, o que dificultava a localização exata dos neurônios envolvidos na mediação dos possíveis comportamentos defensivos (Ranck, 1975).

Goodchild e colaboradores (1982) sugeriram que o uso de estimulação química por aminoácidos excitatórios (AAE) poderia evitar este problema, pois esta estimulação excita seletivamente corpos celulares e seus processos

dendríticos, mas não fibras de passagens. Em adição, desde que existem mecanismos de recaptção de alta-afinidade para o glutamato e o aspartato, a difusão resultante da microinjeção desses compostos no tecido neural, parece ser limitada (Bandler et al., 1985).

Ainda assim, é interessante salientar que em estudos funcionais é impossível ser exato sobre a extensão da área estimulada (Bandler et al., 1985). Também em estudos morfológicos é usualmente difícil delimitar com exatidão as áreas efetivas de recaptção nos sítios de injeção dos traçadores neuroanatômicos e identificar adequadamente todas as conexões marcadas por eles. Assim, quando uma conexão é mencionada como envolvida numa determinada função, deve ser entendido que esta pode ser uma das muitas conexões de uma rede. É preciso estar claro que quando um traçador é injetado no mesmo ponto onde um determinado comportamento foi evocado por estimulação elétrica ou química, ainda que no mesmo animal, não necessariamente ele consegue marcar todas as conexões envolvidas neste comportamento (Ricardo, 1987).

Iniciaram-se então, ainda nesta década de 80, tentativas de realizar uma divisão funcional da SCP. Enquanto autores, como Beitz e Shepard (1985), sugeriram que respostas agonísticas, como o comportamento defensivo, eram basicamente mediadas a partir da divisão dorsolateral da SCP; outros autores, como Bandler e

colaboradores (1985), declaravam que tais respostas, quando evocadas por AAE, não mostravam nenhum agrupamento claro de sítios efetivos ao longo da dimensão mediolateral ou dorsoventral. A diferença comportamental, segundo Bandler e colaboradores (1985), emergia somente quando a dimensão rostrocaudal era levada em consideração.

No início da década de 90, a melhor maneira de subdividir a SCP era ainda um problema não resolvido. Em 1991, Bandler e Colaboradores sugeriram que a SCP poderia ser subdividida em colunas neuronais longitudinais que se estendem por distâncias variáveis ao longo do eixo rostrocaudal da SCP. Segundo estes autores pode-se encontrar 4 colunas longitudinais distintas distribuídas de maneira radial na SCP: lateral, ventrolateral, dorsomedial e dorsolateral. Estas regiões parecem possuir algumas características distintas entre si, principalmente no que diz respeito a imunorreatividade celular, densidade de receptores, conexões aferentes e eferentes e função (Bandler et al., 1991).

1.1.A. Conexões da SCP

Apesar do considerável avanço feito no entendimento da anatomia, fisiologia e bioquímica da SCP, o conhecimento da sua estrutura e suas conexões ainda é

bastante escasso. Muitas razões podem justificar a pouca informação disponível. Uma destas razões era o fato de que, primeiramente eram empregadas técnicas de degeneração com prata, pouco adequadas para corar axônios de diâmetro pequeno, que parecem ser o principal constituinte das conexões da SCP. Em adição, a quantidade de axônios de passagem e conexões intrínsecas tornam a SCP uma estrutura bastante complexa (Mantyh, 1982; 1982*).

Com o advento de técnicas mais sensíveis, como a injeção de HRP, deu-se um grande passo no entendimento da complexidade da SCP (Marchad e Hagino, 1983).

No início da década de 80, alguns estudos utilizaram a técnica modificada da HRP (Mesulam, 1978) na determinação das conexões aferentes da SCP. Beitz (1982) relatou que a SCP recebe um grande número de projeções: a) Aferentes telencefálicos, advindos do córtex pré-frontal, do giro do cíngulo, núcleo do leito da estria terminal e núcleo central da amígdala; b) Aferentes diencefálicos, advindos da área pré-óptica, zona incerta, núcleo geniculado, núcleo da habênula lateral, núcleo pré-tectal e principalmente de diversas áreas hipotalâmicas; c) Aferentes mesencefálicos, do colículo superior, núcleo cuneiforme, substância negra, colículo inferior, *locus coeruleus*, núcleo parabraqueal, área

tegmental e da própria SCP; e d) Aferentes da ponte, do bulbo, do cerebelo e da medula espinhal (Beitz, 1982).

Em 1983, Marchand e Hagino, também fazendo uso da técnica HRP, determinaram algumas conexões aferentes para a SCP. Uma das áreas mais marcadas no estudo destes autores foi o núcleo pré-mamilar dorsal, área esta pertencente ao hipotálamo e também citada no trabalho de Beitz (1982). Outra área bastante marcada foi o tronco cerebral, principalmente na formação reticular (Marchand e Hagino, 1983).

Quanto às conexões eferentes, a SCP possui algumas projeções ascendentes para áreas talâmicas, hipotalâmicas e prosencefálicas basais, como o núcleo central da amígdala e área pré-óptica medial (Bandler e Shipley, 1994). Quanto as conexões eferentes descendentes, a SCP parece projetar seus neurônios principalmente para o tronco cerebral em especial para porções do bulbo (Bandler et al., 1991). Estudos utilizando transporte anterógrado com *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* (PHA-L) (Cameron et al., 1995) demonstraram que os neurônios da SCP se projetam para o tronco cerebral por duas rotas principais: a) Um pequeno feixe de fibras que distribuiu-se localmente para a própria SCP, para o *locus coeruleus* e para o núcleo de Barrington; e b) Um feixe maior que tem um arranjo difuso na formação reticular da ponte e uma distribuição limitada no bulbo onde ocupa uma posição

dorsolateral à pirâmide bulbar, que inerva estruturas da ponte e do tegmento bulbar (Cameron et al., 1995).

Como a SCP possui apenas uma pequena projeção direta para a medula espinhal (Basbaum e Fields, 1979), acredita-se que ela se comunique com a medula espinhal através de vias multissinápticas envolvendo o tronco cerebral, possivelmente os núcleo trigêmeo espinhal, núcleo magno da Rafe, núcleo gigantocelular *pars alpha* e núcleo paragigantocelular (Beitz et al., 1983).

Enfim, a SCP é uma região complexa que recebe inervação de vários níveis do SNC. Estas numerosas fontes de projeções aferentes permitem que a SCP seja influenciada por estruturas relacionadas ao sistema motor, sensorial, límbico e autônomo (Beitz, 1982). Muitas destas áreas que projetam aferentes para a região cinzenta central, também recebem conexões recíprocas desta área. Esta interconectividade diversa é o que provavelmente dá o suporte para as muitas funções atribuídas a SCP (Beitz e Shepard, 1985)

1.1.B. Aferentes e eferentes da SCP dorsal (SCPd)

A porção dorsal da SCP, subentendendo-se como tal, as colunas dorsomedial e dorsolateral descritas por Bandler e colaboradores (1991), parecem possuir um conjunto de aferentes e eferentes bastante especial. A SCPd parece receber grande número de aferentes do

hipotálamo. Dentre os núcleos hipotalâmicos, o núcleo ventromedial é o que fornece a maior projeção para esta porção da SCP (Beart et al., 1988; Beitz, 1982 e Krieger et al., 1979). Outros aferentes hipotalâmicos parecem originar-se do núcleo pré-mamilar dorsal (Beitz, 1982 e Canteras et al., 1997). Quanto aos aferentes do tronco cerebral, a porção dorsal parece receber inervação do núcleo trigeminal (Beitz, 1982), núcleo cuneiforme e camadas profundas do colículo superior (Dean e Redgrave, 1991; Holstege, 1991).

A SCPd parece projetar seus neurônios para o hipotálamo e estruturas prosencefálicas subcorticais (Bandler e Keay, 96) e para o tronco cerebral, em especial para outras partes da SCP, para o núcleo cuneiforme, região abducente (Dean e Redgrave, 1991) e algumas porções do bulbo (Holstege, 1991).

É interessante salientar que estudos com o traçador PHA-L sugerem que o padrão das projeções descendentes na porção rostral e caudal da SCPd parece ser praticamente igual (Cameron et al., 1995).

1.2. Aspectos Funcionais da SCP e Comportamento Defensivo

Nos últimos anos a SCP tem sido relacionada a cinco grandes funções que incluem: regulação autonômica, vocalização, emoções relacionadas a medo e ansiedade, lordose-reflexa característica do ato sexual e

processamento e modulação da dor (Behbehani, 1995). O que todas estas respostas têm em comum parece não estar ainda claro, exceto que, todas parecem apresentar implicações viscerais e emocionais classificadas genericamente como "límbicas" (Mantyh, 1982; 1982*).

No final da década de 60 o entendimento das funções da SCP passou a ser alvo de intensos estudos. Um dos desencadeadores deste evento foi o relato de Reynolds (1969) de que a estimulação da SCP produzia uma analgesia tão profunda que uma laparotomia poderia ser realizada sem o uso de anestésicos químicos.

Atualmente sabe-se um pouco mais sobre a participação da SCP na analgesia. A SCP é um sítio muito importante na transmissão ascendente da dor. Recebe aferentes de neurônios nociceptivos da medula espinhal e manda projeções para o núcleo talâmico que processa a nocicepção. A SCP é também o maior componente do sistema descendente inibitório da dor. Ativação deste sistema inibe neurônios nociceptivos no corno dorsal do cordão espinhal (Behbehani, 1995).

Outro estudo fundamental no entendimento da importância funcional da SCP, foi realizado por Nashold (1969). Este autor relatou que a estimulação de SCP em humanos produzia fortes reações emocionais, descritas como: sensações de medo e morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas tais como: piloereção, sudorese,

aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço. Isto corroborou estudos em diferentes espécies animais que, sistematicamente demonstraram que a estimulação de uma região mesencefálica que compreende a SCP é capaz de evocar reações defensivas bem coordenadas (Hunsperger, 1956; Skultety, 1963; Edwards e Flynn, 1972).

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

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

Enfim, estudos com gatos e ratos indicam que a SCP e o tegmento adjacente próximo ao colículo superior, contém elementos neurais que medeiam a expressão coordenada de reação de defesa, seja provocada por estimulação elétrica, ou naturalmente (Adams, 1979). Em adição, muitos estudos mostram que lesões que destroem a SCP (e também o tegmento adjacente) elimina ou atenua drasticamente reações desencadeadas por estímulo nociceptivo, tanto por confrontação de outro animal, como por estimulação do hipotálamo ou da amígdala, sugerindo assim, que a região central mesencefálica é uma 'via comum' para a reação de defesa, cuja integridade parece essencial para a coordenação da reatividade defensiva do animal (Bandler, 1988; Graeff et al., 1988).

Vários são os estudos que demonstram que as reações mediadas pela SCP não são obtidas igualmente por toda a extensão desta estrutura (Beitz e Shepard, 1983). As reações emocionais podem ser evocadas em regiões distintas da SCP. A reação de defesa é melhor visualizada em níveis mais caudais da SCP (Bandler et al., 1985). A estimulação química de sítios laterais, próximos ao aqueduto, evoca forte reação de defesa em gatos conscientes ou decerebrados (Carrive et al., 1988), ao passo que os estímulos químicos aplicados em sítios ventrolaterais induzem comportamento caracterizado por uma diminuição da atividade espontânea e completa

imobilidade (Zhang et al., 1990). Alterações autonômicas também podem ser observadas nestas regiões. A estimulação química da coluna lateral da SCP intermediária evoca aumento da atividade autonômica simpática e da atividade somatomotora associada a formas específicas de comportamento defensivo. Em contrapartida, este tipo de estimulação na coluna ventrolateral desencadeia efeitos opostos aos visualizados na coluna lateral (Bandler et al., 1991).

Em adição, estudos recentes relatam que durante uma situação nova ou ameaçadora, informações, advindas de neurônios espinais ascendentes ou de aferentes prosencefálicos, chegam na SCP. Tais informações são integradas e respostas adaptativas são iniciadas por descargas neuronais na coluna dorsolateral, isto é: resposta defensiva, alerta, excitação simpática e anti-nocicepção. Após um certo tempo, a fase excitatória da resposta dá lugar a uma fase inibitória. Esta parece ser causada por uma descarga de neurônios na coluna ventrolateral e envolve um período de inibição simpática, analgesia e imobilidade. Esta porção da SCP projeta ainda, neurônios para estruturas cerebrais cujas funções, são compatíveis com a fase de recuperação da resposta emocional de defesa (Behbehani, 1995; Cameron et al., 1995).

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

Enfim, a observação de que a estimulação da SCPd produz aversão em animais e medo/ansiedade em humanos foi um eficiente indicador de que esta região é um importante elo no circuito cerebral processador do medo e da ansiedade (Behbehani, 1995). Nos últimos anos vários estudos foram feitos sobre o assunto, e é inegável o valor que a resposta aversiva produzida por estimulação elétrica e química da SCPd (Bandler, 1988; Bandler e Depaulis, 1991; Bandler et al., 1985 e Graeff et al., 1988) teve no entendimento dos processos aversivos, possivelmente ansiedade e suas bases farmacológicas (Graeff et al., 93).

1.3. Comportamento Defensivo x Ansiedade

A ansiedade é um termo usado para descrever tanto um estado normal emocional associado a eventos estressantes,

como também uma condição patológica, geralmente crônica e associada a eventos não bem definidos (Sanger, 1991).

Muitos são os modelos animais que têm sido usados nos estudos da ansiedade, não somente como bioensaios na triagem de novos agentes terapêuticos, como também em simulações para facilitar o entendimento dos mecanismos fundamentais da ansiedade (Lister, 1990). Estes modelos precisam primeiramente satisfazer alguns critérios e posteriormente ser validados e aceitos na pesquisa de ansiedade (Rodgers e Cole, 1994).

De extrema importância nos estudos da ansiedade é a diversidade de tipos de desordens ansiosas, que podem ser clinicamente diferenciadas pela sintomatologia ou ainda pela resposta terapêutica (Rodgers e Cole, 1994). Dificultando ainda mais o panorama já existente, evidências sugerem que diferentes modelos animais podem induzir diferentes tipos de ansiedade e que nem sempre está claro o tipo da desordem ansiosa desencadeada pelo modelo (Lister, 1990).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um modelo animal que representa o paradigma da resposta não-condicionada a ambientes potencialmente ameaçadores. Este modelo deriva do trabalho de Montgomery (1955) sobre a relação entre o medo e a motivação exploratória nos ratos, e baseia-se na seguinte premissa: um ambiente novo pode gerar tanto curiosidade quanto medo, portanto pode criar um típico

conflito aproximação-esquiva. O LCE consiste de quatro braços, dois braços abertos opostos à dois braços fechados, elevados do chão. A esquiva dos braços abertos é concordante com idéia que estas áreas evocam uma reação de medo maior que a provocada pelos braços fechados (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985). Estudos recentes mostram que a altura do labirinto não é o fator chave desencadeante da reação de aversão (Treit et al., 1993) e sim a falta das paredes laterais, isto porque, os animais são altamente tigmotáticos em ambientes novos (Rodgers e Cole, 1994), ou seja usam as vibrissas para explorar os ambientes.

