

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

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS PRODUZIDOS PELA MICROINJEÇÃO DE
COMPOSTOS COM AÇÃO NO SÍTIO GLY-B/ NMDA DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS AVALIADOS NO
LABIRINTO EM T-ELEVADO**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Patrícia Santos

Florianópolis - SC

2002

**“EFEITOS COMPORTAMENTAIS PRODUZIDOS PELA
MICROINJEÇÃO DE COMPOSTOS COM AÇÃO NO SÍTIO
GLY-B/NMDA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUCTAL DORSAL DE RATOS AVALIADOS NO
LABIRINTO EM T- ELEVADO”**

POR

PATRÍCIA SANTOS

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

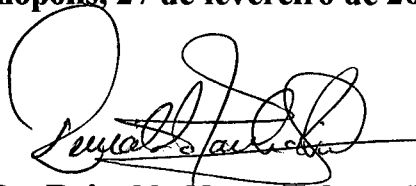
**Antônio de Pádua Carobrez
Orientador – PGFMC – UFSC**

**Hélio Zangrossi Junior
Depto. de Farmacologia – FMRP - USP**

**Luiz Carlos Schenberg
Depto. de Ciências Fisiológicas - UFES**

**Thereza C. M. de Lima Nogueira
PGFMC - UFSC**

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2002.



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa**

SANTOS, Patrícia. Efeitos Comportamentais Produzidos Pela Microinjeção de Compostos Com Ação No Sítio GLY-B/NMDA Da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal De Ratos Avaliados No Labirinto Em T-Elevado. Florianópolis, 2002. 85 f. Dissertação de Mestrado em Farmacologia – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Defesa: 27/02/2002

A participação do sítio receptor GLY-B/NMDA da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) na modulação de respostas comportamentais aversivas foi avaliada em ratos submetidos ao Labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal de ansiedade e memória. A microinjeção de compostos agonistas deste sítio (glicina – GLY ou D-serina – D-SER), na SCPd, facilitaram a aquisição de respostas de esquiva inibitória aos braços abertos do LTE, demonstrando um resultado ansiogênico; o ácido 7-cloro-quinurênico (7CK), antagonista deste sítio receptor, causou prejuízo na aquisição e retenção de respostas de EI, demonstrando um efeito ansiolítico, e a associação de 7CK + GLY aboliu os efeitos causados por ambos compostos quando microinjetados individualmente. Os resultados demonstram uma seletividade dos efeitos destes compostos na SCPd para o sítio receptor GLY-B/NMDA, bem como corroboram estudos anteriores indicando um papel deste sítio receptor na SCPd na modulação do comportamento defensivo e possivelmente ansiedade.

Dedico este trabalho a Deus que me deu forças para encontrar e seguir este longo caminho; a minha mãe e minha avó, cujo apoio e incentivo têm sido indispensáveis e incomensuráveis, e, por fim, à minha paixão pela busca e compreensão dos enigmas da ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela orientação, colaboração para minha formação científica e amizade.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pela contribuição à minha formação científica.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, pelos anos de convivência, companheirismo e amizade; e por tudo o que tive a oportunidade de aprender com cada um.

Ao professor Dr. Moacir Serralvo Faria, por ter sido o meu primeiro incentivador na carreira científica e pela grande amizade.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, amigos e funcionários do Departamento de Farmacologia.

A minha família, meus amigos, e ao Arthur, por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me, e pela compreensão pelos muitos momentos de ausência.

A todos os meus amigos do curso de pós-graduação em Farmacologia, especialmente a Vânia M. M. Ferreira e Edmar Myioshi, pela força e ajuda constantes, companheirismo e amizade.

“Se nunca abandonas o que é importante para ti, se te importas tanto a ponto de estares disposto a lutar para obtê-lo, asseguro-te que tua vida estará plena de êxito. Será uma vida dura, porque a excelência não é fácil, mas valerá a pena.”

Richard Bach

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP).....	3
1.1.1. Subdivisão Anatômica da SCP.....	4
1.1.2. Conexões da SCP.....	6
1.1.3. Funções da SCP.....	7
1.1.4. Principais Neurotransmissores/Neuromoduladores da SCP.....	11
1.2. Aminoácidos Excitatórios (AAE) na SCP.....	14
1.2.1. Receptores Glutamatérgicos.....	16
1.2.2. Receptores NMDA.....	17
1.2.3. Sítio de Ligação da Glicina no receptor NMDA.....	18
1.3. Papel Funcional dos Receptores NMDA no SNC.....	21
1.3.1. Receptores NMDA e Comportamento Defensivo.....	22
1.4. Labirinto em T Elevado (LTE).....	23
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Cirurgia Estereotáxica.....	27

3.3. Cânulas.....	28
3.4. Microinjeção Intracerebral.....	29
3.5. Drogas e Soluções.....	29
3.6. Dispositivo para registro comportamental: LTE.....	30
3.7. Protocolo Experimental.....	30
3.7.1. Aquisição de Esquiva Inibitória (EI) no LTE.....	31
3.7.2. Retenção de EI no LTE.....	33
3.8. Análise Estatística.....	34
3.8.1. Padrão de EI nas 3 primeiras exposições ao LTE.....	34
3.8.2. Padrão de Aprendizado da EI no LTE.....	34
3.8.3. Retenção da resposta de EI no LTE.....	35
3.9. Histologia.....	35
4. RESULTADOS	
4.1. Efeitos da microinjeção de glicina (GLY) na SCPd.....	37
4.2. Efeitos da microinjeção de D-serina (D-SER) na SCPd.....	41
4.3. Efeitos da microinjeção de ácido 7-cloro-quinurênico (7CK) ou 7CK + GLY na SCPd de ratos submetidos ao LTE.....	45
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	- 5-hidroxi-triptamina ou serotonina
7-CK	- Ácido 7-cloro-quinurênico
AAE	- Aminoácidos excitatórios
ACh	- Acetilcolina
AM	- Amígdala
AMPA	- Ácido 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AR	- Avaliação de risco
ASP	- Aspartato
ChAT	- Colina acetiltransferase
CO	- Monóxido de carbono
CS	- Colículo superior
DA	- Doença de Alzheimer
D-SER	- D-serina
DZP	- Diazepam
EI	- Esquiva inibitória
GABA	- Ácido γ -amino-butírico
GAD	- Glutamato descarboxilase
GDEE	- Dietil-ester do ácido glutâmico
GLU	- Glutamato
GLY	- Glicina
H	- Hipotálamo

HM	- Hipotálamo medial
KAIN	- Cainato
LAM	- Labirinto aquático de Morris
LCE	- Labirinto em cruz elevado
LQ	- Líquido cérebro-espinhal artificial ou Líquor
LTE	- Labirinto em T elevado
LTP	- Potenciação a longo prazo
NDR	- Núcleo dorsal da rafe
NMDA	- N-metil-D-aspartato
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
SCA	- Sistema cerebral aversivo
SCP	- Substância cinzenta periaquedutal
SCPd	- Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCPdl	- Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral
SIC	- Sistema de inibição comportamental
SNC	- Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das subdivisões da SCP.....	5
Figura 2 – Localização dos sítios de microinjeção de drogas na SCPd.....	36
Figura 3 - Efeito ansiogênico da glicina (GLY) aplicada na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE).....	37
Figura 4 – (A) Efeito da microinjeção de glicina (GLY) na SCPd sobre a aquisição de esquiva inibitória em ratos submetidos ao LTE. (B) Efeito da microinjeção de GLY na SCPd sobre o comportamento de avaliação de risco em ratos submetidos ao LTE.....	39
Figura 5 – (A) Efeito da microinjeção de glicina (GLY) na SCPd sobre a latência de esquiva inibitória na sessão teste em ratos submetidos ao LTE. (B) Efeito da microinjeção de GLY na SCPd sobre o comportamento de avaliação de risco na sessão teste em ratos submetidos ao LTE.....	40
Figura 6 - Efeito ansiogênico da D-serina (D-SER) aplicada na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE).....	41
Figura 7 - (A) Efeito da microinjeção de D-serina (D-SER) na SCPd sobre a aquisição de esquiva inibitória em ratos submetidos ao LTE. (B) Efeito da microinjeção de D-SER na SCPd sobre o comportamento de avaliação de risco em ratos submetidos ao LTE.....	43

Figura 8 - (A) Efeito da microinjeção de D-serina (D-SER) na SCPd sobre a latência de esquiiva inibitória na sessão teste em ratos submetidos ao LTE. (B) Efeito da microinjeção de D-SER na SCPd sobre o comportamento de avaliação de risco na sessão teste em ratos submetidos ao LTE.....44

Figura 9 – Antagonismo do efeito ansiogênico da glicina (GLY) pelo ácido 7-cloro-quinurênico (7CK) aplicados na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE).....46

Figura 10 - (A) Efeito da microinjeção de glicina (GLY), ácido 7-cloro-quinurênico (7CK) ou 7CK + GLY na SCPd sobre a aquisição de esquiiva inibitória em ratos submetidos ao LTE. (B) Efeito da microinjeção de GLY, 7CK ou 7CK + GLY na SCPd sobre o comportamento de avaliação de risco em ratos submetidos ao LTE.....47

Figura 11 - (A) Antagonismo da glicina (GLY) sobre os efeitos do ácido 7-cloro-quinurênico (7CK) microinjetados na SCPd sobre a latência de esquiiva inibitória na sessão teste em ratos submetidos ao LTE. (B) Efeito da microinjeção de GLY, 7CK ou 7CK + GLY na SCPd sobre o comportamento de avaliação de risco na sessão teste em ratos submetidos ao LTE.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Possíveis sítios para a ação de drogas no receptor NMDA.....	18
---	----

RESUMO

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é considerada um substrato neural essencial para a integração de respostas a estímulos estressantes ou ameaçadores e há muitas evidências implicando esta região no comportamento defensivo e na ansiedade. A porção dorsal da SCP (SCPd) é considerada o principal local dos mecanismos executivos da reação defensiva.

A glicina (GLY) possui um sítio de ligação no receptor NMDA (sítio GLY-B/NMDA), agindo como um co-agonista essencial para a sua ativação. Existem evidências na literatura demonstrando um papel do sítio GLY-B/NMDA na SCPd na modulação do comportamento defensivo. Este trabalho objetivou verificar um possível efeito ansiolítico e sobre o aprendizado e retenção da resposta de esquila inibitória (EI) causado pela microinjeção (0.3 µl) de compostos com ação no sítio GLY-B/NMDA na SCPd de ratos avaliados no labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal de ansiedade e memória.

Utilizou-se ratos Wistar machos de 4 meses de idade, implantados estereotaxicamente com uma cânula guia direcionada à SCPd (Bregma: - 7.6 mm). As drogas utilizadas foram a glicina (GLY) e a D-serina (D-SER), agonistas do sítio GLY-B/NMDA, e o ácido 7-cloro-quinurênico (7CK), um antagonista seletivo deste sítio receptor.

No LTE, uma resposta de EI aos braços abertos é obtida após sucessivas exposições do animal ao labirinto. Os principais parâmetros observados no LTE foram as latências de EI aos braços abertos, o número de sessões necessárias para atingir o critério de EI (permanência do animal por 300 s no interior do braço fechado), o tempo para atingir o critério de EI, a medida de avaliação de risco (AR); e a latência de saída para os braços abertos e a AR na sessão de retenção de EI (após 72 horas).

Os resultados demonstraram que a GLY (1, 10, 80 ou 120 ηmol) microinjetada na SCPd aumentou as latências de EI e diminuiu o número de sessões necessárias para atingir o critério de EI na sessão de aquisição de EI, o que sugere um efeito ansiolítico e facilitatório do aprendizado de EI. A D-SER (160 ou 320 ηmol) demonstrou o mesmo perfil de ações da GLY, indicando que esta ação é consequência da ativação do sítio GLY-

B/NMDA. O 7CK (8 η mol) aumentou o número de sessões e o tempo total necessário para o aprendizado de EI, demonstrando um prejuízo no aprendizado de EI; e na sessão de retenção diminui a latência de saída para os braços abertos, o que indica um prejuízo na retenção da resposta de EI. Quando administrados em associação, os efeitos individuais da GLY (120 η mol) e do 7CK (8 η mol) na SCPd foram abolidos, o que indica seletividade farmacológica para os efeitos destes compostos no sítio receptor GLY-B/NMDA.

Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos demonstrando que compostos ansiogênicos têm um efeito facilitatório para o aprendizado da resposta de EI no LTE, enquanto compostos ansiolíticos causam um prejuízo nesta tarefa. Adicionalmente, agonistas do sítio GLY-B/NMDA têm demonstrado efeitos ansiogênicos na SCPd de ratos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto os antagonistas têm demonstrado efeitos ansiolíticos.

Enfim, nossos resultados indicam uma participação do sítio GLY-B/NMDA da SCPd na modulação da aquisição de EI no LTE e sua expressão posterior (retenção da resposta de EI), bem como reforçam o papel deste sítio receptor da SCPd na modulação do comportamento defensivo e, possivelmente, da ansiedade.

ABSTRACT

Several lines of evidence indicates that the midbrain periaqueductal gray matter (PAG) is an essential neural substrate for the integration of an organism's responses to threatening or stressful stimuli, and implicates this region in defensive and anxiety-like behavior. The dorsal part of the periaqueductal gray matter (dPAG) is supposed to be the main site for the executive mechanisms of the defense reaction.

Glycine (GLY) acts as an essential coagonist at the NMDA receptor binding to the GLY-B/NMDA site. There are some evidences showing a role of the GLY-B/NMDA receptor at SCPd in the modulation of defensive behavior. The present work was set up to verify a possible anxiolytic effect, as well as the effects on the inhibitory avoidance (IA) learning and retention, caused by compounds acting on the GLY-B/NMDA receptor within the dPAG of rats evaluated in the elevated T maze (ETM), an animal model of anxiety and memory.

Male Wistar 4 months old rats were implanted stereotaxically with a guide cannula aimed to the dPAG (Bregma: - 7.6 mm), and drugs were microinjected into dPAG (glycine (GLY), D-serine (D-SER) - GLY-B/NMDA receptor agonists; or 7-chloro-kynurenic acid (7CK) - GLY-B/NMDA receptor selective antagonist).

In the ETM, an IA response is obtained after successive exposures of the rat to the ETM and measurements of time spent on the enclosed arm; the retention of this response can be estimated by retesting later. The performance of rats was assessed through data collected with the latencies to leave the enclosed arm of the maze in the 3 first sessions of exposure, the total number of trials to reach the criterion of staying continuously for 300 s inside the enclosed arm (IA criterion), the total time necessary to reach the IA criterion, and the risk assessment behavior (RA) measure (number of tries to leave the enclosed arm of the maze/ minute); and in the test session (72 hours later) the latency to leave the enclosed arm and the RA. Selective alterations in the latencies to leave the enclosed arm of the maze, in the number of trials to reach the IA criterion, and in the total time necessary to reach this criterion, in the training session, were the indexes of anxiety and IA learning. The latency to leave the enclosed arm in the test session (test latency) was an index of memory retrieval.

Our results showed that GLY (1, 10, 80 or 120 η mol; 0.3 μ l) microinjected within the dPAG improved the IA acquisition, by increasing the avoidance latencies and reducing the number of trials to reach the IA criterion in the training session, which suggests an anxiogenic effect and a facilitatory effect on learning. D-SER (160 or 320 η mol) showed the same profile of actions, indicating that this action is consequent of the activation of the GLY-B site at the NMDA receptor. 7CK (8 η mol, 0.3 μ l) impaired the IA learning, and reduced the test latency suggesting an impairment in the IA response retention. When administered together, the individual effects of GLY (120 η mol) and 7-Cl-Kyn (8 η mol) into dPAG were abolished, what indicates pharmacological selectivity for the effects of these compounds on GLY-B/NMDA receptor.

These results are in agreement with previous findings showing that anxiogenic compounds have a facilitatory effect on IA learning in the ETM, while anxiolytic compounds cause an impairment in such task. In addition, studies using agonists of the GLY-B/NMDA receptor have shown anxiogenic-like effects when microinjected within the dPAG of rats submitted to the elevated plus maze (EPM), an animal model of anxiety, while antagonists of the same site have shown anxiolytic-like effects.

In summary, our results showed that compounds acting at the GLY-B site on the NMDA receptor at the dPAG are able to alter the animal's performance in the ETM task, indicating a participation of this site in the modulation of the acquisition of IA in the ETM and its expression later, as well as reinforced the role of the NMDA/GLY-B receptor at dPAG in the modulation of defensive behavior and possibly of anxiety and emotional memory.