O LCE, nos últimos anos tem sido uma ótima ferramenta na avaliação dos efeitos ansiosseletivos de muitas drogas (De-Souza et al., 1997; File, 1992; Handley e MacBlane, 1993; Rodgers e Cole, 1994; Russo et al., 1992). Em adição, a detecção imunohistoquímica da proteína c-Fos na SCPd após 15 minutos de exposição ao LCE, evidencia o envolvimento desta estrutura no processamento da informação advinda da exploração do LCE (Silveira et al., 1992).

Complementarmente, experimentos realizados com estimulação elétrica e química sugerem que os comportamentos evocados pela SCPd são provavelmente modulados por diversos neurotransmissores, entre eles: acetilcolina (Carrive et al., 1986), serotonina (Graeff,

1993), opióides (Fedynyshyn et al., 1989; Steltzer et al., 1987), GABA (Brandão et al., 1982; Schenberg et al., 1981; Schmitt et al., 1990), e aminoácidos excitatórios (Bandler e Depaulis, 1991; Guimarães et al., 1991; Matheus et al., 1994; Schmitt et al., 1986; De-Souza et al., 1997).

1.4. Participação dos Aminoácidos Excitatórios no Comportamento Defensivo

Embora as primeiras evidências sobre a poderosa ação excitatória de alguns aminoácidos datem de mais de 3 décadas atrás (Curtis et al., 1959, 1960), foi somente nos últimos anos que o glutamato (GLU) e o aspartato (ASP) foram considerados neurotransmissores excitatórios do SNC (Beitz e Williams, 1991), após satisfazerem os vários critérios para tal, isto é, liberação dependente de Ca^{++} após estimulação, presença dos mesmos e suas enzimas sintetizadoras nos terminais nervosos, bloqueio da transmissão sináptica por antagonistas específicos e identidade de ação (Watkins e Evans, 1981).

Alguns estudos, sugerem que as sinapses que fazem uso de aminoácidos excitatórios como seus neurotransmissores, estão amplamente distribuídas pelo sistema nervoso central (Cotman et al., 1987). Dentre os aminoácidos excitatórios, o glutamato é considerado o

neurotransmissor mais importante nos circuitos do SNC (Watkins e Evans, 1981).

O glutamato pode exercer muitos papéis centrais, atuando em diversos receptores específicos para aminoácidos excitatórios (Collingridge e Lester, 1989). Estes receptores são divididos em duas grandes classes, os metabotrópicos e os ionotrópicos (Hollmann e Heinemann, 1994). Os receptores metabotrópicos são acoplados a proteína G e também representam alvos da ação do glutamato no SNC (Monaghan et al., 1989). Já os receptores ionotrópicos dividem-se em duas principais categorias, os do tipo NMDA, para os quais o análogo sintético do glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) é um potente estimulador e, os do tipo não-NMDA, nos quais tal análogo não é ativo (Leeson e Iversen, 1994).

Dentre os receptores glutamatérgicos, pela existência de antagonistas altamente seletivos, o subtipo NMDA, tem sido o mais exaustivamente estudado (Leeson, 1993). O receptor NMDA, quando ativado, controla a abertura de um canal iônico que permite a entrada de cátions monovalentes (principalmente Na^+) e divalentes (principalmente Ca^{++}) nas células alvos. Uma característica pouco comum que este receptor possui é que em estado de repouso, seu canal iônico associado está completamente bloqueado por íons Mg^{++} . No entanto, este bloqueio é voltagem-dependente e é removido se a célula

for parcialmente despolarizada por ativação dos receptores não-NMDA ou por outras intervenções excitatórias (Leeson e Iversen, 1994).

Outra característica interessante é que este receptor possui diversos sítios ligantes regulatórios que são tidos como alvos potenciais para ação de drogas (Leeson e Iversen, 1994). Além do sítio de ligação para agonistas, que também é alvo de diversos antagonistas, há um sítio de reconhecimento para o magnésio, outro sítio de reconhecimento para o zinco, um sítio ligante para as poliaminas e outro sítio que reconhece concentrações submicromolares do aminoácido glicina, que parece atuar como um potente regulador da função do receptor NMDA (Leeson e Iversen, 1994). É interessante salientar que este sítio de ligação para a glicina é insensível a estriçnina (Thomson, 1990).

A glicina foi primeiramente proposta como um neurotransmissor em 1965 e posteriormente ela foi aceita como o maior neurotransmissor inibitório do SNC, principalmente a nível de medula espinhal (Delorey e Olsen, 1989; McGeer e McGeer, 1989). A ação estimulatória da glicina, no receptor NMDA, foi somente descoberta em 1987, quando foi demonstrado que a magnitude da resposta eletrofisiológica de células de cultura de neurônios estimulados por NMDA, exibia sua magnitude reduzida ou nula se a glicina fosse rigorosamente excluída do meio

externo (Johnson e Ascher, 1987). Concentrações pequenas de glicina são suficientes para restaurar a resposta normal do NMDA. O efeito da glicina é tão fundamental que alguns autores a descrevem, não somente como um regulador, mas como "co-agonista" do receptor NMDA (Kemp e Leeson, 1993).

Atualmente, o papel fisiológico dos receptores NMDA no SNC está melhor definido. Estes receptores parecem ter importância em processos como memória e aprendizado (Morris, 1989), desenvolvimento neural e plasticidade sináptica (Cotman e Monaghan, 1988), dano neuronal conseqüente de isquemia e hipoglicemia (excitotoxicidade, ou seja, morte celular por acúmulo intracelular de Ca^{++} , devido a ativação maciça destes receptores) (McCulloch, 1992), desordens afetivas, como a ansiedade (Graeff, 1991; 1994; Graeff et al., 1988), epilepsia e, possivelmente diversas desordens neurodegenerativas (Meldrum, 1985).

A localização dos receptores de aminoácidos excitatórios tem sido possível graças ao emprego de técnicas eletrofisiológicas e autorradiográficas que detectam a densidade desses receptores no SNC e as vias neuronais que utilizam os aminoácidos excitatórios como neurotransmissores (De-Souza, 1995). Concentrações significantes foram encontradas no córtex cerebral (Jansen et al., 1989), hipocampo (Leeson e Iversen,

1994), hipotálamo (Beart et al., 1988), amígdala (Halpain et al., 1984) e tronco cerebral (Dye et al., 1989), em especial o mesencéfalo (Halpain et al., 1984).

Do ponto de vista histórico, a primeira indicação de que o glutamato poderia ter um papel na SCP do mesencéfalo foi demonstrado por Sherman e Gebhart (1975), que indicou que a dor reduzia significativamente os níveis de glutamato na SCP, enquanto que a morfina sistêmica eleva tais níveis. Na década de 80, alguns autores (Clements et al., 1987) constataram a presença de neurônios, fibras e processos imunorreativos para glutamato, aspartato, glutaminase e aspartato aminotransferase distribuídos por toda a extensão rostrocaudal da SCP. Estes autores ressaltavam ainda que, os neurônios imunorreativos para o glutamato e para a glutaminase pareciam apresentar um padrão homogêneo de distribuição, sendo localizados principalmente na porção lateral e dorsal desta estrutura (Clements et al., 1987). Recentemente, estudos eletrofisiológicos, imunohistoquímicos (Beitz e Willians, 1991) e autorradiográficos mostraram a importância dos AAE como neurotransmissores na SCP e demonstraram a densidade e distribuição dos subtipos destes receptores (Albin et al., 1990).

Os aminoácidos excitatórios têm sido muito importante no estudo de certas estruturas cerebrais e

padrões coordenados de respostas comportamentais evocados após suas estimulação. Como já foi relatado, o envolvimento da SCP na mediação da resposta defensiva têm sido extensivamente estudado e, a estimulação elétrica foi a técnica primeiramente utilizada para estes estudos (Bandler e Depaulis, 1991). Nos últimos anos, devido as vantagens da técnica de estimulação com aminoácidos excitatórios, este método tem sido o mais utilizado (Bandler e Depaulis, 1991).

Em 1985, Krieger e Graeff demonstraram que microinjeções de baixas doses de GLU na SCPd, induziam respostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de defesa, o mesmo não ocorrendo quando as microinjeções eram feitas fora de tal região.

Posteriormente, Carobrez (1987) e Graeff e colaboradores (1988) demonstraram que os efeitos resultantes da microinjeção de GLU, na SCPd, eram mediados por receptores de AAE específicos. O pré-tratamento local com dietil-ester-ácido glutâmico (GDEE), um antagonista glutamatérgico, bloqueou as respostas comportamentais e neurovegetativas induzidas pelo GLU. Também foi demonstrado que a resposta evocada pela estimulação elétrica, era abolida pela pré-administração de GDEE, resultado este que sugeriu que os AEE endógenos (GLU E ASP principalmente) atuariam como mediadores

fisiológicos nos mecanismos de reação de defesa presentes na SCPd.

Nos últimos anos, estudos comportamentais sobre a reação defensiva, têm destacado o envolvimento do receptor NMDA na mediação destes comportamentos. Injeção periférica de antagonistas competitivos ou não competitivos tem mostrado efeitos do tipo ansiolítico em diversos modelos animais de ansiedade (Bennett et al., 1987; Blanchard et al., 1992; Kehne et al., 1991; Porter et al., 1989; Stephens et al., 1986). De maneira similar, injeções sistêmicas de antagonistas do sítio de glicina acoplado ao receptor NMDA, também tem exibido um perfil ansiolítico (Anthony e Newins, 1982; Corbett e Dunn, 1990; Trullas et al., 1989). Microinjeções de antagonistas do receptor NMDA como o ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP-7) e o ácido quinurênico (Guimarães et al., 1991; Schmitt et al., 1991) e antagonistas do sítio de glicina acoplado ao receptor NMDA, o ácido 7-cloro-quinurênico e o (\pm)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona (HA-966) na SCPd (Matheus et al., 1994), também têm mostrado efeitos ansiolíticos. Em adição, microinjeções de antagonista da glicina (ácido 7-cloro-quinurênico) na SCPd abole o efeito ansiogênico obtido pela injeção sistêmica do pentilenotetrazol (De-Souza et al., 1997)

É interessante salientar que apesar do receptor NMDA ser principalmente um receptor para o glutamato, isto é,

ser ativado sob certas condições pela liberação de glutamato dos terminais nervosos, a responsividade do mecanismo receptor e a manutenção deste, parece depender dos níveis extracelulares de glicina (Leeson e Iversen, 1994). Alguns pesquisadores têm sugerido que o nível endógeno de glicina é suficiente para saturar completamente o sítio de glicina no receptor NMDA (Schell et al., 1997). Porém um número substancial de autores têm sugerido que os sítios da glicina não estão sempre saturados (Czepita et al., 1996; Wilcox et al., 1996), isto porque a glicina exógena, ou ainda a d-serina exógena também agonista deste sítio, potencia respostas do NMDA *in vivo* (Salt, 1989; Thiels et al., 1992; Wood et al., 1989). Em adição, a glicina é capaz de induzir respostas aversivas quando microinjetada na SCPd (Schmitt et al., 1995) e de alterar o efeito de compostos benzodiazepínicos injetados pela via sistêmica (De-Souza et al., 1997).

Em adição, o fato de que o glutamato pode induzir a formação de óxido nítrico sintase (NOS) e conseqüentemente aumento do óxido nítrico (NO) (Paakkari e Lindsberg, 1995), merece ser relatado, principalmente porque alguns autores sugerem que o NO pode ter um papel em mediar a fisiologia e a neurotoxicidade do glutamato (Dawson et al., 1991).

Por muitos anos o NO foi conhecido como um gás tóxico, constituinte da poluição do ar e como um produto do metabolismo microbiano. Apenas recentemente ele foi identificado como um produto das células de mamíferos e indicado como molécula mensageira no sistema nervoso central (Dawson e Dawson, 1996). O NO parece mediar o aumento dos níveis de guanosine-3',5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico) que ocorre na ativação dos receptores glutamatérgicos, principalmente do subtipo NMDA (Garthwaite e Boulton, 1995).

Dentre as várias suposições levantadas nesta introdução, alguns pontos merecem ser realçados:

1. A SCPd não é uma estrutura homogênea quanto a sua morfologia;
2. O comportamento defensivo produzido ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd tem apresentado perfis diferentes;
3. A SCPd participa do comportamento evocado no LCE;
4. A SCPd possui variação densidade de receptores NMDA ao longo do eixo rostrocaudal;
5. Compostos agonistas do sítio de glicina acoplado ao complexo receptor NMDA aplicados diretamente na SCPd têm exibido um perfil ansiogênico e;
6. Compostos antagonistas do sítio de glicina acoplado ao complexo receptor NMDA aplicado na SCPd têm exibido um perfil ansiolítico.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os fatos relatados na introdução, nos propusemos a investigar se existe diferença na emissão do comportamento aversivo evocado no LCE, em ratos submetidos a manipulação química de sítios neurais variando ao longo do eixo rostro-caudal da SCPd. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- verificar o desempenho comportamental de ratos submetidos ao LCE, após tratamento com microinjeções de glicina em três subdivisões distintas da SCPd;

- verificar o desempenho comportamental de ratos submetidos ao LCE, após tratamento com microinjeções do antagonista glicinérgico, HA-966, em três subdivisões distintas da SCPd.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais delineados de maneira tal que, o sofrimento dos animais utilizados fosse minimizado. Em adição, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm), em grupos de dois, e durante tal período, tiveram livre acesso a água e comida.

Os resultados obtidos neste trabalho referem-se aos 187 animais que tiveram sítios da SCPD atingidos pelas drogas, e que foram comprovados após análise histológica, como pode ser visto na figura 1.

3.2. Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com Tribromoetanol (1 ml/100 g, IP). Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se à tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal.

Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA), realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então, uma solução de xilocaina com adrenalina (2%) subcutâneamente visando a formação de uma pápula, que não só tinha efeito anestésico local e vasoconstritor, como também orientou na retirada de uma pequena área ovalada de pele. Em seguida realizou-se a raspagem do perióstio, deixando a calota craniana exposta e permitindo a visualização da sutura lambdóide e da coronária. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi novamente seco e a calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Um dos parafusos foi colocado na parte superior do osso parietal esquerdo e o outro no centro do osso parietal direito. Para o implante da cânula na SCPd, as coordenadas obedecidas, segundo Paxinos e Watson (1986), foram as seguintes: AP = 5.8, 6.7 e 7.6 mm em relação ao bregma (coordenadas estas subentendidas como rostral, intermediária e caudal respectivamente), ML = 1.9 mm e DL = 2.0 mm a partir da superfície externa do osso craniano, em um ângulo de 22°.

Uma vez adaptados, os parafusos e a cânula, novamente o osso foi seco e a área aberta foi preenchida

com uma camada de acrílico autopolimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma sólida prótese. Decorridos alguns minutos para a secagem total desta, um mandril nº 30 foi adaptado à cânula, com o intuito de prevenir o seu entupimento. Nova camada de acrílico foi acrescentada e por fim, seguiu-se a identificação do animal.

Após a cirurgia cada animal foi colocado numa caixa específica para a recuperação, dotada de uma lâmpada de 40 W para evitar a hipotermia conseqüente da anestesia geral. Posteriormente os animais foram colocados aos pares em gaiolas providas de água e comida livre, onde permaneceram até serem utilizados.

3.3. Cânulas

As cânulas-guias implantadas a fim de possibilitar as microinjeções na SCPd foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm. Com o auxílio do paquímetro (Mitutoyo - Brasil) as cânulas foram cortadas no comprimento de 13 mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual não permitia sua total introdução pelo orifício feito previamente com a broca odontológica.