1. INTRODUÇÃO

De uma perspectiva evolutiva, as bases neurais dos estados de ansiedade teriam relação com os mecanismos reguladores do comportamento de defesa dos animais diante de estímulos ameaçadores ou em situações de perigo (Panksepp, 1990). Portanto, os estudos com animais utilizando lesão, estimulação elétrica ou química do sistema nervoso central (SNC) contribuíram enormemente para a identificação de algumas estruturas e sistemas neurais envolvidos com a ansiedade (Hetem & Graeff, 1997).

O sistema de inibição comportamental (SIC), proposto por Gray (1982, 1987), e o sistema cerebral aversivo (SCA) proposto por Graeff (1981), foram tentativas de ordenar os resultados disponíveis sobre as bases neuroanatômicas dos comportamentos de defesa. O substrato neural do SIC seria composto pela formação septo-hipocampal, reunida ao circuito de Papez (corpo mamilar do hipotálamo, tálamo anteroventral e córtex do giro do cíngulo), ao córtex pré-frontal, e às vias noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas ascendentes que inervam estas estruturas do prosencéfalo. A ansiedade seria desencadeada pela ativação do SIC, por estímulos específicos como sinais condicionados de punição, sinais condicionados de frustração, estímulos ou situações novas e sinais de perigo espécie-específicos (Gray, apud Hetem & Graeff, 1997, p. 156). Após a ativação deste sistema ocorreria a inibição de qualquer comportamento que o animal estivesse realizando, aumento do nível de vigilância e preparo para uma ação física vigorosa; alterações semelhantes às observadas em estados de ansiedade persistente. As drogas ansiolíticas prejudicariam o funcionamento do SIC (Gray, apud Hetem & Graeff, 1997, p. 156). Com relação ao SCA, verificou-se que a estimulação elétrica de certas estruturas como a amígdala (AM), a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e o hipotálamo medial (HM) desencadeava

comportamentos defensivos, associados a mudanças neurovegetativas semelhantes ao comportamento espécie-específico ocorrido em situações ameaçadoras naturais (Hetem & Graeff, 1997). Este fenômeno parece estar relacionado a um estado emocional aversivo em animais e em humanos, os quais relataram sentimentos de medo intenso ou pânico, acompanhados de alterações neurovegetativas (enrubescimento da face e pescoço, piloereção, sudorese, alterações respiratórias e aumento da frequência cardíaca), quando estimulados nestas áreas cerebrais durante procedimento neurocirúrgico (Nashold *et al.*, 1974).

A AM, o HM e a SCP são os principais componentes do SCA, o qual é organizado longitudinalmente e é responsável pela elaboração das manifestações psicológicas, comportamentais e fisiológicas de estados motivacionais aversivos (Graeff, 1981, 1984, 1988, 1990). O SCA possui uma estrutura organizada hierarquicamente; a AM funcionaria como uma interface sensorial-emocional, pois tem conexões com o neocórtex, bem como com estruturas mais profundas relacionadas à emoção (estruturas límbicas), e adicionaria um sentido afetivo às informações vindas do meio externo através de áreas associativas do neocórtex, transmitindo as informações para o hipotálamo (H) e a SCP, que por sua vez selecionariam e organizariam as reações defensivas mais apropriadas. O fato de que lesões na AM ou H não abolem as reações de defesa geradas na SCP, enquanto que a destruição da SCP inibe o efeito comportamental da estimulação da AM ou H, faz com que a SCP seja considerada como a via final comum de defesa, pois esta é a estrutura mais caudal do SNC cuja estimulação elétrica provoca um padrão completo de agressão defensiva (Hetem & Graeff, 1997). Segundo Pratt (1992), a região dorsal da SCP (SCPd), que compreende as subdivisões neuroanatômicas dorsomedial e dorsolateral (Bandler *et al.*, 1991), é

classicamente considerada uma estrutura cerebral aversiva. Esta região vem sendo estudada em nosso laboratório e será a área cerebral investigada no presente trabalho.

1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)

A SCP é uma estrutura medial do tronco cerebral, que circunda o aqueduto mesencefálico (aqueduto de Sylvius) e se estende, no eixo rostrocaudal, da comissura posterior ao pólo rostral do *locus coeruleus*.

Estudos citoarquitetônicos demonstraram que a SCP de ratos é formada por pequenos neurônios, reunidos densamente, circundando o aqueduto cerebral. Em ratos adultos a SCP tem a forma aproximada de um funil, com sua base localizada caudalmente e o ápice rostralmente (Beitz, 1995). Nesta estrutura, há um aumento da intensidade de coloração e da densidade celular da parte central para a periferia, bem como na periferia há um aumento da densidade celular da porção ventral para a dorsal (Beitz, 1985; Mantyh, 1982). Há muitos esquemas para a classificação dos tipos celulares na SCP, e a classificação mais simples foi proposta no início deste século por Ramón y Cajal (1911). Basicamente, Cajal dividiu os neurônios da SCP em três tipos: células fusiformes, piramidais e estreladas. Este esquema foi posteriormente confirmado e os tipos celulares subdivididos em variedades pequenas e grandes (Beitz & Shepard, 1985). Os neurônios fusiformes pequenos (bipolares) formam a maior parte da população neuronal da SCP (36.8%) e são mais proeminentes na subdivisão medial, enquanto os neurônios fusiformes grandes formam uma parte menor da população neuronal e são mais prevalentes na subdivisão dorsal (subdivisões descritas no item 1.1.1.). Para os outros dois tipos neuronais não foi descrita uma localização preferencial nas subdivisões da SCP. Uma característica geral dos neurônios da SCP é o fato de eles possuírem um número menor de processos dendríticos quando comparados a

neurônios encontrados em outras regiões cerebrais (Beitz & Shepard, 1985). Não foi possível ainda estabelecer uma relação entre a morfologia celular na SCP e aspectos funcionais, pois as tentativas neste sentido têm tido pouco sucesso (Beitz, 1995).

1.1.1. Subdivisão anatômica da SCP

A maior parte dos trabalhos realizados nos anos 80 e início da década de 90, tem fornecido evidências consistentes da existência de quatro subdivisões dentro da SCP: medial, dorsal, dorsolateral e ventrolateral (Beitz, 1982, 1985; Conti *et al.*, 1988; Gundlach, 1991; Meller & Dennis, 1986, 1990). Apesar de os primeiros estudos fisiológicos e comportamentais terem sugerido que certas funções eram associadas a subdivisões anatômicas específicas na SCP (Beitz & Shepard, 1985), resultados obtidos posteriormente sugeriram que muitos aferentes e funções da SCP estão organizados em colunas longitudinais dispostas ao longo do eixo rostrocaudal da SCP (Bandler *et al.*, 1991; Onstott *et al.*, 1993). Quatro colunas longitudinais na SCP foram propostas por Bandler e colaboradores (1991): colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. Uma quinta coluna foi ainda proposta por Onstott e colaboradores (1993), a coluna justa-aquedutal. Após a proposição destas duas classificações anatômicas ocorreu a questão sobre qual esquema estaria correto. A coluna dorsomedial proposta por Bandler e colaboradores (1991) é quase idêntica à subdivisão dorsal descrita por outros pesquisadores (Beitz, 1985; Conti *et al.*, 1988); a coluna justa-aquedutal é homóloga à subdivisão medial; a coluna dorsolateral é completamente similar à subdivisão dorsolateral; e a subdivisão ventrolateral contém as colunas neuronais lateral e ventrolateral, propostas por Bandler e colaboradores (1991), pelo menos na parte caudal da SCP.

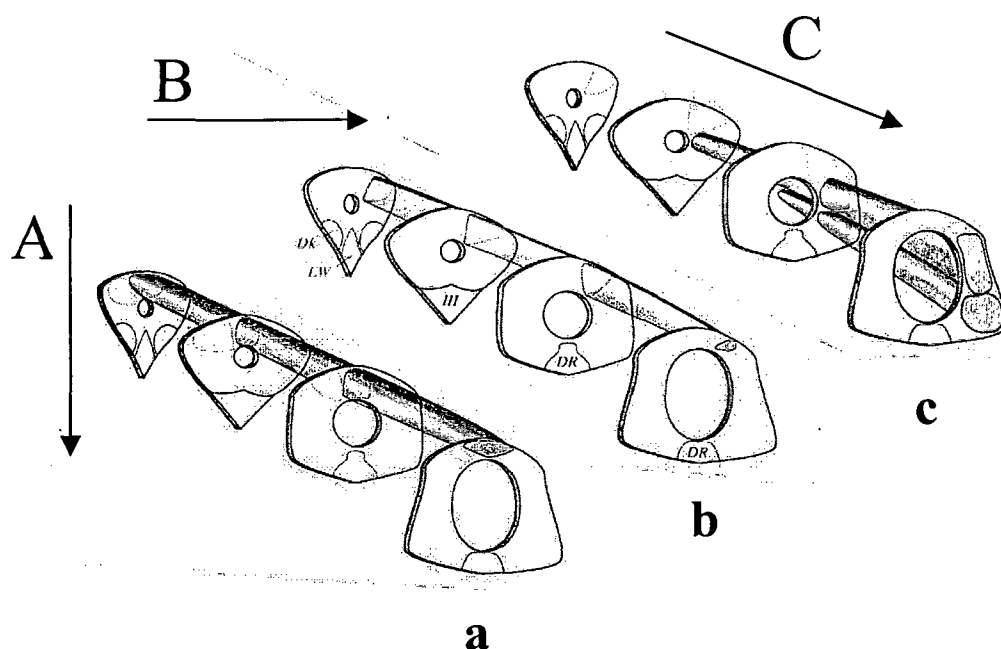


Figura 1 – Representação esquemática das subdivisões anatômicas da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP). (A) Extensão dorsoventral, (B) extensão mediolateral, (C) extensão rostrocaudal. a) Subdivisão dorsomedial, b) subdivisão dorsolateral, c) subdivisões lateral (acima) e ventrolateral (abaixo). A SCP dorsal (SCPd) compreende as subdivisões dorsomedial (a) e dorsolateral (b) da SCP.

* Adaptado de Bandler *et al.*, 1991.

Em estudos de pacientes com doença de Alzheimer (DA) observou-se que o tipo e a densidade de mudanças patológicas ocorridas são expressas diferentemente em diferentes regiões da SCP e correlacionadas com o sexo do paciente e duração da doença. O padrão compartimentalizado das mudanças na SCP ocorridas na DA revelam pela primeira vez a organização colunar da SCP em humanos (Parvizi *et al.*, 2000).

1.1.2. Conexões da SCP

A SCP possui aferentes originados em todos os níveis do sistema nervoso central (SNC), o que é consistente com seu papel na integração de muitas funções importantes para a sobrevivência do organismo (Beitz, 1995). A maior fonte de projeções aferentes para a SCP origina-se no prosencéfalo e diencéfalo, e um menor número tem origem no tronco cerebral e medula espinhal (Bandler & McCulloch, 1984; Beitz, 1982; Marchand & Hagino, 1983; Meller & Dennis, 1986; Shipley *et al.*, 1991; Veening *et al.*, 1991). O hipotálamo (núcleos pré-óptico, ventromedial, dorsal e pré-mamilar dorsal; e áreas anterior e lateral) fornece a maior fonte de aferentes da SCP, os quais são organizados topograficamente em colunas longitudinais sobrepostas (Veening *et al.*, 1991). Esta organização topográfica das vias hipotalâmicas para a SCP dá um suporte adicional à subdivisão colunar, e fornece uma evidência útil para a consideração das relações funcionais entre essas duas estruturas. Tradicionalmente, a SCP tem sido considerada distante de influências corticais e cognitivas diretas, porém estudos realizados por Shipley e colaboradores (1991) demonstraram uma quantidade significativa de aferentes corticais para a SCP. Os neurônios corticais que se projetam para a SCP foram localizados no córtex contínuo medial (infralímbico, pré-límbico, cíngulo anterior e pré-frontal medial) e lateral (insular anterior e posterior, perirrinal), chamadas áreas corticais límbicas (Shipley *et al.*, 1991; Bandler & Shipley, 1994). Estas áreas fornecem bases para a avaliação do significado emocional do meio ambiente. Surpreendentemente, cada área cortical projeta-se densa e focalmente terminando em aferentes em uma ou duas colunas dentro de uma extensão limitada do eixo rostrocaudal da SCP. Através dessas projeções específicas os campos corticais específicos poderiam modular ou regular as funções somáticas, autonômicas e anti-nociceptivas coordenadas por colunas individuais ou múltiplas da SCP

(Bandler & Keay, 1996). Outras fontes de aferentes da SCP são a AM, zona incerta, colículo superior, colículo inferior, núcleo cuneiforme, núcleos dorsal e magno da rafe, núcleo parabraquial, núcleo pontino reticular, *locus coeruleus*, cerebelo e núcleo trigeminal espinhal (Beitz, 1995). Também merece destaque o fato de que a SCP possui um grande número de conexões intrínsecas (Beitz, 1982; Tredici *et al.*, 1983), que podem interconectar as várias subdivisões e colunas longitudinais (Sandkuhler, 1991).

Com relação aos eferentes da SCP, estes parecem ser um reflexo dos aferentes desta região, logo a SCP está reciprocamente ligada a grande parte das regiões cerebrais (Beitz, 1995). Os eferentes ascendentes da SCP, em ratos, projetam-se para os campos de Forel, zona incerta, septo lateral, núcleo acumbens, tubérculo olfatório, córtex frontal, núcleos mediano e intralaminar do tálamo e vários núcleos hipotalâmicos (Eberhart *et al.*, 1985). As projeções descendentes da SCP incluem os núcleos cuneiforme, tegmental pedunculopontino, dorsal da rafe, mesencefálico profundo, tegmental ventral, *subcoeruleus*, núcleo intersticial do fascículo longitudinal medial, núcleo pontino reticular, bem como o bulbo ventromedial, incluindo os núcleos gigantocelular reticular pars alfa, paragigantocelular lateral e magno da rafe (Beitz *et al.*, 1988).

1.1.3. Funções da SCP

Como citado anteriormente, a SCP está interconectada com várias regiões cerebrais, o que permite a esta estrutura influenciar, bem como ser influenciada por estruturas sensoriais, motoras, autonômicas e límbicas. Tem sido proposto que esta interconectividade diversa da SCP esteja envolvida com a função integrativa desta estrutura na mediação da resposta dos animais a estímulos ameaçadores (Bandler & Depaulis, 1991; Bandler *et al.*, 1991; Beitz, 1995; Shipley *et al.*, 1991). Esta estrutura está envolvida em

mecanismos analgésicos, regulação das funções autonômicas, vocalização, comportamento de lordose em fêmeas, controle do movimento dos olhos, armazenamento de informação e regulação de reações relacionadas à raiva, medo, ansiedade e comportamento defensivo (Bandler & DePaulis, 1991; Beitz, 1995; Fanselow, 1991). A analgesia e as reações comportamentais e autonômicas evocadas a partir da SCP podem ser melhor compreendidas como respostas coordenadas necessárias à sobrevivência do animal (Bandler *et al.*, 1991; Shypley *et al.*, 1991).

As primeiras indicações do envolvimento da SCP no comportamento defensivo foram obtidas há cerca de seis décadas. Em 1943, Hess & Brügger observaram que a estimulação elétrica do hipotálamo perifornical era capaz de transformar um gato de comportamento normalmente calmo em um animal com comportamento altamente defensivo. Posteriormente, Hunsperger (1956) observou que a estimulação elétrica da região periaquedutal do mesencéfalo (SCP) e do tegmento mesencefálico adjacente de gatos não anestesiados evocava reações defensivas. Ao mesmo tempo, Eliasson (1954) e Lindgreen (1955, 1956) observaram que a estimulação elétrica do mesencéfalo de gatos anestesiados produzia alterações cardiovasculares. Em 1960, Abrahams e colaboradores confirmaram que estas reações cardiovasculares e comportamentais eram evocadas nas mesmas áreas mesencefálicas. Além disso, o fato de reações defensivas coordenadas obtidas após a estimulação elétrica do mesencéfalo, características da resposta do animal a estímulos ameaçadores, poderem ser obtidas mesmo em gatos decerebrados pré-colicularmente (Bard & Macht, 1958; Keller, 1932; Lindgren, 1955; Schramm & Bignal, 1971), após extensas lesões da AM ou do H (Fernandez DeMolina & Hunsperger, 1962; Kelly *et al.*, 1946), e após o isolamento cirúrgico do hipotálamo (Elisson & Flynn, 1968;

Gellen *et al.*, 1972), forneceram evidências para um papel integral do mesencéfalo na mediação do comportamento defensivo.

De maneira similar, observou-se que lesões extensas da região central do mesencéfalo eliminavam ou atenuavam reações defensivas desencadeadas por estímulos nociceptivos ou por estimulação elétrica do H ou da AM (Fernandez DeMolina & Hunsperger, 1962; Hunsperger, 1956; Skulkety, 1963). Estudos similares realizados em outras espécies, também deram suporte à visão de que a SCP era um substrato neural essencial das respostas a estímulos potencialmente estressantes ou ameaçadores (Bandler & Depaulis, 1991).