3.4. Microinjeção Intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16.8, 16.4 e 16.2 mm para as porções rostral, intermediária e caudal respectivamente (0.3 mm de diâmetro), confeccionadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas, por um tubo de polietileno, a microseringas (Hamilton, 5 µl). As seringas foram preenchidas com água destilada e a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar. As agulhas possuíam 3,8; 3,4 e 3,2 mm a mais que a cânula-guia de maneira que as drogas fossem realmente microinjetadas na SCPD.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado com o auxílio de um pano e, com um alicate, foi retirado o mandril adaptado à cânula durante o ato cirúrgico. Com o auxílio de limas odontológicas, cortadas de maneira a não ultrapassar 13 mm de comprimento, a cânula-guia foi limpa. Posteriormente a agulha foi introduzida através da cânula. Em cada animal foi injetado 0.3 µl de solução, em 20 segundos. Em seguida o animal permaneceu na sua gaiola por cerca de 5 minutos.

3.5. Teste Comportamental

O teste comportamental utilizado foi o labirinto em cruz elevado (LCE). Esse modelo foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) a partir do trabalho de Montgomery (1955). Posteriormente, Pellow e colaboradores

(1985) forneceram validação comportamental fisiológica e farmacológica do LCE para ratos.

Esse equipamento, em forma de cruz, elevado 50 cm do chão, é composto por dois braços fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm), e por dois braços abertos (50 x 10 cm) também opostos entre si, sendo que tais braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1 cm de altura) para evitar a queda dos animais.

Uma arena quadrada (60 x 60 x 35 cm), confeccionada igualmente em madeira, foi utilizada imediatamente antes do teste no LCE, com o intuito de aumentar a atividade locomotora, bem como dar ao animal chance de se habituar a pouca luminosidade (Lister, 1987).

Estes aparatos utilizados no experimento estavam localizados numa sala com luz amarela, cuja intensidade não ultrapassava 44 Lux. Após o teste de cada animal, os aparatos foram limpos com solução de etanol 10 %.

3.6. Dispositivo de Registro comportamental

Durante o período de 5 minutos que cada animal permaneceu na arena de madeira antes do LCE, foram observados:

- a. a frequência de levantar (FL) e;
- b. a frequência de auto-limpeza (FAL).

Enquanto que, durante o teste do LCE foram registrados os seguintes comportamentos:

- a. Frequência de entradas dos animais nos braços abertos (FEBA) e no braços fechados (FEF);
- b. Tempo de permanência dos animais nos braços abertos (TPBA) e nos braços fechados (TPF);
- c. Frequência de tentativas de entradas no braços abertos (FT). Sendo considerado tentativa, o ato do animal colocar até 3 patas em um dos braços abertos, seguida de retração a posição original;
- d. Latência de entrada em qualquer um dos braços (LE).
- e. Frequência de levantar ("rearing") total, nos braços abertos e fechados (FLT). Esse comportamento é caracterizado pelo levantar da patas dianteiras , permanecendo, o animal, numa posição vertical apoiado nas patas traseiras;
- f. Frequência de auto-limpeza ("grooming") total, nos braços abertos e fechados (FAT).

Posteriormente calculou-se:

- a. os índices tradicionais de ansiedade: → a porcentagem de frequência de entrada nos braços abertos em relação a frequência total de entrada em qualquer um dos braços (FEA) e → a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação a permanência total nos braços (TPA);
- b. Tempo de permanência na plataforma central (TPC), que é o tempo total do experimento (300 s) menos o tempo de permanência em um dos braços.

3.7. Protocolo Experimental

O trabalho teve duas etapas. Na etapa A foram verificados os efeitos da glicina microinjetada em diferentes porções da SCPD de ratos. Na etapa B, foram avaliados os efeitos de um antagonista glicinérgico (HA 966) quando microinjetado nas mesmas porções da SCPD. Em ambas as etapas foi seguido o protocolo descrito abaixo.

Os animais foram alojados aos pares, por no mínimo 5 dias após a implantação das cânulas-guias. No dia do teste o animal era transferido isoladamente para uma ante-sala onde permanecia por cerca de 15 minutos. Em seguida era transferido para a sala do teste, onde era microinjetado com uma das seguintes soluções: a. líquor artificial (LA); glicina (GLY: 120 nmol ou 240 nmol) ou HA 966 (HA: 30 nmol ou 100 nmol) e era recolocado na sua gaiola onde permanecia por cerca de 5 minutos. A seguir o animal era colocado numa arena de madeira, onde era observado por 5 minutos. Passado este tempo, o animal era transferido para o centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e seu comportamento registrado também por um período de 5 minutos, de acordo com o procedimento descrito por Pellow e colaboradores (1985). Após cada sessão experimental, o LCE era limpo, assim como a arena de madeira, com um solução de etanol 10 %.

É interessante salientar que, os grupos experimentais e os controles foram realizados em paralelo; todos os experimentos foram realizados entre 8 e 13 h e as doses foram selecionadas de acordo com a literatura (Matheus et al., 1994; Schmidt, 1995).

3.8. Histologia

Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados com uma solução de pentobarbital sódico (3 mg/kg, IP) e perfundidos, via intracardíaca, com solução salina (NaCl, 0.9%), seguida por solução de formaldeído (10%).

Posteriormente, foram decapitados e receberam uma microinjeção de solução de Azul de Evans (0.15 μ l). Seguiu-se a remoção dos cérebros, que foram acondicionados em solução de formaldeído (10%), por um mínimo de 3 dias. Os cérebros foram fatiados em micrótomo de congelamento (Cryocut 1800, USA). Os sítios das injeções foram identificados através da comparação do corte com o diagrama do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1986) e ilustrados posteriormente nos diagramas do atlas de cérebro de ratos do Swanson (1992).

3.9. Análise Estatística

Os dados, expressos como média \pm EPM, foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett,

para a verificação de homogeneidade das variâncias. Na ocorrência de valores não homogêneos ($p < 0,05$), os dados foram transformados pelo logaritmo ou pela raiz quadrada, com o objetivo de homogeneizar a amostra.

Em seguida foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA). O tratamento e a posição da cânula foram considerados como variáveis independentes e a FL, FAL, FEA, TPA FT, LE, FEF, TPC, FLT, FAT, como variáveis dependentes.

Valores significativos de tratamento, da posição e da interação tratamento X posição indicados pela ANOVA foram submetidos posteriormente ao teste LSD de comparação combinada. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

3.10. Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados as seguintes drogas foram utilizadas:

1. para aplicação IP: tribromoetanol (Aldrich, EUA), pentobarbital sódico (dissolvido em etanol e propilenoglicol).
2. para aplicação intracerebral: líquido artificial (LA), com a seguinte constituição: KCl 2,5 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 1,18 mM e CaCl₂ 1,26 mM (Richards et al., 1995); GLY (Sigma, EUA), dissolvidos em LA; HA (RBI, EUA) dissolvido em LA e Azul de Evans, dissolvido em água destilada.

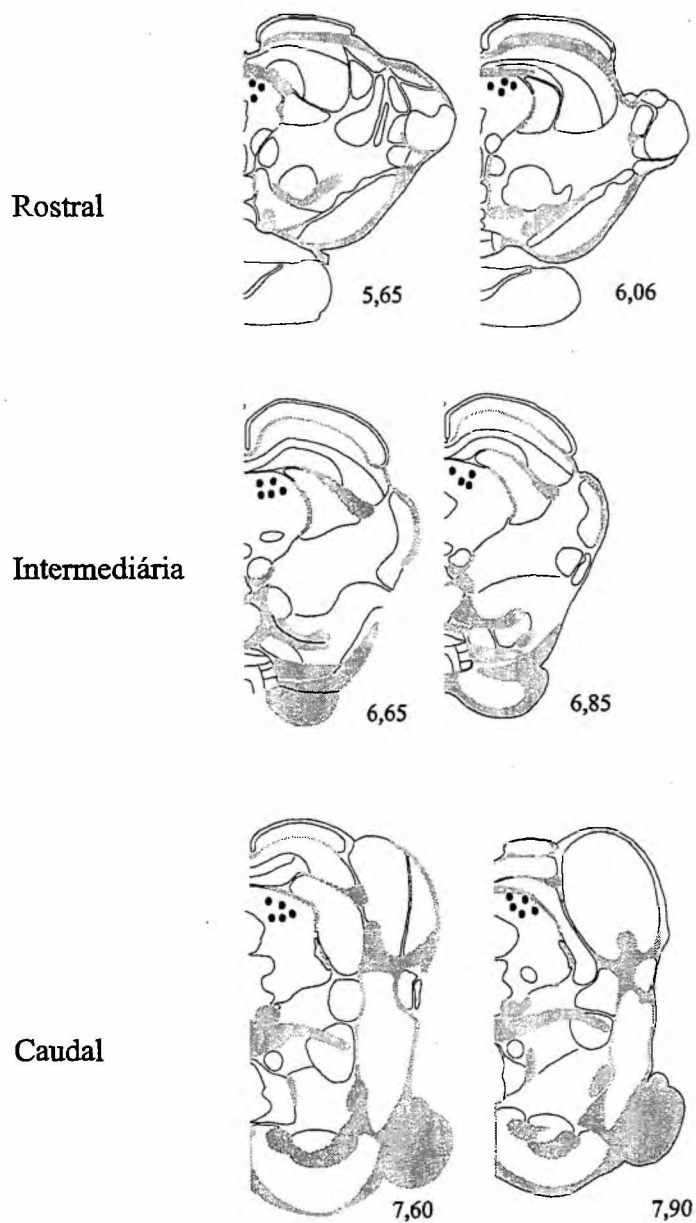


FIGURA 1. Secções frontais do atlas de Swanson (1992), indicando os sítios de microinjeções dos compostos glicinérgicos nas porções rostral, intermedária e caudal da SCPd. O número de círculos é menor que o número de animais utilizados, devido a sobreposição de sítios. Os valores representam as distâncias em 'mm' a partir do bregma.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO I. Efeitos da microinjeção de glicina nas regiões rostral, intermediária e caudal da SCPd

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 2 a 6.

Na figura 2 estão representados os dados obtidos após observação dos animais na arena de madeira. A ANOVA detectou um efeito da microinjeção de GLY na FL [$F(2,100) = 3,71$ $p < 0,05$]. e na FAL [$F(2,100) = 4,77$ $p < 0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a administração de GLY, na dose de 120 nmol, na porção caudal da SCPd, promoveu uma redução significativa ($p < 0,01$) destas medidas.

Com relação a FL, a ANOVA mostrou ainda um efeito dependente do sítio de injeção [$F(2,100) = 4,55$ $p < 0,01$]. O teste *post hoc* mostrou que os animais microinjetados com líquor na posição caudal exibiram um aumento na FL, em relação ao observado nas porções intermediária ($p < 0,01$) e na rostral ($p < 0,05$).

Com relação a FAL, a ANOVA mostrou ainda que houve um efeito da interação entre o tratamento e o sítio de injeção [$F(4,100) = 4,34$ $p < 0,005$]. O teste *post hoc* mostrou que também nesta medida, a microinjeção de líquor na posição caudal promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$)

na FAL, quando comparado com a FAL apresentada pelos animais nas demais porções. A GLY na dose de 120 nmol, microinjetada na porção caudal apresentou um efeito significativamente menor que o efeito mostrado na porção intermediária ($p < 0,01$) e na rostral ($p < 0,05$) e ainda diferente do efeito causado pela GLY na dose de 240 nmol ($p < 0,001$), microinjetada na porção caudal. Em adição a microinjeção de GLY 240 nmol na porção rostral causou um aumento significativamente diferente ($0,05$) do seu respectivo controle.

Na figura 3 pode-se avaliar os índices tradicionais de ansiedade observados no labirinto em cruz elevado, nos ratos microinjetados com GLY.

Com relação a FEA, a ANOVA detectou um efeito do tratamento com GLY [$F(2,82) = 7,60$ $p < 0,001$] e um efeito marginal da interação entre o tratamento e o sítio da injeção [$F(4,82) = 2,36$ $p < 0,059$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de GLY, nas porções rostral e intermediária, na dose de 120 nmol, não alterou significativamente a FEA. Porém, quando administrada na porção caudal da SCPd, a microinjeção de GLY promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) deste parâmetro (Fig. 3).

Com relação a TPA (Fig. 3), a ANOVA também detectou um efeito do tratamento [$F(2,82) = 12,42$ $p < 0,0001$]. O teste *post hoc* mostrou que a dose de 120 nmol de GLY,

microinjetada nas porções rostral e intermediária, não alterou significativamente o TPA. Quando realizada na porção caudal da SCPd, a microinjeção de GLY 120 nmol promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) desta medida. Apesar da microinjeção de GLY 120 nmol nas porções rostral e intermediária não ter diminuído significativamente a TPA, o efeito apresentado foi menor ($p < 0,05$ e $0,001$ respectivamente) do que o visualizado na dose 240 nmol. Em adição, a microinjeção de GLY 240 nmol quando realizada na porção intermediária, mostrou um aumento significativamente diferente ($0,05$) de seu respectivo controle.

Na figura 4 pode-se observar a FT e a FEF, parâmetros bastante aceitos de atividade motora, que não foram afetados pela microinjeção de GLY nas três porções distintas da SCPd.

Na figura 5 estão representadas outras medidas etológicas sugeridas por Rodgers e Cole (1994), que são: a LE e o TPC.

Não foi detectado efeito significativo do tratamento com GLY na LE. Em contrapartida a ANOVA detectou um efeito significativo da microinjeção de GLY sobre o TPC [$F(2,83) = 5,25$ $p < 0,01$]. Entretanto, o teste post hoc mostrou que a microinjeção de GLY, nas doses utilizadas, não apresentou efeito significativo nas porções estudadas quando comparadas com seus respectivos controles. Uma

diferença significativa ($p < 0,05$) foi somente detectada entre os efeitos das duas doses quando microinjetadas na porção caudal.

Na figura 6, podemos observar a FLT e FAT, outras medidas etológicas sugeridas por Rodgers e Cole (1994).

Com relação a FLT a ANOVA detectou um efeito significativo do tratamento [$F(2,83) = 15,89$ $p < 0,0001$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de GLY na dose de 120 nmol causou uma diminuição significativamente diferente de seus respectivos quando realizada nas porções rostral (0,05), intermediária (0,05) e caudal (0,001). Quanto a microinjeção de GLY 240 nmol, esta dose diminuiu a FTL quando realizada nas porções intermediária e caudal (0,001).

No que diz respeito a FAT, a ANOVA detectou um efeito significativo da microinjeção com GLY [$F(2,83) = 6,11$ $p < 0,005$]. O teste *post hoc* mostrou ainda que, a microinjeção de GLY na dose de 120 nmol, quando realizada na porção rostral e na caudal reduziu significativamente ($P < 0,01$ e 0,05 respectivamente) a FAT.

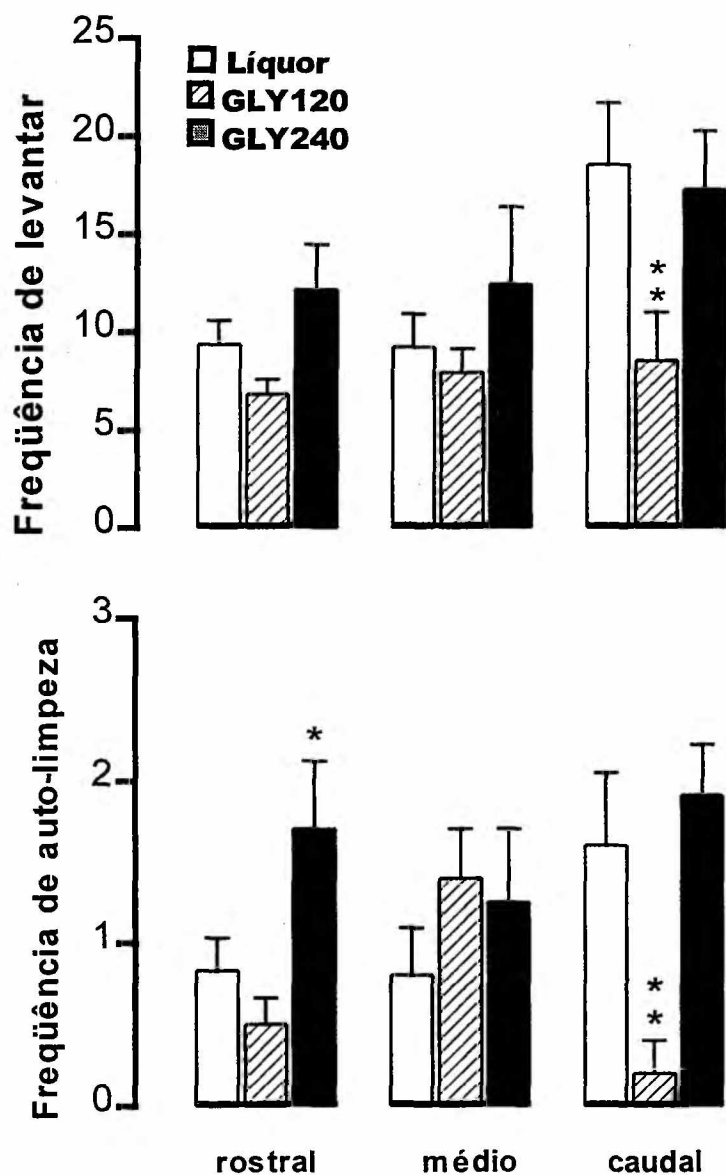


Figura 2 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de GLY (120 e 240 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a freqüência de levantar (FL: painel superior) e freqüência de auto-limpeza (FAL: painel inferior), em ratos observados na arena de madeira. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (LA).

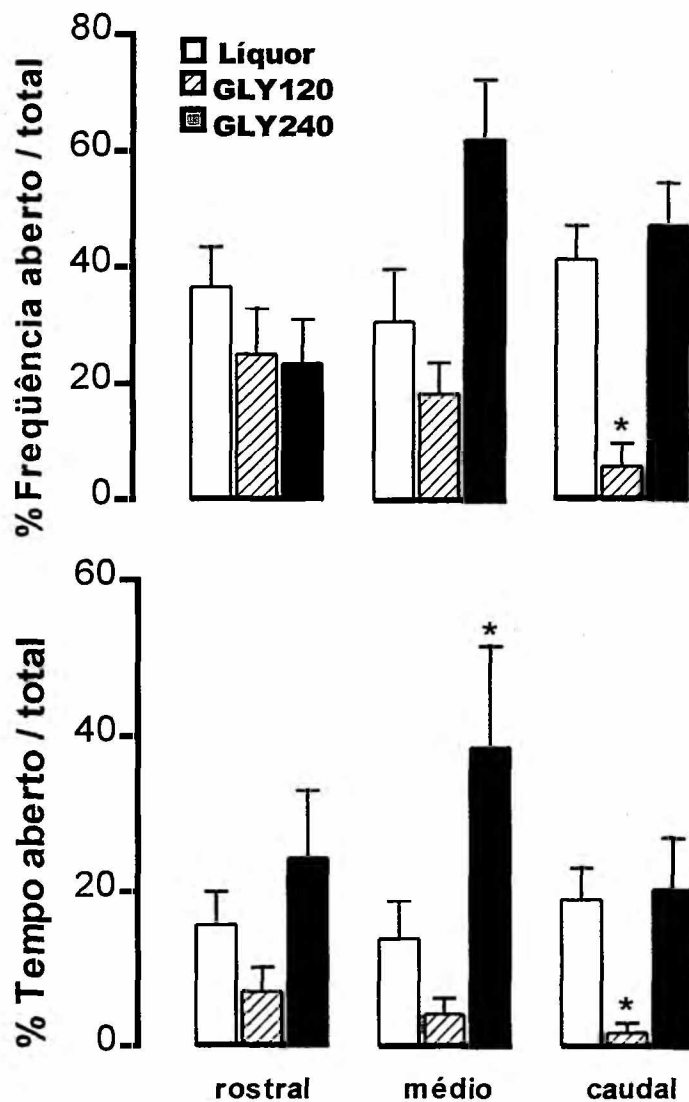


Figura 3 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de GLY (120 e 240 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a % freqüência de entradas nos braços abertos dividida pela freqüência total (FEA: painel superior) e % de tempo (s) de permanência nos braços abertos dividida pela permanência total nos braços (TPA: painel inferior), em ratos submetidos ao LCE. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (LA).

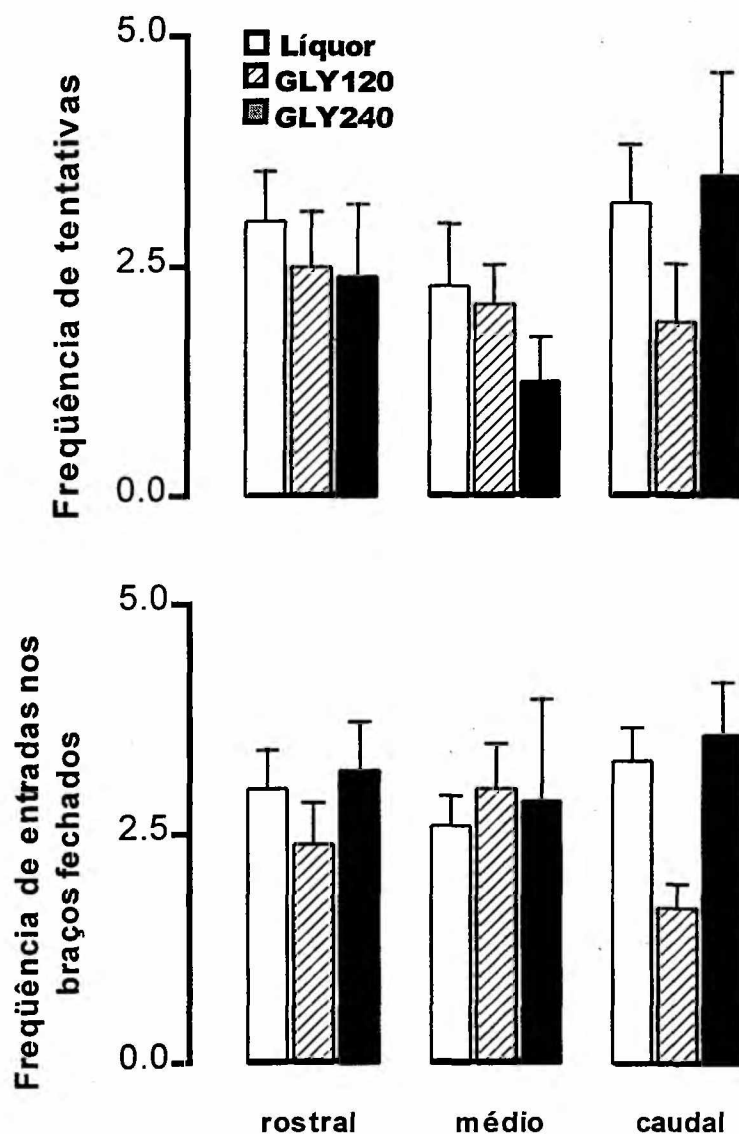


Figura 4 - Efeitos das microinjeções ($0,3 \mu\text{l}$) de GLY (120 e 240 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a frequência de tentativas de entradas nos braços abertos (FT: painel superior), e frequência de entradas nos braços fechados (FEF: painel inferior), em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais.

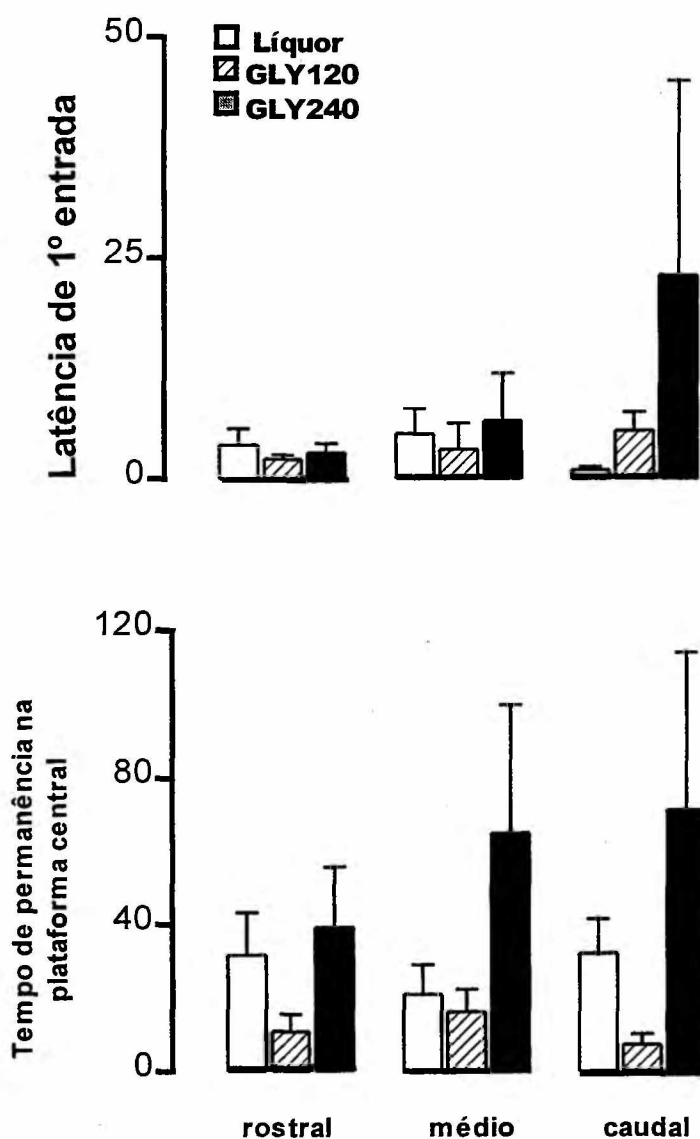


Figura 5 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de GLY (120 e 240 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a latência (s) da 1ª entrada em qualquer um dos braços (LE: painel superior) e tempo de permanência na plataforma central (TPC: painel inferior) em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais.

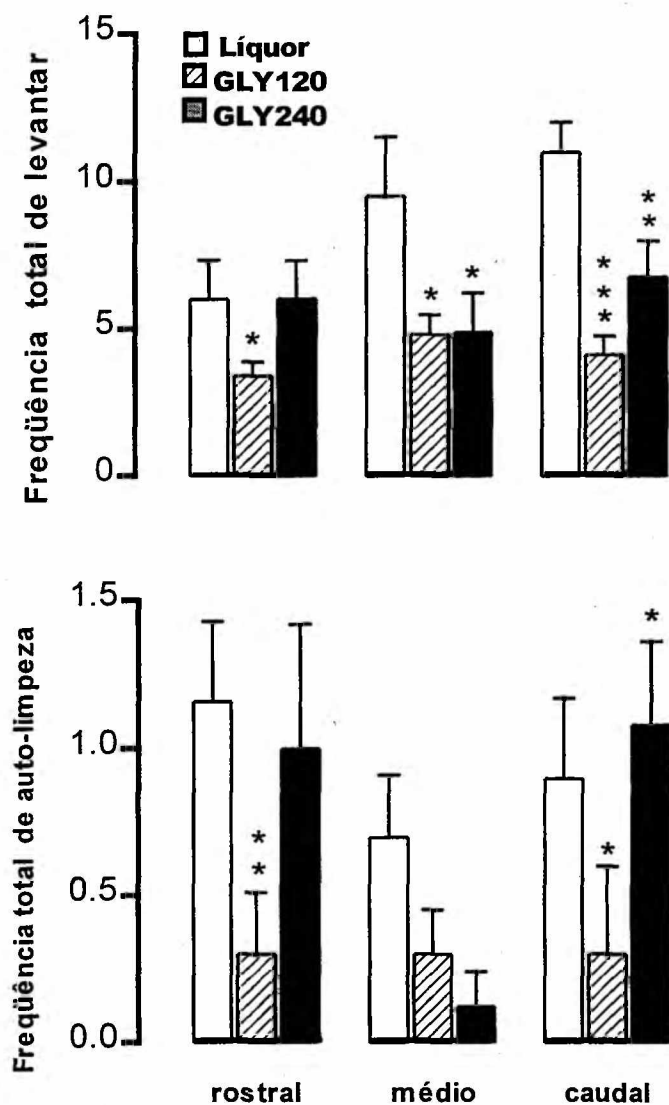


Figura 6 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de GLY (120 e 240 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a frequência total de levantar (FLT: painel superior) e frequência total de auto-limpeza (FAT: painel inferior), em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (LA).

4.2. EXPERIMENTO II. Efeitos da microinjeção de HA nas regiões rostral, intermediária e caudal da SCPd

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 7 à 11.

Na figura 7 estão os dados obtidos após observação dos animais na arena de madeira. A ANOVA detectou um efeito da microinjeção de HA na FL [$F(2,86) = 3,47$ $p < 0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de HA, na dose de de 30 nmol não apresentou efeitos significativos, enquanto que na dose de 100 nmol, quando microinjetado nas porções intermediária e caudal da SCPd, promoveu uma redução significativa da FL ($p < 0,01$). A ANOVA mostrou também um efeito de posição [$F(2,86) = 8,04$ $p < 0,001$] e ainda da interação entre o tratamento e a posição [$F(4,86) = 3,73$ $p < 0,01$]. O teste *post hoc* mostrou que o efeito causado pela microinjeção de HA na dose de 100 nmol, quando realizada na porção intermediária é menor ($p < 0,01$) do efeito obtido após a aplicação da dose de 30 nmol. Em adição, a administração de liquor no sítio rostral apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) da FL, quando comparado aos animais controle da porção caudal.

Com relação a FAL, a ANOVA detectou um efeito do tratamento [$F(2,86) = 4,83$ $p < 0,05$]. O teste *post hoc*

mostrou que a microinjeção do HA na dose de 30 nmol aumentou esta medida na porção rostral e intermediária ($p < 0,05$), enquanto que na dose maior (100 nmol) um aumento foi visualizado somente na porção na rostral ($p < 0,01$).

Na figura 8 pode-se avaliar os índices tradicionais de ansiedade observados no labirinto em cruz elevado.