Apesar de os estudos utilizando estimulação elétrica terem determinado um papel importante para o estabelecimento da SCP na mediação do comportamento defensivo, sabe-se que esta técnica produz excitação tanto de corpos celulares quanto de axônios de passagem, logo, dificultando a localização exata das populações neuronais específicas que medeiam tais reações no mesencéfalo. Por outro lado, a técnica de microinjeção de aminoácidos excitatórios (AAE) é capaz de excitar seletivamente corpos celulares e seus processos dendríticos (Goodchild *et al.*, 1982; Lipski *et al.*, 1988). A técnica de microinjeção de AAE foi utilizada em uma série de estudos, onde foram localizadas as populações neuronais mediadoras das reações defensivas na SCP (Bandler, 1982; 1984; Bandler *et al.*, 1985; Hilton & Redfern, 1986; Krieger & Graeff, 1985).

A coluna lateral da SCP medeia estratégias comportamentais chamadas “reativas” (confronto com o perigo, fuga ou congelamento – *freezing*), caracterizada por reações emocionais fortes, hipertensão, taquicardia, e analgesia não-opiíide, que parecem particularmente apropriadas para lidar com situações ameaçadoras, ou que possam ser dolorosas, porém evitáveis; enquanto a coluna ventrolateral medeia estratégias mais passivas, caracterizadas por reações de responsividade ao meio ambiente reduzida

(hiporreatividade), hipotensão, bradicardia e analgesia mediada por opióides, talvez mais apropriadas para lidar com situações de estresse inescapável ou dor intensa e para facilitar a recuperação, uma vez finalizada a situação ameaçadora ou de estresse (Bandler & Keay, 1996).

A coluna dorsolateral da SCP (SCPdl) recebe aferências do *prepositus hypoglossi*, substância nigra *pars reticulata*, e do colículo superior, relacionadas à orientação espacial (Holstege & Cowie, 1990; Meller & Dennis, 1986); tem sido proposto que esta coluna da SCP auxilia no controle das respostas comportamentais apropriadas na exposição a novas condições do meio ambiente (Holstege & Cowie, 1990; Kaufman *et al.*, 1992). Bandler e colaboradores (2000) sugeriram que a SCPdl pode ser componente de um circuito de disparo de uma estratégia emocional ativa em resposta a estímulos estressantes psicológicos (por meio de projeções corticais). Foi demonstrado que a SCPdl participa também da modulação das respostas defensivas, através de vias dependentes do óxido nítrico (NO) (De Oliveira *et al.*, 2002; item 1.1.4.).

Em adição, nosso laboratório tem estudado os efeitos ansio-seletivos produzidos pela microinjeção de compostos agonistas e antagonistas do receptor NMDA na SCPd, que refere-se às subdivisões dorsomedial e dorsolateral desta estrutura, e os resultados obtidos indicam um perfil ansiogênico de agonistas deste receptor, bem como um perfil ansiolítico dos antagonistas (Schmitt *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1998; Teixeira & Carobrez, 1999).

Recentemente, foi demonstrado que a SCP de ratos pode efetivamente sofrer abrasamento (*kindling*) por estimulação elétrica (Omori *et al.*, 2001), e outros achados indicam que a aplicação de baixa frequência de estimulação na SCP pode reverter mudanças de comportamento induzidas pelo estresse de exposição ao predador (gato), o

que sustenta a idéia de que a potenciação a longo prazo (LTP) na SCP medeia aumentos na ansiedade mediados pelo estresse em ratos, como foi observado em gatos (Adamec, 2000).

Mesmo com todos os trabalhos já realizados, ainda torna-se necessário um melhor entendimento do papel que a SCP possui nas reações de defesa, bem como nas patologias que poderiam estar relacionadas à desregulação dos mecanismos de defesa, nos animais e no homem. A aplicação de compostos em áreas cerebrais envolvidas no comportamento defensivo, juntamente com a utilização de modelos experimentais apropriados, é uma ferramenta útil para um melhor entendimento do comportamento defensivo (Carobrez *et al.*, 2002).

1.1.4. Principais Neurotransmissores/ Neuromoduladores da SCP

Os principais tipos de moléculas com função na sinalização interneuronal na SCP são: adrenalina e noradrenalina, dopamina, histamina, serotonina (5-hidróxi-triptamina, 5-HT), acetilcolina (ACh), neuropeptídeos, óxido nítrico (NO), aminoácidos (tais como o ácido- γ -amino-butírico - GABA, glicina, glutamato, aspartato) e poliaminas (espermidina e espermina) (Beitz, 1995).

As aferências noradrenérgicas e adrenérgicas são proeminentes na SCP ventral; as fibras histaminérgicas também têm sido descritas na SCP e são igualmente prevalentes na porção ventral e as fibras serotoninérgicas são encontradas em toda a SCP (Beitz, 1995).

Quanto à ACh, a análise imunocitoquímica de colina acetiltransferase (ChAT, a enzima sintetizadora de ACh) evidenciou a presença de neurônios contendo ACh nas porções caudais da SCP lateral e ventral (Tago *et al.*, 1989). Em adição, estudos de ligação ao receptor (*binding*) demonstraram a presença de receptores colinérgicos muscarínicos nas

mesmas regiões onde há presença de ChAT e, em grande concentração, na SCPdl (Beitz *et al.*, 1982; Wamsley *et al.*, 1981). De um ponto de vista funcional, a Ach têm sido implicada em reações defensivas e de fuga produzidas nessa região (Carrive *et al.*, 1986).

A maior parte dos neuropeptídeos isolados e identificados tem localização na SCP. Entretanto, a maioria dos relatos dá ênfase à distribuição destes peptídeos no cérebro inteiro, não detalhando a distribuição em núcleos particulares, como nas subdivisões da SCP. Alguns neuropeptídeos com localização na SCP são: neurotensina, encefalina, substância P, somatostatina, galanina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), neuropeptídeo Y, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), LHRH (hormônio liberador de hormônio luteinizante) e ACTH (corticotrofina) (Beitz, 1995; Smith *et al.*, 1994).

O NO foi descrito pela primeira vez como um mensageiro entre neurônios em 1992, por Brecht & Snyder. Adicionalmente, outro gás simples, o CO, também tem sido mencionado como um candidato a neurotransmissor atípico (Snyder, 1992). Posteriormente, muitos dados na literatura indicaram que o NO satisfaz os principais critérios para ser um neurotransmissor (Beitz, 1995). O NO pode iniciar seus efeitos biológicos através da ação de uma enzima heterodimérica, a guanilato ciclase solúvel (GCs) ou através de diversas outras reações químicas. A ativação da GCs resulta na produção do 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), uma molécula que age como segundo mensageiro intracelular podendo mediar diversos processos fisiológicos através da interação com proteínas celulares (canais iônicos, proteínas quinases dependentes de GMPc e fosfodiesterases, por exemplo) (Hanafy *et al.*, 2001).

Devido ao fato de o NO ser um gás lábil, uma maior compreensão deste neurotransmissor nos sistemas neuronais foi possível através de estudos utilizando sua

enzima sintetizadora, a sintase do óxido nítrico (NOS). Na SCP, a NOS está concentrada na coluna dorsolateral (Onstott *et al.*, 1993). Os receptores de glutamato do tipo NMDA, também estão concentrados na SCPdl, e tem sido demonstrado que em várias áreas cerebrais a ativação deste receptor aumenta a atividade da NOS, o que resulta num aumento da produção de NO (Snyder, 1992). Também foi demonstrado que os neurônios imunorreativos para NOS, em todas as regiões cerebrais estudadas têm uma maior densidade de RNAm (mensageiro) para o receptor NMDA em comparação com neurônios que não apresentam imunoreatividade para a NOS (Price *et al.*, 1993). Isto indica que o glutamato agindo através da ativação do receptor NMDA pode ativar a liberação de NO na SCP, e levanta questões importantes acerca da relação do NO com o papel funcional da SCP. De acordo com esta proposição, foi demonstrado que o NO pode participar da modulação das respostas defensivas na SCPdl, através da microinjeção de inibidores da NOS e doadores de NO nesta região (De Oliveira *et al.*, 2002).