Com relação a FEA, a ANOVA detectou um efeito do tratamento [$F(2,86) = 22,8$ $p < 0,0001$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de HA, na dose de 30 nmol, promoveu um aumento significativo da FEA nas três porções da SCPd estudadas ($p < 0,001$; 0,01 e 0,001 para a porção rostral, intermediária e caudal respectivamente). A microinjeção de HA na dose de 100 nmol também causou uma redução significativa ($p < 0,01$) na FEA, nas três porções.

Com relação ao TPA, a ANOVA também detectou um efeito do tratamento [$F(2,86) = 18,7$ $p < 0,0001$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de HA, na dose de 30 nmol, promoveu um aumento significativo do TPA nas três porções da SCPd ($p < 0,001$; 0,01 e 0,001 para a porção rostral, intermediária e caudal respectivamente). Já a microinjeção de HA 100 nmol causou um aumento deste parâmetro, significante na porção rostral ($p < 0,01$) e na intermediária ($p < 0,05$), havendo um tendência na porção caudal ($p = 0,058$).

Na figura 9 pode-se observar a FT e a FEF.

Dentre estes parâmetros comportamentais, a ANOVA detectou um efeito de tratamento [$F(2,86) = 3,61$ $p < 0,05$] sobre a FT. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de HA, na dose de 100 nmol, promoveu uma redução significativa na FT quando realizada na porção rostral e na caudal ($p < 0,05$), porém não apresentou efeito significativo na porção intermediária. Com relação a FEF, a microinjeção de HA não apresentou efeito significativo.

Com relação a figura 10, pode-se verificar que nos parâmetros de LE e TPC não foi detectado efeito significativo após a microinjeção de HA.

Na figura 11, podemos observar a FLT e FAT após a microinjeção com HA.

Com relação a FLT a ANOVA detectou um efeito significativo do tratamento [$F(2,85) = 12,1$ $p < 0,0001$] e de posição [$F(2,85) = 8,40$ $p < 0,0005$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de HA 30 nmol reduziu ($p < 0,01$) esta medida quando realizada na porção caudal. Mostrou também que, microinjeção de HA 100 nmol quando realizada nas porções intermediária e na caudal reduziu significativamente ($p < 0,05$) a FLT. Em adição, a administração de líquor no sítio rostral apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) da FLT, quando comparado aos animais controle da porção caudal.

No que diz respeito a FAT, a ANOVA detectou um efeito significativo do tratamento [$F(2,86) = 3,34$ $p < 0,05$]. O teste *post hoc* que, a microinjeção de HA na dose de 100 nmol, quando realizada na porção rostral aumentou significativamente ($P < 0,05$) esta medida.

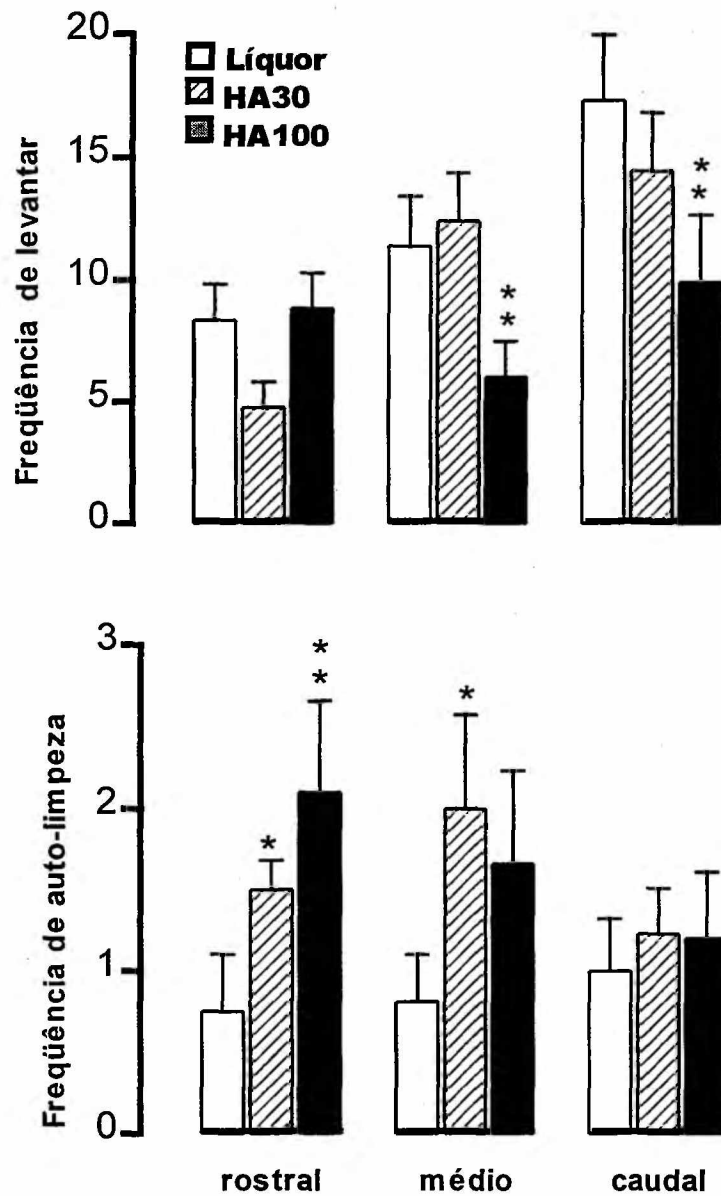


Figura 7 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de HA (30 e 100 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a frequência de levantar (FT: painel superior) e frequência de auto-limpeza (FAL: painel inferior), em ratos observados na arena de madeira. Os dados representam a média \pm epm de 8-13 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (LA).

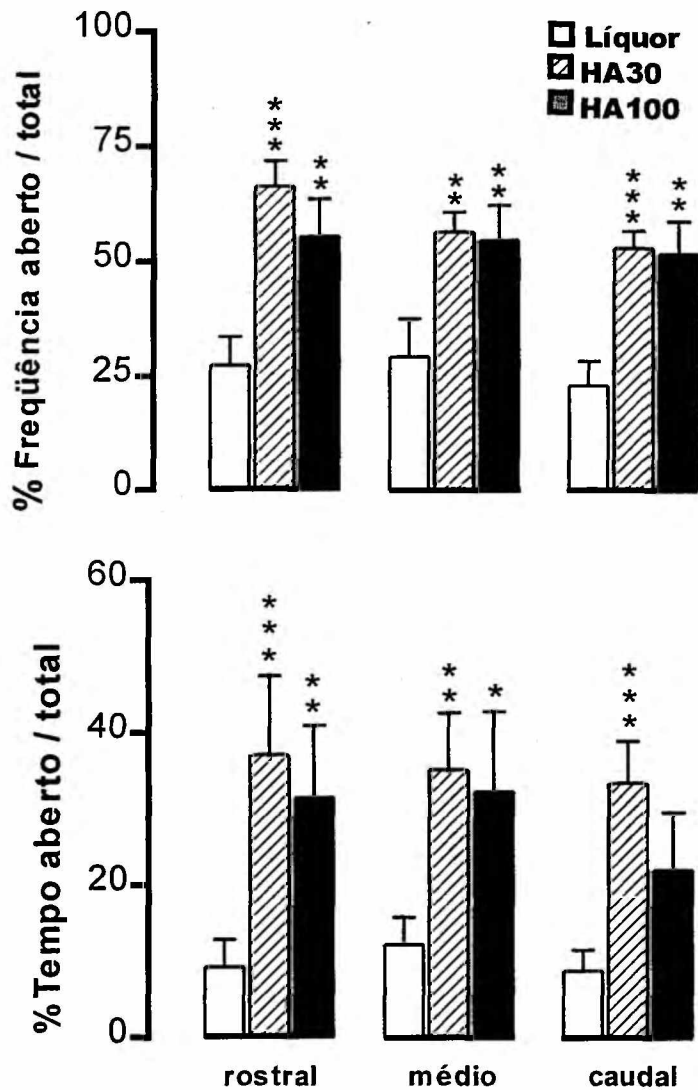


Figura 8 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de HA (30 e 100 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a % freqüência de entradas nos braços abertos dividida pela freqüência total (FEA: painel superior) e % de tempo (s) de permanência nos braços abertos dividida pela permanência total nos braços (TPA: painel inferior), em ratos submetidos ao LCE. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 em relação ao grupo controle (LA).

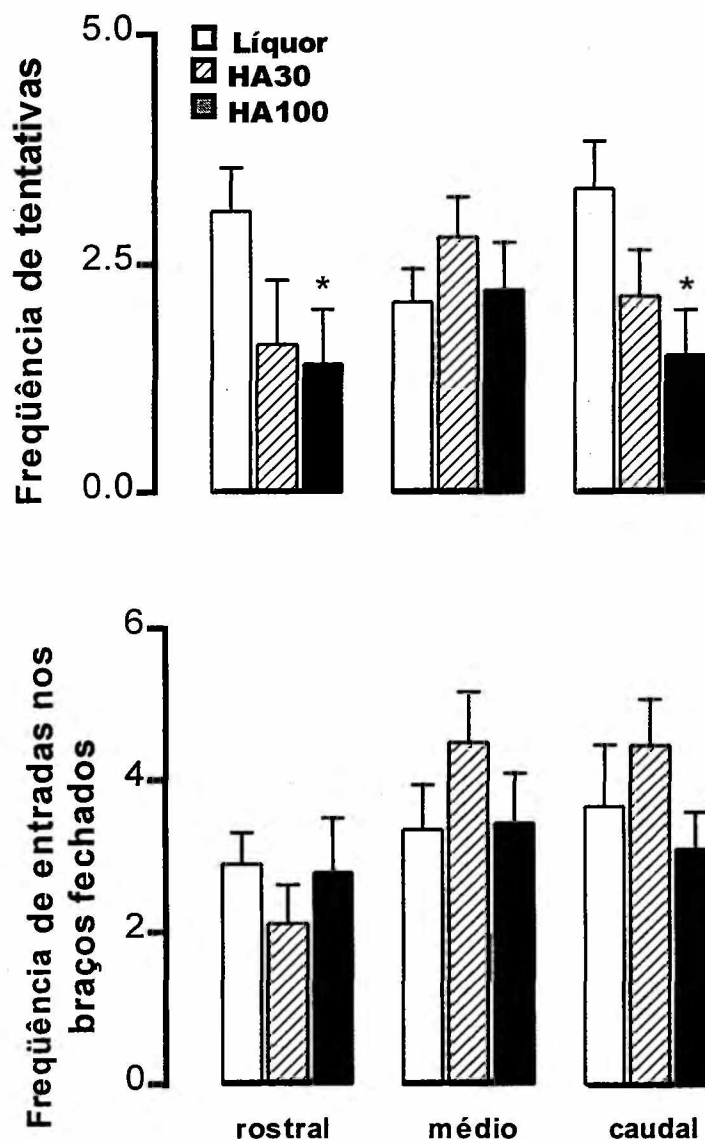


Figura 9 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de HA (30 e 100 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a frequência de tentativas de entradas nos braços abertos (FT: painel superior), e frequência de entradas nos braços fechados (FEF: painel inferior), em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (LA).

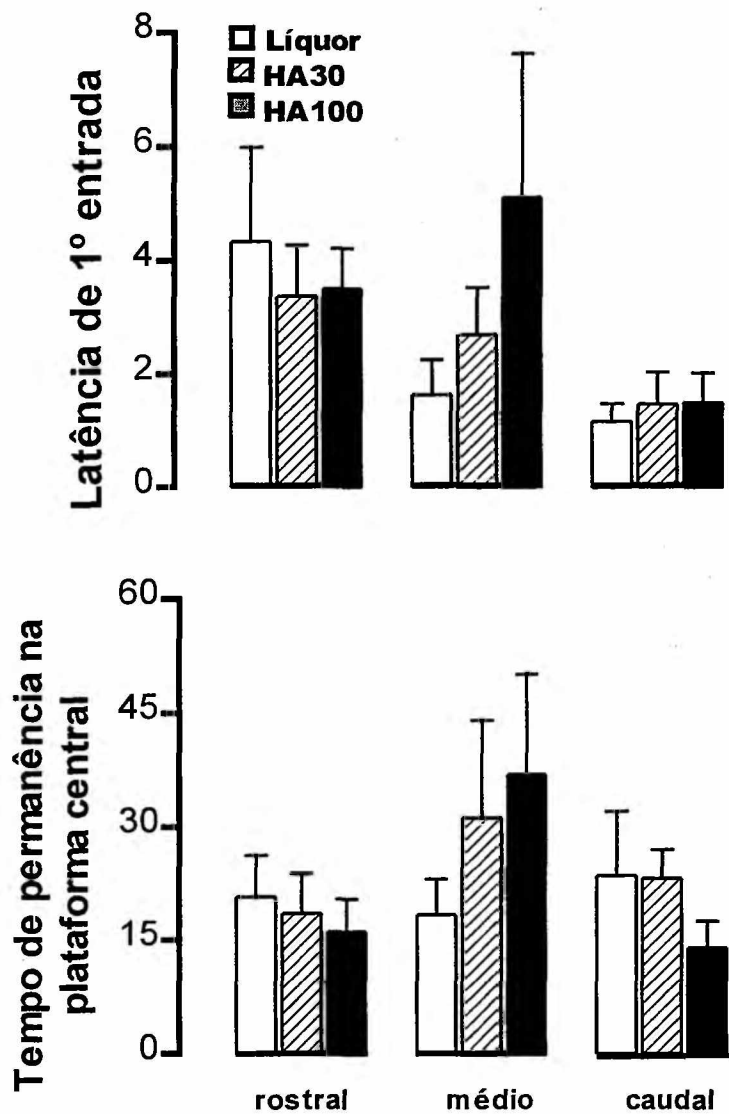


Figura 10 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de HA (30 e 100 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a latência (s) da 1ª entrada em qualquer um dos braços (LE: painel superior) e Tempo (s) de permanência na plataforma central (TPC: painel inferior) em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais.

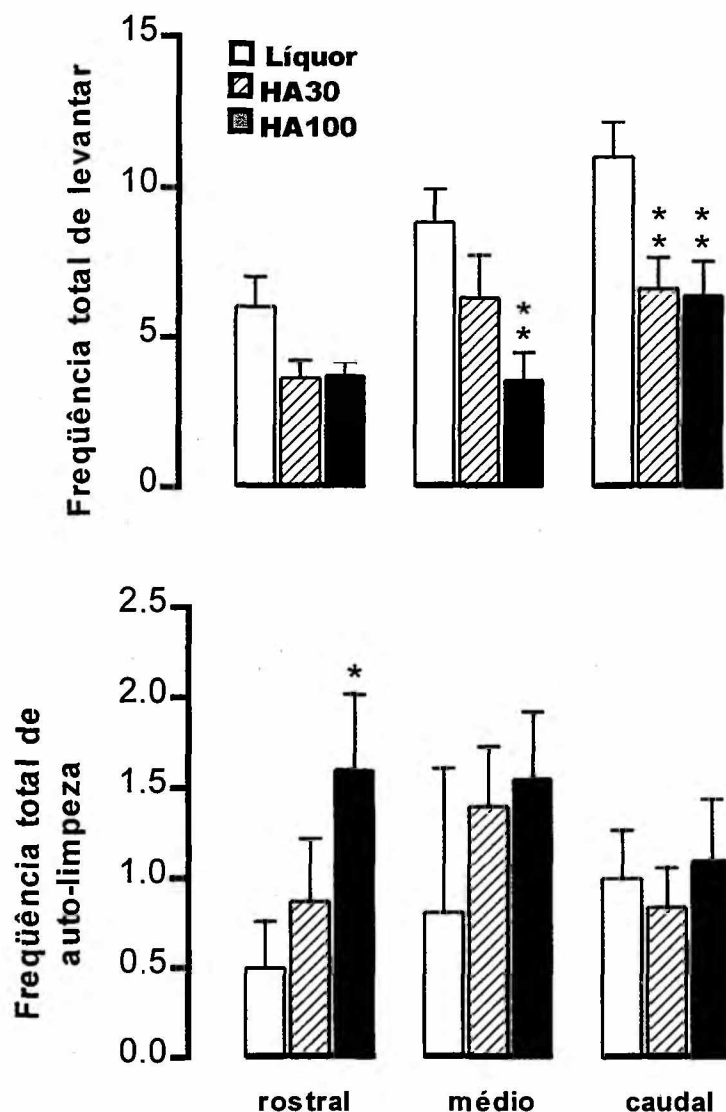


Figura 11 - Efeitos das microinjeções (0,3 μ l) de HA (30 e 100 nmol) em diferentes porções da SCPd (rostral, médio e caudal) sobre a frequência total de levantar (FLT: painel superior) e frequência total de auto-limpeza (FAT: painel inferior), em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média \pm epm de 8-12 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (LA).

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível verificar que ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd a microinjeção de glicina apresentou um efeito ansiogênico dependente da dose e sítio. Por outro lado, o antagonista glicinérgico, HA966, exibiu perfil ansiolítico nas duas doses utilizadas e nos três sítios de microinjeção.

Em resumo, as evidências obtidas foram as seguintes:

- a) A microinjeção de glicina quando realizada na porção caudal da SCPd, na dose de 120 nmol exibiu uma diminuição nos índices tradicionais de ansiedade (FEA e TPA) sem afetar a atividade motora (FT e FEF);
- b) A microinjeção de glicina na dose de 240 nmol não reproduziu os efeitos obtidos com a administração de glicina 120 nmol na porção caudal da SCPd. Porém, na porção intermediária da SCPd, o tratamento com glicina na dose de 240 nmol aumentou a FEA e o TPA, sem afetar a FEF. Entretanto, nesta dose a microinjeção de glicina diminuiu a FT.
- c) A microinjeção de HA966 aumentou os índices tradicionais de ansiedade de maneira semelhante, tanto na dose de 30 nmol quanto na dose de 100 nmol nas três regiões estudadas ao longo do eixo da SCPd.

Os pilares para a compreensão dos resultados obtidos no presente trabalho assentam-se em duas principais áreas: a neuroanatomia e a neurobiologia comportamental. Estudos neuroanatômicos realizados na década de 70, passaram a sugerir que a SCP era uma complexa estrutura que poderia ser subdividida em regiões distintas (Hamilton, 1973). Apesar das controvérsias que esta subdivisão causou (Mantyh, 1982; 1982*) a idéia de heterogeneidade permaneceu ao longo dos anos, principalmente tendo em vista a grande quantidade de neurotransmissores presentes nesta estrutura e a variedade de funções específicas mediadas por ela (Behbehani, 1995).

Em meados da década de 80, estudos citoarquitetônicos (Beitz, 1985) apoiados por estudos histoquímicos (Conti et al., 1988) sugeriram uma nova subdivisão para a SCP. Havia porém, a necessidade de mais estudos para validar a existência de núcleos na SCP, isto porque, somente aceita-se como núcleo, uma população neuronal que tenha em comum propriedades morfológicas e/ou funcionais que a distingue de áreas vizinhas (Mantyh, 1982; 1982*).

Apesar de haver uma certa concordância quanto a citoarquitetura da SCP, a distribuição topográfica das diversas funções nesta estrutura ainda era, na época, um tópico cheio de controvérsias (Ricardo, 1987). Estudos

autorradiográficos, eletrofisiológicos, neuroanatômicos utilizando-se de transporte retrógrado e/ou anterógrado e degeneração axonal confirmaram que a SCP se conectava com diversas áreas do SNC (Beitz, 1982; Cameron et al, 1995; Marchand e Hagino, 1983; Pittman et al, 1979; Saper et al, 1979; Thompson et al, 1996). Esta interconectividade diversa é o que provavelmente dá o suporte para as muitas funções atribuídas a SCP (Beitz e Shepard, 1985).

Com o advento da técnica de estimulação química com AAE, que parecia oferecer vantagens maiores (Goodchild et al., 1982) que a técnica de estimulação elétrica primeiramente utilizada (Ranck, 1975), os estudos funcionais ganharam um grande aliado.

Estudos comportamentais sobre a reação aversiva em animais, relacionada possivelmente com a ansiedade em humanos, foi uma das áreas bastante favorecidas com a técnica de estimulação por AAE (Bandler e Depaulis, 1991; Carobrez, 1987; Graeff et al., 1988; Krieger e Graeff, 1985). Entretanto, a interpretação dos resultados destes estudos é bastante complexa, principalmente devido a dificuldade para medir exatamente a difusão efetiva dos AAE, quando microinjetados pela via intracerebral. Para superar este inconveniente, uma combinação de critérios comportamentais e histológicos pode fornecer alguma indicação da difusão máxima efetiva (Bandler, 1988).

Na literatura uma informação a respeito da difusão de AAE esta relatada em um trabalho de Bandler e colaboradores, onde é citado que no volume de 0,2 μ l a difusão dos AAE não deve passar de 1,0 - 2,0 mm de diâmetro (Bandler et al., 1985). Conseqüentemente, o raio seria a metade destes valores a partir do sítio da injeção, ou seja, 0,5 - 1,0 mm. Aceitando-se a difusão como sendo diretamente proporcional ao volume, tanto como dependente do tempo de injeção, a microinjeção de um volume de 0,3 μ l possivelmente alcança uma distância de cerca de 0,75 - 1,5 mm a partir do sítio da injeção. Esta distância é menor do que a existente entre as porções rostral e caudal (determinadas aqui neste trabalho), porém não menor que a distância entre estas e a porção intermediária. Baseando-se nesses fatos, pode-se dizer que os resultados obtidos nas porções rostral e caudal são mais fidedígnos, enquanto que para os resultados da porção intermediária existe a possibilidade de difusão dos compostos para as outras regiões.

O labirinto em cruz elevado, também conhecido como labirinto em X elevado, é um modelo animal de ansiedade derivado do trabalho de Montgomery (1955), que baseia-se num conflito aproximação-esquiva, ou seja, um conflito entre o comportamento exploratório e a aversão natural por ambientes abertos. Como conseqüência dessas propriedades aversivas exibidas pelos braços abertos, os

animais dispendem a maior parte do tempo nos braços fechados e a proporção do total de exploração nos braços abertos (FEA e TPA) fornece uma medida de ansiedade (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

Observando a FEA e o TPA no presente trabalho, e comparando-os com os dados clássicos da literatura, podemos dizer que a microinjeção de GLY na dose de 120 nmol administrada na porção caudal da SCPd teve um efeito ansiogênico, sendo este efeito não observado nas demais porções. Esta discrepância de efeito ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd poderia ser conseqüente de diferença quantitativa no número de sítios glicinérgicos acoplados ao receptor NMDA. Entretanto, a não existência de trabalhos relativos à densidade do receptor NMDA na extensão rostrocaudal da SCPd, limitam esta hipótese. Ademais, a microinjeção de glicina na dose de 240 nmol não repetiu o perfil apresentado pela dose de 120 nmol, e sim um efeito aparentemente ansiolítico quando microinjetada na porção intermediária e, as microinjeções do antagonista glicinérgico (HA) causaram efeito ansiolítico em todas as porções da SCPd o que diminui a possibilidade de diferença quantitativa no número de receptores nesta região. Porém, uma outra justificativa para estes dados, poderia ser uma diferença de saturação por glicina endógena nos receptores glicinérgicos, variando ao longo do eixo rostro-caudal da SCPd. Alguns

estudos suportam esta hipótese de que os sítios da glicina nem sempre estão saturados *in vivo* (Schell et al., 1997). Outra hipótese seria ainda uma modulação sináptica diferenciada, ao longo da extensão da SCPd, por parte dos transportadores de membrana responsável pelo transporte de glicina. Alguns autores relatam a habilidade dos transportadores de glicina em reduzir a concentração deste aminoácido nos receptores NMDA (Supplisson e Bergman, 1997). Em adição, a ativação do receptor NMDA pelo glutamato induz a formação de NOS e conseqüentemente de NO (Dawson e Dawson, 1996; Garthwaite e Boulton, 1995). O aumento do NO ativa a guanilato ciclase solúvel que produz GMP cíclico (Paakkari e Lindsberg, 1995). Entretanto, o papel do NO na neurotransmissão mediada pelo NMDA é bastante complexo e apresenta algumas contradições, sendo difícil definir em que direção o NO atua. Na literatura consta que o NO pode não somente aumentar o cGMP, como inibir a entrada intracelular de cálcio induzida pelo NMDA e a atividade da NOS, exercendo um "feedback" negativo e tendo um efeito oposto (Cappendijk et al., 1993; Hoyt et al., 1992; Ikeda et al., 1993). Dados mais recentes mostram que o NO pode ter um papel regulatório na excitabilidade dos neurônios da SCP, inibindo a atividade neuronal nesta área (Lovick, 1996; Lovick e Key, 1996). No entanto, não há dados na literatura afirmando se esta "regulação" é

uniforme por toda a extensão da SCPd. Assim, existe a possibilidade que a influência exercida pelo NO seja diferente ao longo do eixo rostro-caudal da SCPd, o que também poderia ser uma justificativa para o fato de que a microinjeção de GLY na dose menor apresentou um efeito ansiogênico dependente do sítio, enquanto o antagonista, HA, apresentou efeito ansiolítico em todas as porções estudadas.

Nos últimos anos alguns autores (Rodgers e Cole, 1994; Johnson e Rodgers, 1996) têm demonstrado o grande valor de uma visão mais etológica na avaliação dos comportamentos apresentados no LCE. Baseado nessa proposição, no presente trabalho, em adição aos índices tradicionais, outras medidas foram observadas: frequência de levantar e frequência de auto-limpeza (não somente no LCE, como também na arena de madeira), latência de primeira entrada, tempo na plataforma central, frequência de tentativas e frequência de entradas nos braços fechados.

A frequência de levantar é um comportamento de atividade geral mais relacionado com a exploração de ambientes novos (Shillito, 1970). A frequência de levantar tem sido avaliada em modelos animais de ansiedade e, alguns autores acreditam que o aumento desta atividade poderia ser o reflexo de uma diminuição do estado de ansiedade experimentado pelo animal (Lister,

1990). No entanto, devido a possibilidade de falsos positivos (Cunha e Mansur, 1978), a frequência de levantar, quando avaliada em um teste comportamental de ansiedade como o LCE, tem que ser relacionada a outros parâmetros comportamentais de forma que a interpretação dos resultados não incorra em erros (Juraska et al., 1984)

No presente trabalho, os efeitos visualizados sobre a frequência de levantar na arena de madeira parecem estar mais relacionados com atividade geral do que com ansiosseletividade. Apesar de na arena de madeira, a microinjeção da glicina 120 nmol na porção caudal ter causado redução neste parâmetro, o que poderia ser indicativo de ansiogênese, isto não é confirmado pela GLY 240 nmol que não teve efeito. Em adição, a administração de HA, aceito na literatura como ansiolítico (Matheus et al., 1994), causou diminuição nesta medida após na dose de 100 nmol nas porções intermediária e caudal.

De maneira semelhante, a FLT observada no LCE parece estar mais relacionada com a atividade geral, pois esta medida foi diminuída tanto pela microinjeção de GLY quanto pela microinjeção de HA.

Outra medida etológica é a auto-limpeza, um comportamento não exploratório, também bastante observado em situações de conflito (Rodgers e Cole, 1993). Vários estudos demonstram que a auto-limpeza se

trata, na realidade, de um grupo de respostas somáticas, autonômicas e endócrinas, associadas com comportamentos adaptativos, que asseguram a sobrevivência do animal (Celis e Torre, 1993). O comportamento de auto-limpeza pode ser provocado com estimulação elétrica e química de determinadas áreas do SNC, entre elas a SCP (Roeling et al., 1993; Spruijt et al., 1986; Van Erp et al., 1993).

Alguns autores acreditam que a auto-limpeza está relacionada de uma forma muito direta com o estresse, mais precisamente, aquele desencadeado por situações novas e conflitantes, isto porque há relatos de que ratos colocados em ambientes estranhos, têm o número de auto-limpeza aumentado (Dunn et al., 1981). Em adição, tem sido demonstrado que drogas ansiolíticas podem diminuir a frequência deste comportamento (Crawley e Moody, 1983). Entretanto, os elos entre ansiedade, estresse e auto-limpeza são difíceis de serem estabelecidos (File et al., 1988) pois, enquanto os relatos anteriores sugerem que o aumento de auto-limpeza ocorre em resposta a um aumento no medo e no nível de alerta, alguns autores não acharam correlação entre auto-limpeza e a incidência de outras indicações de medo e ansiedade, como o ato de urinar, defecar e "congelar" (Doyle e Yule, 1959).

No presente trabalho, a frequência de auto-limpeza não parece denotar estresse ou ansiedade. A microinjeção de glicina na dose de 120 nmol, sugerido neste trabalho

como ansiogênico na porção caudal, causou uma diminuição tanto na FAL quanto na FAT, ao contrário do esperado. Em adição, a microinjeção de HA, descrito na literatura como ansiolítico (Matheus et al., 1994), causou aumento tanto da FAL quanto na FAT.

Enfim, a maioria dos indícios obtidos no presente trabalho, sugerem que a frequência de levantar e a frequência de auto-limpeza estão mais relacionados com atividade geral do que com ansiedade.

Nos últimos anos alguns autores têm utilizado a FT como parâmetro comportamental de atividade geral (Lopes-da-Silva, 1994; Lopes-de-Souza e Carobrez, 1992). Em adição, a análise fatorial mostrou que a FEF estaria mais relacionada com atividade motora que com ansiosseletividade (File, 1992). Assim, estas duas medidas tem sido utilizadas, para medir atividade geral. Os dados do presente trabalho mostram que nenhum dos tratamentos alterou estes parâmetros, exceto por uma pequena diminuição ocorrida na FT observada após a microinjeção de HA 100 nmol na porção rostral e caudal, mas que isoladamente não deve ter valor significativo.

A LE é um outro comportamento bastante observado no LCE. Esta medida fornece informação a respeito da tendência inicial de explorar meio ambientes potencialmente perigosos (Rodgers e Cole, 1993; 1994). No presente trabalho, este parâmetro não apresentou

diferença significativa entre a microinjeção de GLY e HA e seus respectivos controles, sugerindo que tal medida não é sensível aos compostos glicinérgicos usados. No entanto, é interessante salientar as escalas de valores; a LE apresentada por alguns animais microinjetados na porção caudal com GLY na dose de 240 nmol foi bastante alta, o que sugere um perfil pouco consistente da GLY nesta dose.