Os neurônios contendo GABA, principal neurotransmissor inibitório cerebral, localizados através de análise imunocitoquímica para GABA, ou sua enzima sintetizadora, GAD (descarboxilase do ácido glutâmico), estão presentes em toda a extensão rostrocaudal da SCP (Barbaresi & Manfrini, 1988; Williams & Beitz, 1990), no entanto, rostralmente eles estão mais concentrados nas porções ventral e dorsolateral da SCP. O GABA inibe a atividade espontânea na maioria dos neurônios da SCP *in vivo* e *in vitro* (Behbehani, 1990). Portanto, o GABA têm sido implicado na modulação e execução da maioria das funções da SCP (Beitz, 1995).

Os AAE glutamato (GLU) e aspartato (ASP) estão presentes em neurônios e terminais em toda a SCP, sendo ambos liberados de vias eferentes seletivas da SCP. Os sítios de ligação para os AAE estão mais concentrados na subdivisão dorsolateral da SCP

em toda a sua extensão rostrocaudal e também estão relativamente concentrados ventralmente nos níveis mais caudais desta estrutura. Do mesmo modo, os receptores NMDA estão presentes em maior densidade na subdivisão dorsolateral, assim como a enzima NOS (Albin *et al.*, 1990; Beitz, 1995). Os AAE têm sido implicados em muitas funções da SCP como a analgesia (Beitz & Williams, 1991) e o comportamento defensivo (Bandler & DePaulis, 1991; Beitz & Williams, 1991; Jürgens & Richter, 1986).

1.2. Aminoácidos Excitatórios (AAE) na SCP

A maior parte das sinapses no SNC parece utilizar AAE como seus neurotransmissores (Cotman *et al.*, 1987; Monaghan *et al.*, 1989; Watkins *et al.*, 1990). Curtis e colaboradores (1959, 1960) obtiveram as primeiras evidências acerca da ação excitatória neuronal do glutamato (GLU) e aspartato (ASP). Porém, somente a partir da década de 70 o GLU e o ASP têm sido considerados seriamente como neurotransmissores excitatórios no SNC (Balcar & Jonhston, 1975; Beitz & Williams, 1991; Naito & Ueda, 1985; Roseth *et al.*, 1995). Têm sido demonstrado que o GLU e o ASP preenchem os critérios para neurotransmissores: liberação dependente de Ca^{2+} após estimulação, captação de alta afinidade nos terminais nervosos, presença destes aminoácidos nos terminais nervosos, bem como de suas enzimas biossintéticas, bloqueio da transmissão sináptica por antagonistas dos AAE e identidade de ação (Cotman *et al.*, 1987; Fonnum, 1984; Nicholls, 1989; Watkins & Evans, 1981).

A primeira evidência de que o glutamato poderia ter um papel na SCP baseia-se nos resultados obtidos por Sherman & Gebhart (1975) demonstrando que os níveis de GLU na SCP eram reduzidos significativamente pela dor, enquanto a administração sistêmica de

morfina induzia um efeito contrário. Apesar de naquela época não ter ficado claro se tais mudanças refletiam alterações nos níveis de GLU enquanto neurotransmissor ou metabólito, estes resultados sugeriram que as modificações neuroquímicas observadas na SCP estariam relacionadas ao papel da SCP na analgesia produzida pela morfina. Posteriormente, foi demonstrado que microinjeções de GLU na SCP de ratos produzia analgesia, provavelmente pela ação em receptores de AAE nesta região (Behbehani & Fields, 1979).

Resultados obtidos utilizando microinjeção de GLU ou ASP na SCP demonstraram que os AAE eram capazes de produzir também reações defensivas imediatas em ratos e gatos (Bandler, 1982; Bandler *et al.*, 1985; Bandler & Depaulis, 1991) e vocalização em macacos (Jürgen & Richter, 1986). Em 1985, Krieger & 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 & colaboradores (1988) demonstraram que os efeitos resultantes da microinjeção de GLU, na SCPd eram mediados por receptores de AAE específicos. A microinjeção de dietil-éster do ácido glutâmico (GDEE), um antagonista glutamatérgico, no mesmo sítio (SCPd) bloqueou as respostas comportamentais e neurovegetativas induzidas pelo GLU. Também foi demonstrado que as respostas evocadas pela estimulação elétrica da SCPd e do hipotálamo dorsomedial eram abolidas pela microinjeção de GDEE na SCPd, sendo essa a primeira evidência de uma projeção hipotalâmica glutamatérgica para a SCP, sugerindo que os AAE endógenos (GLU e ASP, principalmente) atuam como mediadores fisiológicos nos mecanismos da reação de defesa presentes na SCPd (Graeff *et al.*, 1988; Carobrez *et al.*, 2002).

Os estudos de ligação *in vitro* (*binding*) que demonstraram altos níveis de receptores para AAE na SCP (Cotman *et al.*, 1987; Greenamyre *et al.*, 1984; Halpain *et al.*, 1984). Adicionalmente, estudos imunocitoquímicos que demonstraram imunorreatividade para GLU e ASP em neurônios, axônios e terminais axônicos nesta região (Clements *et al.*, 1987). Por fim, estudos eletrofisiológicos e de microdiálise, sugeriram que o GLU e o ASP agiam em receptores de AAE na SCP ativando componentes do sistema analgésico endógeno, induzindo comportamento defensivo e vocalização. Estes estudos forneceram evidências adicionais para o papel neurotransmissor do GLU e ASP endógenos na SCP (Beitz & Williams, 1991).

1.2.1. Receptores Glutamatérgicos

Os receptores glutamatérgicos têm sido classificados com base na existência de agonistas específicos (Beitz & Williams, 1991). Estes receptores são divididos em metabotrópicos (acoplados à proteína G) e ionotrópicos (Hollmann & Heinemann, 1994; Monaghan *et al.*, 1989). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são canais iônicos operados por ligante que medeiam a maior parte da neurotransmissão excitatória cerebral (Dingledine *et al.*, 1999), e dividem-se em duas classes principais: os do tipo NMDA (têm como agonista o análogo sintético do glutamato N-metil-D-aspartato) e os não-NMDA (Lesson & Iversen, 1994). Os receptores do tipo NMDA foram os primeiros receptores de aminoácidos identificados nas sinapses centrais excitatórias (Bennett & Balcar, 1999). Os receptores ionotrópicos não-NMDA são chamados AMPA (ácido 3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico, originalmente denominado quisqualato), KAIN (cainato) e Delta (ou *orphan*). Os receptores ionotrópicos do GLU são compostos por uma estrutura tetramérica

ou pentamérica, com subunidades heteroméricas, que formam um poro central com condutância seletiva para os íons Ca^{2+} ou Na^+ (Petralia *et al.*, 2000).

Resultados de estudos analisando a localização específica destes subtipos específicos de receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA, KAIN e Metabotrópicos) na SCP demonstraram uma distribuição heterogênea (Albin *et al.*, 1990). Estes pesquisadores identificaram uma maior densidade de todos esses subtipos de receptores na SCPdl, e a menor densidade na SCP ventrolateral.

1.2.2. Receptores NMDA

Dentre os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, o subtipo NMDA tem sido o mais estudado devido à existência de antagonistas altamente seletivos (Leeson, 1993; Dingledine *et al.*, 1999). Este receptor possui um bloqueio voltagem-dependente de seu canal iônico pelo íon Mg^{2+} , quando encontra-se em estado de repouso. Ele é ativado após a despolarização parcial da célula através da ativação dos receptores não-NMDA ou outros receptores excitatórios, causando a remoção do íon Mg^{2+} (Leeson & Iversen, 1994). Quando ativado este receptor controla a abertura de um canal iônico que permite a entrada de cátions monovalentes (principalmente Na^+) e divalentes (principalmente Ca^{2+}) na célula, ocorrendo também a saída de íons K^+ .

Os subtipos de subunidades que compõem o receptor NMDA são: NR 1, NR 2A-D e NR 3 (Dingledine *et al.*, 1999). Na Tabela 1 abaixo, observa-se uma síntese dos diversos sítios modulatórios existentes no receptor NMDA, onde se ligam muitas substâncias endógenas (Carobrez *et al.*, 2002). Estes sítios são considerados alvos importantes para a ação de drogas (Dingledine, 1999; Leeson & Iversen, 1994).