Nos últimos anos alguns autores têm questionado porque o tempo de permanência na plataforma central é um dado pouco considerado e às vezes ignorado (Lee e Rodgers, 1990; Rodgers e Cole, 1994). O TPC poderia ser um bom índice do conflito esquiva/aproximação desencadeado pela configuração do labirinto. Alguns resultados sugerem que um aumento na TPC poderia estar associado com a transição para esquiva dos braços abertos, isto é, ansiogênese (Lee e Rodgers, 1990). Com drogas ansiogênicas, outros resultados foram tão marcantes que foi sugerido que a plataforma central juntamente com os braços abertos poderia ser considerada "espaço aberto" (Vasar et al., 1993). Em contrapartida, outros autores sugerem que a remoção da plataforma central poderia ser um maneira alternativa, mais simples, de detectar efeitos das drogas sobre a porcentagem de tempo nos espaços abertos (Shepherd et al., 1994), e sugerem o uso um labirinto em forma de zero que parece

possibilita isto, sem maiores preocupações com uma plataforma central. No presente trabalho, a microinjeção de GLY e de HÁ, nas doses utilizadas não afetaram o TPC, o que sugere que talvez esta medida tida algumas vezes como tempo de tomada de decisão (Rodgers et al., 1996) pode não ser sensível aos compostos glicinérgicos e salientam a necessidade de cuidado na interpretação dos dados referentes a plataforma central no LCE (Rodgers e Cole, 1994).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que os compostos glicinérgicos podem ter efeitos variáveis ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd, que são dependentes da dose, do sítio de injeção e do tipo de ação exercida pelo composto (excitatória ou inibitória).

Esta discrepância de efeito ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd poderia ser devido a muitos motivos, como diferença quantitativa no número de sítios glicinérgicos acoplados ao receptor NMDA, diferença de saturação por glicina endógena nos receptores glicinérgicos, modulação sináptica diferenciada, por parte dos transportadores de membrana responsáveis pelo transporte de glicina, ou ainda diferenças na influência exercida pelo NO ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd.

Os resultados reforçam a hipótese da participação da neurotransmissão por AAE da SCPd, nos estados ansiosos. Pode-se ainda concluir que, a SCPd é uma estrutura complexa e não homogênea, cuja sensibilidade, varia ao longo do seu eixo rostro-caudal.

Estudos futuros sobre o sítio da glicina acoplado ao receptor NMDA e sua regulação na SCPd são necessários para um melhor entendimento desse assunto.

7. RESUMO

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) tem sido considerada como uma estrutura integrativa no neuro-eixo, que é essencial para a coordenação da reação defensiva de várias espécies animais.

As características comportamentais de reação de defesa evocadas em ratos, variam ao longo da SCP dorsal (SCPd), indicando que assim como as dimensões mediolateral e dorsolateral, a dimensão rostro-caudal tem importância fundamental na emissão dos diferentes comportamentos defensivos. Em adição, estudos prévios realizados neste laboratório, mostraram um perfil ansiogênico da microinjeção de glicina (GLY) realizada na SCPd. Baseado nestes fatos, verificou-se a possibilidade de que a microinjeção de GLY aplicada em diferentes posições ao longo do eixo rostro-caudal da SCPd, poderia evocar padrões comportamentais distintos em modelos animais de ansiedade.

O presente trabalho foi delineado para verificar um possível efeito ansio-seletivo causado pela microinjeção (0.3 μ l) de compostos com ação no sítio de glicina acoplado ao complexo receptor NMDA, em diferentes porções da SCPd. Para tanto, foram utilizados ratos Wistars machos de 4 meses de idade, implantados esterotaxicamente

com uma cânula-guia direcionada para a SCPd, em três diferentes distâncias do bregma: ROSTRAL - AP = 5.8 mm, INTERMEDIÁRIA - AP = 6.7 mm e CAUDAL - AP = 7.6 mm.

O teste comportamental utilizado foi o labirinto em cru elevado (LCE). Os principais parâmetros observados foram os índices tradicionais de ansiedade (FEA e FTA) e a atividade motora (FT e FEF).

Os resultados obtidos mostram que: a) A microinjeção de glicina 120 nmol na porção caudal da SCPd, exibiu uma diminuição nos índices tradicionais de ansiedade (FEA e TPA) sem afetar a atividade motora (FT e FEF); b) A microinjeção de glicina 240 nmol na porção intermediária da SCPd, em contrapartida aumentou o TPA, sem afetar a FEA e a FEF; e c) A microinjeção de HA966 aumentou os índices tradicionais de ansiedade de maneira semelhante nas três regiões estudadas ao longo do eixo da SCPd, tanto na dose de 30 nmol quanto na dose de 100 nmol. Nenhuma das doses utilizadas de HA afetou a FEF e somente a dose maior afetou a FT.

Esta diferença de efeitos ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd pode ser conseqüente de diferença quantitativa no número de sítios glicinérgicos acoplados ao receptor NMDA. Entretanto, a não existência de trabalhos relativos à densidade do receptor NMDA na extensão rostrocaudal da SCPd, limitam esta hipótese. Outra justificativa para estes efeitos, poderia ser uma

diferença de saturação por glicina endógena nos receptores glicinérgicos, ou ainda uma modulação sináptica diferenciada, ao longo da extensão da SCPd, por parte dos transportadores de membrana responsáveis pelo transporte de glicina. Em adição, dados recentes mostram que o NO pode ter um papel regulatório na excitabilidade dos neurônios da SCP, inibindo a atividade neuronal nesta área. Assim, existe a possibilidade que a influência exercida pelo NO seja diferente ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd.

Enfim, os resultados obtidos no presente trabalho, reforçam a hipótese de participação da neurotransmissão por AAE da SCPd na ansiedade e que a SCPd é uma estrutura complexa e não homogênea, cuja sensibilidade pode variar ao longo do seu eixo rostro-caudal.

Estudos futuros sobre o sítio da glicina acoplado ao receptor NMDA e sua regulação na SCPd são necessários para um melhor entendimento desse assunto.

8. ABSTRACT

The midbrain periaqueductal gray matter has long been considered the most caudal integrating structure within the neural axis, essential for the coordination of defensive reaction in animals.

Behavioral characteristics of the defense reaction elicited in rats vary along the dorsal and dorsolateral periaqueductal gray matter (dPAG), suggesting that not only the mediolateral or the dorsoventral extension, but also the rostrocaudal extension should be observed. In addition, dPAG is also related to emotional behavior such as fear and possibly anxiety, and previous studies have shown an anxiogenic profile after glycine (GLY) microinjected within the dPAG. Based on these facts, there is a possibility that GLY applied to different subdivisions of the dPAG elicits distinct behavioral patterns in animal models of anxiety. The present work was set up in order to verify a possible anxiolytic effect caused by compounds acting on NMDA-coupled GLY receptor within three different subdivisions of the dPAG.

Male Wistar 4 months age rats, were implanted stereotaxically with guide cannula into the DPAG, at three different levels: ROSTRAL - AP = 5.8 mm, INTERMEDIATE - AP = 6.7 mm, CAUDAL - AP = 7.6 mm.

The apparatus used was the elevated plus maze (EPM), and the performance was assessed through data collected

with the percentage of Open Arm Entries (OAE) and Open Arm Time (OAT), as well as through the number of Enclosed Arm Entries (EAE).

The results showed that GLY microinjection (120 nmol) within the caudal portion of the dPAG exhibited a decrease in OAE and OAT, but failed to affect the EAE. At the higher dose (240 nmol) GLY microinjection within the intermediate portion of the dPAD exhibited a increase in OAT, but did not affected the OAE and EAE. On the other hand, HA966 increased OAE and OAT when microinjected within the three regions of the dPAG, in both doses, and did not affect EAE.

These different effects along rostrocaudal axis of the dPAG could be consequent of a quantitative difference in the NMDA-coupled GLY receptor number. Unfortunately, the lack of studies related to this receptor density, along the extension rostrocaudal limited this hypothesis. Another way to justify is a possible difference in saturation of this site by endogenous glycine, or yet, a differentiated modulation in the glycine concentration by the membrane transporters. In addition, recent studies show that NO seems to have a regulatory role in the neurons excitability within the PAG, inhibiting the neuronal activity in this area. Then, there is a possibility that this influence mediated by the NO can be different along the rostrocaudal axis of this region.

Results obtained in the present study, reinforce the hypothesis that AAE participate in the neurotransmission within dPAG during anxious states, and that dPAG is a complex and heterogeneous structure, which sensibility varies along its rostrocaudal axis.

Future studies about NMDA-coupled GLY receptor and its regulation are need, in order to enhance the understanding.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.B. Brain mechanisms for offense, defense and submission. **Behav. Brain Sci.**, 2: 201-241, 1979.
- ALBIN, R.L.; MAKOWIEC, R.L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE IV, L.S.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neurosci. Lett.**, 118: 112-115, 1990.
- ANTHONY, E.W. and NEWINS, M.E. Anxiolytic-like effects of N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor ligands in the rat potentiated startle test. **Eur. J. Pharmacol.**, 250: 317-324, 1993.
- BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region, **Prog. Psychobiol. Physiol.**, 13: 67-222, 1988.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P. and DEPAULIS, A. Introduction emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: **The midbrain periaqueductal gray matter**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler, Plenum Press, New York, 1991.
- BANDLER, R. and DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: **The midbrain periaqueductal gray matter**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler, Plenum Press, New York, 1991.
- BANDLER, R.J.; DEPAULIS, A.; VERNES, M. Identification of midbrain neurons mediating defensive behavior in the rat by microinjection of excitatory amino acids. **Behav. Brain Res.**, 15: 107-119, 1985.

BANDLER, R. and KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. In: G. Holstage, R. Bandler and C.B. Saper (Eds) **Progress in Brain Research**, 107: 285-300, 1996.

BANDLER, R. and SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, 17(9): 379-389.

BASBAUM, A.I. and FIELDS, H.L. The origin of descending pathways in the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. **J. Comp. Neurol.**, 187: 513-532, 1979.

BEART, P.M.; NICOLOPOULOS, L.S., WEST, D.C. and HEADLEY, P.M. An excitatory amino acid projection from ventromedial hypothalamus to periaqueductal gray in the rat: autoradiographic and electrophysiological evidence. **Neuroscience Letters**, 85: 205-211, 1988.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, 46: 575-605, 1995.

BEITZ, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. 1. Nuclear volume, cell number, density, orientation and regional subdivisions. **J. Comp. Neurol.**, 237: 445-459, 1985).

BEITZ, A.J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, vol 7, n°1, pp 133-159, 1982).

BEITZ, A.J.; MULLET, M.A and WEINER, L.L. The periaqueductal gray projections to the rat spinal trigeminal, raphe magnus, gigantocellular pars alpha and paragigantocellular nuclei arise from separate neurons. **Brain Research**, 288: 307-314, 1983.

- BEITZ, A.J. and SHEPARD, R. D. The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A golgi analysis. **J. Comp. Neurol.**, 237: 460-475, 1985.
- BEITZ, A.J. and WILLIAMS, F.G. Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG-Raphe magnus pathway. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, p. 305-327, 1991.
- BENNETT, D.A. and AMRICK, C.L. Antagonists at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In. **Excitatory amino acid transmission**. New York, pp 213-216, 1987.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; CAROBREZ, A.P.; VENIEGAS, R.; RODGERS, R.J. and SHEPHERD, J.K. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. **Psychopharmacology**, 108: 352-362, 1992.
- BOVIER, P.; BROCKKAMP, C.L.E. and LLOYD, K.G. Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. **Brain Reseach**, 248: 313-320, 1982.
- BRANDÃO, M.L.; AGUIAR, J.C. and GRAEFF, F.G. GABA-mediation of the antiaversive action of minor tranquilizers, **Pharmacol. Biochem. Behavior.**, 16: 397-402, 1982.
- CAMERON, A.A.; KHAN, I.A. WESTLUND, K.N. and WILLIS, W.D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-Leucoagglutinin study. II. Descending Projections. **The journal of comparative neurology**, 351: 585-601, 1995.

CANTERAS, N.S.; CHIAVEGATTO, S.; RIBEIRO DO VALLE, L.E. and SWANSON, L.W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, in press, 1997.

CAPPENDIJK, S.L.; DeVRIES, R. and DZOLJIC, M.R. Inhibitory effect of nitric oxide (NO) synthase inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependnet mice. **Neurosc. Lett.**, 162(1-2): 97-100, 1993.

CARLSON, N.R. **Physiology of behavior**, 4^o ed. Allyn and Bacon, 1991.

CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In: **Neuroscience and Behavior**. Vitória, UFES, p. 21-29, 1987.

CARRIVE, P.; BANDLER, R. and DAMPNEY, R.A L. Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. **Brain Research**, 460: 339-345, 1988.

CARRIVE, P.; SCHMITT, P. and KARLI, P. Flight induced by microinjection of D-tubocurarine or a-bungarotoxin into medial hypothalamus or periaqueductal gray matter: Cholinergic or GABAergic mediation? **Behav. Brain Res.**, 22: 233-248, 1986.

CELIS, M.E.; TORRE, E. Measurement of grooming behavior. **Meth. Neurosci.**, 14: 378-388, 1993.

CLEMENTS, J.R.; MADL, J.E.; JOHNSON, R.L.; LARSON, A.A. and BEITZ, A.J. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. **Exp. Brain. Res.**, 67: 594-602, 1987.

COLLINGRIDGE, G.L. and LESTER, R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol. Rev.**, 40: 143-210, 1989.

CONTI, F.; BARBARESI, P. and FABRI, M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivision in the rat periaqueductal gray matter. **Neuroscience**, 24: 629-633, 1988.

CORBETT, R. and DUNN, R.R.W. Effects of HA-966 on conflict, social interaction, and plus-maze behaviors. **Drug Dev. Res.**, 24: 201-203, 1991.

COTMAN C.W. and MONAGHAN.D.T. Excitatory aminoacid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. **A. rev. Neurosci.**, 11: 61-80, 1988.

COTMAN C.W.; MONAGHAN, D.T.; OTTERSEN OP. And STORM-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory aminoacid receptors and their pathways. **Trends Neurosci.**, 10: 273-280, 1987.

CRAWLEY, J.N.; MOODY, T.W. Anxiolytics block excessive grooming behavior induced by ACTH1-2, and bombesin. **Brain Res. Bull.**, 10: 399-401, 1983.

CUNHA, J.M. E MANSUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**, 16: 259-267, 1978.

CURTIS, D.R., PHILLIS, J.W. and WATKINS, J.C. The chemical excitation of spinal neurones. **Nature**, 183: 611-612, 1959.

CURTIS, D.R. PHILLIS, J.W. and WATKINS, J.C. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. **J. Physiol.**, 150:656-682, 1960.

CZEPITA, D.; DAW, N.W. and REID, S.N. Glycine at the NMDA receptor in cat visual cortex: saturation and changes with ages. **J. Neurophysiol.**, 75(1): 311-317, 1996.

DE-SOUZA, M.M.; SCHENBERG, L.C. and CAROBREZ, AP. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behavioural brain research** (in press), 1997.

DAWSON, T.M.; BREDT, D.S.; FOTUHI, M.; HWANG, P.M. and SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 7797-7801, 1991.

DAWSON, V.L. and DAWSON, T.M. Nitric oxide actions in neurochemistry. **Neurochem. Int.**, 29(2): 97-110, 1996.

DEAN, P. and REDGRAVE, P. Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: **The midbrain periaqueductal gray matter**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler, Plenum Press, New York, 1991.

DELOREY, T.M. and OLSEN, R.W. GABA and Glycine. In G.Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers And P. Molinoff (eds.) **Basic Neurochemistry**. 4th ed. New York: Raven Press. P: 389-399, 1989.

DOYLE, G. and YULE, E.P. Grooming activities and freezing behavior in relation to emotionality in albino rats. **Anim. Behav.** 7: 18-22, 1959.

DUNN, A.J. GUILD, A.L. KRAMARCY, N.R.; WARE, M.D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty

but not ACTH or b-endorphin. **Pharmacol. Biochem. Behavior.**, 15: 605-608, 1981.

DYE, J.; HEILIGENBERG, W; KELLER, C.H. and KAWASAKI, M. Different classes of glutamate receptors mediate distinct behaviors in a single brainstem nucleus, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86(22): 8993-8997, 1989.

EDWARDS, S.B. and FLYNN, J.P. Corticospinal control of striking in centrally elicited attack behavior. **Brain Res.**, 41(1): 51-65, 1972.

ENDLER, J.A. Defence against predators. In: **Predator-prey relationships**, University of Chicago Press, Chicago, 1986, pp. 109-134.

FEDYNYSHYN, J.P.; KWIAT, G. and LEE, N.M. Characterization of high affinity opioid binding sites in rat periaqueductal gray P2 membrane. **J. Pharmacol.**, 159: 83-88, 1989.

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

FERNANDEZ DE MOLINA, A. ; HUNSPERGER, R.W. Organization of the subcortical system governing defense and flight reaction in the cat. **J. Physiology.**, 160: 200-213, 1962.

FILE, S.E. Behavioral detection of anxiolytic action. In: **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**, Wiley, Manchester, pp 25-44, 1992.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S. and WALKER, J.H. Comparison of adaptive responses in familiar and novel environments:

modulatory factors. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 525: 69-79, 1988.

GARTHWAITE, J. and BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.**, 57: 683-706, 1995.

GOODCHILD, A.K.; DAMPNEY, R.A.L. and 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. Neurosc. Meth.**, 6: 351-363, 1982.

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain aversive systems. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 14(4-5): 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems in anxiety. In: **Handbook of anxiety**. Amsterdam: Elsevier, v.3, p. 307-354, 1990.

GRAEFF, F.G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: **New concepts in Anxiety**, London: Macmillan, 1991. p. 288-312.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Rev. Neurosci.**, 4: 181-211, 1993.

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.G.; CAROBREZ, A.P. and SILVEIRA, M.C.L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: **Frontiers in excitatory amino acids research**. New York: Liss, 1988. p. 325-332.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, 58 (1-2): 123-131, 1993.

GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE-AGUIAR, J.C. and GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptors antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, 103: 91-94, 1991.

GUIMARÃES, F.S. e GRAEFF, F.G. Escalas de avaliação na ansiedade experimental. **Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia**, São Paulo, 1989.

HALPAIN, S.H.; WIECZOREK, C.M. and RAINBOW, T.C. Localization of L-glutamate receptors in rat brain by quantitative autoradiography. **J. Neurosci.**, 4: 2247-2258, 1984.

HAMILTON, B.L. Citoarchitecture subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. **J. Comp. Neurol.** 149: 1-28, 1973.

HANDLEY, S.L. and McBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, 29: 129-138, 1993.

HANDLEY, S.L. and MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, 327: 1-5, 1984.

HESS, W.R.; BRUGGER, M. Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta**, 1: 33-52, 1943.

HOLLMANN, M. and HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors, **Ann. Rev. Neurosci.**, 17: 31-108, 1994.

HOLSTEGE, G. Descending pathways from the periaqueductal gray and adjacent areas. In: **The midbrain periaqueductal gray matter**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler, Plenum Press, New York, 1991.

HOYT, K.R.; TANG, L.H. AIZEMAN, E. and REYNOLDS, I.J. Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca²⁺ in culture rat forebrain neurons. **Brain Res.**, 592(1-2): 310-316, 1992.

HUNSPERGER, R.W. Affektreaktionen auf elektrische reisierung in hirmstamm der katse. **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta**, 14: 70-92, 1956.

IKEDA, J.; OCHIEAI, K. MORITA, I. and MUROTA, S. Endogeneous nitric oxide blocks calcium influx induced by glutamate in neurons containing NADPH diaphorase. **Neurosci. Lett.**, 158 (2): 193-196, 1993.

JANSEN, K.L.R.; FAULL, R.L.M. and DRAGUNOW, M. Excitatory amino acid receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of (3H)TCP, (3H)glycine, L(3H)glutamate, (3H)AMPA and (3H)kainic acid binding sites. **Neuroscience**, vol 32, n° 3, pp 587-607, 1989.

JOHNSON, J. W. and ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, 325: 529-531, 1987.

JOHNSON, N.J.T. and RODGERS, R.J. Ethological analysis of cholecystokinin (CCKa and CCKb) receptor ligants in the elevated plus-maze test of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, 124: 355-364, 1996.

JURASKA, J.M.; HENDERSON, C.; MULLER, J. Differential rearing experience, gender, and radial maze performance. **Develop. Psychology.**, 17: 209-215, 1984.

KEHNE, J.I.I.; McCLOSKEY, T.C.; BARON, B.M.; CHI, E.M.; HARRISON, B.L.; WITTEN, J.P. and PALFREYMAN, M.G. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation induced ultrasonic vocalizations. **Eur. J. Pharmacol.**, 193: 283-292, 1991.

KEMP, J.A. and LEESON, P.D. The glycine site of the NMDA receptor _ five years on. **Trends of Pharmacol. Sci.**, 14: 20-25, 1993.

KRIEGER, M.S.; CONRAD, L.C.A. and PFAFF, D.W. An autoradiographic study of the efferent projections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **J. Comp. Neurol**, 183: 785-816, 1979.

KRIEGER, J.E. and GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 18: 61-67, 1985.

LEE, C. and RODGERS, R.J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology**, 102: 507-513, 1990.

LEESON, P.D. Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: **Drug Design for Neuroscience**. New York: Raven Press, 1993. p. 339-381.

LEESON, P.D. and IVERSEN, L.L. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. **Journal of medicinal Chemistry**, vol. 37, n°. 24, 1994.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, 92 (2): 180-185, 1987.

LISTER, R.G: Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol. Ther.**, 46: 321-340, 1990.

LOPES-DA-SILVA, N. Alteração no comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado em função da idade, do sexo e do isolamento social. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1994.

LOPES-DE-SOUZA, A.S. and CAROBREZ, A.P. Avaliação quantitativa e qualitativa da ansiedade no labirinto em cruz elevado através do índice de conflito. **VII Reunião Anual da FESBE**. Caxambú, 1992. Resumos 1.21.

LOVICK, T.A. Role of nitric oxide in medullary raphe-evoked inhibition of neuronal activity in the periaqueductal gray matter. **Neuroscience**, 75(4): 1203-1209, 1996.

LOVICK, T.A. and KEY, B.J. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. **Exp. Brain Res.** 108(3): 382-388, 1996.

MANTYH, P.W. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observation in the cat and rat. **J comp. Neurology**, 206: 146-158, 1982.

MANTYH*, P.W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. **J comp. Neurology**, 204: 349-363, 1982.

MARCHAND, J.E. and HAGINO, N. Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. **Neuroscience**, 9(1):95-106, 1983.

MATHEUS, M.G.; NOGUEIRA, R.L. CAROBREZ, A.P.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, 113: 565-569, 1994.

McCULLOCH, J. Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. **Br. J. Clin. Pharmacol**, 34: 106-114, 1992.

McGEER, P.L. and McGEER, E.G. Amino acid neurotransmitters. In G. Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers And P. Molinoff (eds.) **Basic Neurochemistry**. 4th ed. New York: Raven Press. P: 311-332, 1989.

MELDRUM, B. Possible therapeutic application of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. **Clin Sci**. 68: 113-122, 1985.

MESULAM, M.M. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. **J. Histochem. Cytochem.**, 26: 106-117, 1978.

MONAGHAN, D.T.; BRIGDES, R.J.; COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 29: 365-402, 1989.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol.**, 48: 254-260, 1955.

- MORRIS, R.G.M. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. **J. Neurosci.**, 9: 3040-3057, 1989.
- MOS, J.; KRK, M.R.; VAN DER POEL, A.M. and MEELIS, W. Aggressive behavior induced by electrical stimulation in the midbrain central gray of male rats. **Agress. Behav.**, 8: 261-284, 1982.
- NASHOLD, B.S. WILSON, W.P. and SLAUGTER, D.G. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. **J. Neurosurg.**, 30: 14-24, 1969.
- NAUTA, W.J.H. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat brain. **Brain**, 81: 319-340, 1958.
- PAKKARI, ILARI and LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. **Annals of medicine**, 27: 369-377, 1995.
- PAXINOS, G. and WATSON, C. **The rat brain** in stereotaxic coordinates. 2 ed. Academic Press Australia, 1986.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Met.**, 14: 149-167, 1985.
- PFAFF, D.W.; LEWIS, C.; DIAKOW, C. and KEINER, M. Neurophysiological analysis of mating behavior responses as hormone sensitive reflexes. In: **Progress in Physiological Psychology**, vol. 5, Academic Press, New York, 1973.

PITTMAN, Q.J.; BLUME, H.W.; KEARNEY, R.E. and RENAUD, L. P. Influence of midbrain stimulation on the excitability of neurons in the medial hypothalamus of the rat. **Brain Res.**, 174: 39-53, 1979.

PORTER, J.H.; WILEY, J.L. and BALSTER, R.L. Effects of phencyclidine-like drugs on punished behavior in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 248:997-1002, 1989.

RANCK, J.B. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. **Brain Res.**, 98: 417, 1975.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science**, 161: 444-445, 1969.

RICARDO, J.A., Neural pathways of aggressive and defensive behavior. **Neuroscience and Behavior**, Ed. by Marcus L. Brandão, Vitória, 1987.

RICHARDS, D.A. .; LEMOS, T.; WHITTON, P.S. and BOWERY, N.G. Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. **Journal of neurochemistry**, 65(4), 1995.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A . and HOLMES, A . Animal models of anxiety: na ethological perspective. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, 30: 289-304, 1997.

RODGERS, R.J. and COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiology and Behavior**, vol 53, pp 383-388, 1993.

- RODGERS, R.J. and COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. IN: Ethology and **Psychopharmacology**. New York: John Wiley, 1994. p. 9-44.
- ROELING, T.A.P.; VAN ERP, A.M.M.; MELLIS, W.; KRUK, M.R.; VEENING, J.G. Behavioral effects of NMDA injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Brain Res.**, 550: 220-224, 1991.
- RUSSO, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C. and GRAEFF, F.G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray in anxiety. **Psychopharmacology**, 110: 198-202, 1992.
- SALT, T.E. Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and d-serine in the rat thalamus in vivo. **Brain Res**, 481: 403-406, 1989.
- SANGER, D.J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. **Neuromethods**, 19: Animal Models in Psychiatric, II, The Human Press Inc, 1991.
- SAPER, C.B. SWANSON, L.W. and COWAN, W.M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. **J. Comp. Neurol.** 183: 689-706, 1979.
- SCHELL, M.J.; BRADY Jr, R.O.; MOLLIVER, M.E. and SNYDER, S.H. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. **The Journal of Neuroscience**, 17: 1604-1615, 1997.
- SCHMITT, M.L., GRAEFF, F.G. and CAROBREZ, A.P. Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into 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. and CAROBREZ, A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. **Neurosc. Letters**, 189: 93-96, 1995.
- SCHMITT, P.; CARRIVE, P.; DISCALA, G.; JENCK, F.; BRANDÃO, M.; BAGRI, A.; MOREAU, J.J. and SANDNER, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. **Behavior. Brain Res.**, 22: 181-190, 1986.
- SHEPHERD, J.K.; GREWAL, S.S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J. and DOURISH, C.T. Behavioral and pharmacological characterisation of elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, 116: 56-64, 1994.
- SHERMAN, A.D. and GEBHART, G.F. Pain-induced alteration of glutamate in periaqueductal central gray and its reversal by morphine. **Life Sci.**, 15: 1781-1789, 1975.
- SHILLITO, E.E. A method for investigating the effect of drugs on the exploratory behavior of mice. **Br. J. Pharmacol.**, 40: 113-123, 1970.
- SILVEIRA, M.C.L.; SANDNER, G. and GRAEFF, F.G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, 56: 115-118, 1993.
- SKULTETY, F.M. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. **Arch. Neurol.**, 8: 608-620, 1963.
- SPRUIJT, B.M.; COOLS, A.R.; GISPEN, W.H. The periaqueductal gray: a prerequisite for ACTH induced excessive grooming, **Behav. Brain Res.**, 20: 19-25, 1986.

STELTZER, A.; TRAVERSE SLATER, N. and BRUGGENCATE, G. Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in a vitro model of epilepsy. **Nature**, 326: 698-701, 1987.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C. and GRUTZNER, M. Does the excitatory amino-acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, 90: 166-169, 1986.

SUPPLISSON, S. and BERGMAN, C. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in xenopus oocytes. **The Journal of Neuroscience**, 17(12): 4580-4590, 1997.

SWANSON, L.M. Brain maps: structur of the brain. **Elsevier**, 1992.

THIELS, E; WEISZ, D.J.; BERGER, T.W. In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation by the glycine modulatory site. **Neuroscience**, 46: 501-509, 1992.

THOMPSON, R.H.; CANTERAS, N.S. and SWANSON, L.W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-1 study in the rat. **J. Comp. Neurol**, 376(1): 143-173, 1996.

THOMSON, A.M. Glycine is a coagonist at the NMDA receptor/channel complex. **Progress in Neurobiology**, 35: 53-74, 1990.

TREIT, D., MENARD, J. and ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 44: 463-469, 1993.

TRULLAS, R.; JACKSON, B. and SKOLNICK, P. Anxiolytic properties of l-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand

at strychnine insensitive glycine receptors. **Pharmacol. Biochem. Behavior.**, 34: 313-316, 1989.

VAN ERP, A.M.M.; KRUK, M.R., MEELIS, W.; VEENING, J.G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming induced electrically. **Behavioral Brain Research**, 59: 95-101, 1993.

VASAR, E.; PEURANEN, E.; OPOK, T. and MANNISTO, P.T. Ondansetron, an antagonist of 5-HT₃ receptors, antagonises the anti-exploratory effect of caerulein, an agonist of CCK receptors, in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, 110: 213-218, 1993.

WATKINS, J.C. and EVANS, R.H. Excitatory amino acid transmitter. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 21: 165-204, 1981.

WILCOX, K.S.; FITZSIMONDS, R.M.; JOHNSON, B. and DICHTER, M.A. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. **J. Neurophysiol**, 76(5): 3415-3424, 1996.

WOOD, P.L.; EMMETT, M.R.; RAO, T.S.; MICK, S.; CLER, J. and IYENGAR, S. In vivo modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidenced by increased cerebellar cyclic GMP. **J. Neurochem.**, 53: 979-981, 1989.

ZHANG, S.P.; BANDLER, R. and CARRIVE, P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subpretectal midbrain periaqueductal gray of the cat. **Brain Res.**, 500: 73-82, 1990.