TABELA 1. Possíveis sítios para a ação de drogas no receptor NMDA

Sítio Ligante	Modo de Ação	Ligante Endógeno	Drogas
Subunidade NR1	Sítio de ligação da Glicina	Ag: Glicina, D-Serina; At: Ácido Quinurênico.	Ag: D-Cicloserina; At:HA966, 7CK
Subunidade NR2	Sítio de ligação do Glutamato	Ag: L-Glutamato; L-Aspartato	Ag:NMDA; At:AP5, AP7
	Antagonista não-competitivo		Álcool, Tricloroetanol, Ifenprodil, Haloperidol
Canal Iônico	Bloqueio incompetitivo no estado aberto do canal.		Cetamina, MK-801, Fenciclidina, Memantina, Amantadina
Moduladores	Inibição	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , H ⁺ , Dinorfina A, agentes oxidantes	
	Potenciação	Poliaminas, Histamina, Agentes redutores, Ácido Araquidônico	
Mecanismos de Captação	Inibição	L-Glutamato	Diidrocainato, DL-treo-β-benziloxil-aspartato
		Glicina	Glicildodecilamida, Sarcosina

FONTE: Adaptado de Carobrez *et al.*, 2002.

NOTA:

Ag: agonista,

At: antagonista.

1.2.3. Sítio de ligação da glicina no receptor NMDA (sítio GLY-B/NMDA)

Para a ativação do receptor NMDA é necessário a presença de glutamato (GLU) e glicina (GLY), que atua como co-agonista essencial no sítio de ligação da GLY no receptor

NMDA (sítio GLY-B/NMDA) (Johnson & Ascher, 1987; Kleckner & Dingledine, 1988). Um receptor NMDA funcional possui uma combinação de uma subunidade NR1 mais, no mínimo, uma subunidade NR2, expressando os sítios de reconhecimento (ligação) da GLY e do GLU, respectivamente (Danysz & Parsons, 1998).

A glicina foi primeiramente proposta como um neurotransmissor em 1965 e posteriormente foi aceita como o principal neurotransmissor inibitório do SNC, principalmente na medula espinhal (Delorey & Olsen, 1989; McGeer & McGeer, 1989). Somente em 1987 foi descoberta a ação estimulatória da GLY no receptor NMDA, através da demonstração de uma redução ou anulação na magnitude da resposta eletrofisiológica obtida de células neuronais em cultura quando a GLY era excluída do meio. Pequenas concentrações de GLY foram suficientes para restaurar a resposta normal do receptor NMDA (Johnson & Ascher, 1987).

O sítio GLY-B/NMDA é insensível à estriçnina, enquanto o primeiro sítio receptor descrito para a GLY é sensível. A ativação do sítio receptor GLY-A (sítio receptor de glicina sensível à estriçnina), causa a inibição neuronal através da abertura de canais de Cl⁻ (Danysz & Parsons, 1998; Thomson, 1990). Danysz e colaboradores (1987, 1989) demonstraram que a GLY aumentava os níveis de 3',5'-guanidina monofosfato cíclico (GMPc) no cerebelo *in vivo*, indicando que o sítio GLY-B/NMDA não está sempre saturado *in vivo*. Também em 1987 foi introduzido o primeiro antagonista deste sítio, o ácido quinurênico (KYN) (Kessler *et al.*, 1987, 1989), o que foi particularmente interessante, pois esta é uma substância endógena e, portanto, pode ter um papel fisiológico no SNC, representando uma nova possibilidade para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de distúrbios do SNC (Stone *et al.*, 1987; Stone, 1993).

Os resultados de Kleckner & Dingledine (1988), sugerindo que a GLY é de fato obrigatória para a ativação do receptor NMDA, tiveram implicações importantes pois indicaram que a máxima inibição do sítio GLY-B/NMDA poderia resultar numa inibição total da atividade do receptor NMDA, o que foi confirmado em estudos posteriores (Danysz & Parsons, 1998). Isto levantou novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas tendo como alvo a modulação do receptor NMDA.

Hashimoto e colaboradores (1993) demonstraram que a D-Serina (D-SER) está presente no cérebro em níveis que poderiam influenciar o sítio GLY-B/NMDA. A D-SER exógena potencializa a neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA (Kleckner & Dingledine, 1988; Wroblewski *et al.*, 1989; Matsui *et al.*, 1995; Paudice *et al.*, 1998) e liga-se seletivamente ao sítio GLY-B/NMDA (Schell *et al.*, 1995). Tanto a D-SER quanto a GLY têm sido propostas como candidatos a agonistas endógenos deste sítio (Danysz & Parsons, 1998; Mothet *et al.*, 2000).

O sítio GLY-B reconhece concentrações submicromolares de GLY (Leeson & Iversen, 1994; Thomson, 1990). Alguns autores sugerem que o sítio GLY-B/NMDA está saturado em condições fisiológicas, considerando a concentração micromolar de GLY no fluido extracelular (Matsui *et al.*, 1995). Entretanto, outro estudo *in vitro*, utilizando a coexpressão de transportadores de GLY e receptores NMDA em oócitos, demonstrou um tamponamento eficiente da concentração local de GLY, o que sugere que a concentração de GLY pode ser mantida bem abaixo do necessário para a saturação do sítio de ligação *in vivo* (Supplisson & Bergman, 1997).

Kemp e colaboradores (1988) descreveram o ácido 7-Cloro-Quinurênico (7-CK), um derivado halogenado do ácido quinurênico (KYN), como um antagonista de alta afinidade pelo sítio GLY-B/NMDA. O antagonismo deste sítio *in vivo* foi confirmado

subseqüentemente, pela atividade anticonvulsivante e neuroprotetora deste composto após aplicação intra-cerebroventricular (Foster & Kemp, 1989; Singh *et al.*, 1990).

1.3. Papel funcional dos receptores NMDA no SNC

No SNC, o receptor NMDA está envolvido em muitos processos funcionais como aprendizado e memória (Morris, 1989), desenvolvimento neural e plasticidade sináptica (Cotman *et al.*, 1988), dano neuronal conseqüente de isquemia e hipoglicemia (excitotoxicidade devido à ativação maciça destes receptores, com conseqüente morte celular por acúmulo intracelular de Ca^{2+}) (McCulloch, 1992; Moroni *et al.*, 1992; Yenari *et al.*, 1997), epilepsia e distúrbios neurodegenerativos (Meldrum, 1985; Blanpied *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1996; Ishimaru & Toru, 1997; Von Essen *et al.*, 1996; Greenamyre *et al.*, 1988), dependência de drogas e tolerância (Bhargava, 1997; Marek *et al.*, 1991; Rosseti & Carboni, 1995), dor neuropática (Hunter *et al.*, 1994; Eisenberg & Pud, 1998), e distúrbios afetivos como ansiedade e depressão (Graeff, 1993 a; Matheus *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1995).

Kew e colaboradores (2000) demonstraram que a mutação pontual no sítio GLY-B/NMDA (subunidade NR1), em camundongos, produziu redução na afinidade da glicina, sem provocar alteração na afinidade pelo glutamato. Os camundongos mutantes foram viáveis e férteis apenas quando a mutação produzia uma diminuição moderada na afinidade pela GLY; porém os animais portadores da mutação que reduzia severamente a afinidade da GLY pelo sítio GLY-B/NMDA tinham baixo peso ao nascer, não se alimentavam e morriam dentro de poucos dias após o nascimento. Esse fenômeno letal confirma o papel crítico da ativação do receptor NMDA para a sobrevivência neonatal. Estudos adicionais

revelaram que os animais viáveis não possuíam anormalidades anatômicas grosseiras no SNC, porém apresentaram mudanças na expressão das subunidades do receptor NMDA, déficits na LTP hipocampal e aprendizado espacial, redução na sensibilidade a crises convulsivas induzidas pelo NMDA. Outros estudos comportamentais ainda indicaram que estes animais mutantes exibiam uma redução na aversão natural após exposição a um novo ambiente. Estes achados são consistentes com uma ativação reduzida do receptor NMDA (Kew *et al.*, 2000).

1.3.1. Receptores NMDA e comportamento defensivo

O envolvimento do receptor NMDA na mediação das reações defensivas tem sido demonstrado em estudos realizados nas últimas duas décadas. Foram obtidos efeitos ansiolíticos em diversos modelos animais, utilizando antagonistas competitivos ou não-competitivos do receptor NMDA (Bennet *et al.*, 1987; Blanchard *et al.*, 1992; Kehne *et al.*, 1991; Porter *et al.*, 1989; Stephens *et al.*, 1986). Do mesmo modo, injeções sistêmicas de antagonistas do sítio GLY-B no receptor NMDA, também têm exibido um perfil ansiolítico (Anthony & Newins, 1982; Corbet & Dunn, 1990; Trullas *et al.*, 1989).

Com relação ao papel dos receptores NMDA da SCPd no comportamento defensivo demonstrou-se que microinjeções de antagonistas do receptor NMDA, como o ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP-7) e o ácido quinurênico (KYN) (Guimarães *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 1990), bem como de antagonistas do sítio GLY-B/NMDA, como o ácido 7-Cloro-Quinurênico (7CK) e o 3-amino- 2-hidróxi-pirrolidona (HA966) na SCPd têm demonstrado efeitos ansiolíticos (Matheus *et al.*, 1994; Teixeira & Carobrez, 1999). Bittencourt e colaboradores (2000) demonstraram que a microinjeção de NMDA na SCPd tem participação na evocação de respostas defensivas inatas. Em adição, microinjeções de

7CK na SCPd abole o efeito ansiogênico obtido pela injeção sistêmica de pentilenotetrazol (De-Souza *et al.*, 1998). Por outro lado, microinjeções de agonistas deste mesmo sítio receptor, a GLY e a D-Serina (D-SER) demonstraram efeito ansiogênico no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Schmitt *et al.*, 1995; Teixeira & Carobrez, 1999).

1.4. Modelo animal de ansiedade: Labirinto em T Elevado (LTE)

O LTE é um modelo animal de ansiedade e memória proposto por Graeff e colaboradores (1993 b), desenvolvido a partir do bloqueio de um dos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Handley & Mithany, 1984).

Este modelo consiste em um labirinto em forma de T, possuindo um braço fechado perpendicular a dois braços abertos. Baseando-se no fato de os ratos terem um medo inato de espaços abertos (Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993), a resposta de esquiva inibitória (EI) é obtida após sucessivas exposições do animal ao braço fechado do LTE, onde são medidas as latências de saída para os braços abertos. A memória para esta resposta de EI pode ser estimada posteriormente em um reexposição do animal ao LTE (Viana *et al.*, 1994). Uma resposta de fuga é obtida quando o animal é colocado no final de um dos braços abertos, e se direciona ao interior do braço fechado do labirinto (Graeff *et al.*, 1993 b).

O LTE foi inicialmente proposto como um modelo animal de ansiedade e memória, onde a resposta de EI era avaliada através da medida das latências de saída para os braços abertos por duas vezes consecutivas (Latência basal e Esquiva 1) e, imediatamente após, era medida a primeira latência de fuga dos braços abertos. Depois de 72 horas era realizada

a sessão teste, onde eram novamente medidas a latência de saída para os braços abertos (Esquiva 2), e a latência de fuga dos braços abertos (Graeff *et al.*, 1993 b).

A validação farmacológica deste modelo foi inicialmente realizada utilizando o composto ansiolítico diazepam (DZP) (Graeff *et al.*, 1993 b), bem como outras drogas supostamente ansiolíticas, os quais causaram um prejuízo na resposta de EI, enquanto agentes conhecidamente ansiogênicos facilitaram a resposta de EI; tanto administrados por via sistêmica quanto microinjetados no núcleo dorsal da rafe (NDR). O comportamento de fuga no LTE não foi afetado pela maioria das drogas testadas (Graeff *et al.*, 1998).

A esquiva inibitória (EI) é a tarefa mais usada para estudar os mecanismos de memória (Bures *et al.* 1983). Em adição, possivelmente estruturas cerebrais relacionadas com ansiedade e memória sobrepõem-se em muitas partes dos circuitos neurais (Tomaz *et al.*, 1992). Com isto, este modelo parece promover uma fonte para análise e entendimento de alguns princípios fisiológicos básicos relacionados à memória emocional (Sanson & Carobrez, 1999).

Recentemente, propôs-se um novo procedimento para a utilização do LTE (Conde *et al.*, 1999; Sanson & Carobrez, 1999). Este novo procedimento utilizado baseia-se no aprendizado (ou aquisição) de um critério de esquiva inibitória (EI), que consiste na permanência do animal por 300 segundos, continuamente, no interior do braço fechado do labirinto. Segundo este procedimento o animal é colocado no labirinto tantas vezes quanto necessário para que atinja o critério de EI. Os experimentos realizados por Sanson & Carobrez (1999) demonstraram que entre animais de diferentes idades (30, 60, 90 e 120 dias) testados, 100 % dos animais adquiriram EI, porém a idade dos animais tem influência sobre o perfil de aprendizado de EI, já que os animais de 60 dias precisaram de um maior número de sessões para atingir o critério de aprendizado. Adicionalmente, os resultados

mostraram que depois da aquisição de EI há uma notável recuperação de memória que pode ser observada meses após. O comportamento de avaliação de risco, o qual no LTE indica o conflito aproximação – esquiva do animal no interior do braço fechado, também foi incluído na avaliação. Este comportamento de avaliação de risco, um paradigma originalmente proposto num contexto natural de defesa, pode consistir em um exame minucioso visual, auditivo ou olfatório de um estímulo aversivo enquanto o indivíduo permanece a distância deste estímulo (Blanchard *et al.*, 1991, 2001).

Silveira e colaboradores (2001) demonstraram a expressão da proteína Fos (marcador de ativação neuronal) no cérebro de ratos submetidos ao LTE. Os resultados demonstraram a expressão de Fos em regiões conhecidamente envolvidas com comportamento de defesa e ansiedade como o Hipotálamo, a Amígdala e a SCP, o que reforça as características de aversividade induzidas pela exposição do animal ao LTE.

2. OBJETIVOS

Baseado nos fatos relatados na Introdução, que demonstram o envolvimento dos receptores NMDA da SCPd na modulação do comportamento defensivo, e, possivelmente na ansiedade, o presente trabalho visou investigar a influência de compostos com ação no sítio GLY-B/NMDA sobre os processos de aquisição e expressão da resposta de esquiva inibitória evocada no LTE. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- A) Verificar os efeitos comportamentais ansio-seletivos produzidos pela microinjeção de agonistas do sítio GLY-B/NMDA, glicina (GLY) e D-serina (D-SER), na SCPd de ratos avaliados no LTE;
- B) Verificar os efeitos comportamentais ansio-seletivos produzidos pela microinjeção do ácido 7-cloro-quinurênico (7CK), antagonista do sítio GLY-B/NMDA, na SCPd de ratos avaliados no LTE;
- C) Verificar os efeitos da GLY e D-SER microinjetadas na SCPd de ratos, sobre os processos de aquisição (aprendizagem) e retenção da resposta de esquiva inibitória no LTE;
- D) Verificar os efeitos do 7CK microinjetado na SCPd de ratos, sobre os processos de aquisição (aprendizagem) e retenção da resposta de esquiva inibitória no LTE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos, machos, com idade entre 15 e 18 semanas e peso entre 250 e 350 gramas, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm) forradas com serragem e, uma semana antes da cirurgia estereotáxica, divididos em grupos de dois ou três por gaiola. Durante todo o período de permanência no biotério os animais tiveram livre acesso a água e comida, e foram mantidos em ambiente com temperatura (23 ± 1) °C e ciclo de luz controlados (12 horas claro/12 horas escuro).

3.2. Cirurgia Estereotáxica

Para a realização da cirurgia estereotáxica, os animais foram anestesiados com uma solução (1:1) de xilazina (Rompum[®]) e cetamina (Francotar[®]); 1,5 ml/Kg, por via intraperitoneal (I. P.). Após a perda total dos reflexos, realizou-se a tricotomia da 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 xilocaína com adrenalina (2 %) subcutaneamente, visando a formação de uma pápula, que provocou efeito anestésico e vasoconstritor local, bem como serviu para a orientação da 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 coronária. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o

ponto bregma e o lambda ficassem situados no mesmo plano horizontal. O osso craniano foi então seco e a calota craniana perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula guia direcionada à Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal. Os parafusos foram colocados na parte central dos ossos parietais direito e esquerdo. Para o implante da cânula direcionada à Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal, foram utilizadas as seguintes coordenadas, de acordo com Paxinos e Watson (1998): AP = -7.6 mm em relação ao bregma (porção caudal da SCPd), ML = +1.9 mm e DV = -2.0 mm a partir da superfície externa do osso craniano, em um ângulo de 22°. Um mandril nº 30 foi adaptado à cânula, com o intuito de prevenir o seu entupimento. Logo após a adaptação dos parafusos e da cânula, o osso foi seco e a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico auto-polimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma sólida prótese.

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 à anestesia geral. Posteriormente, os animais foram colocados aos pares ou trios em gaiolas, providas de água e comida à vontade, onde permaneceram até serem utilizados.

3.3. Cânulas

As cânulas-guia 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 de um paquímetro (Mitutoyo – Brasil) as cânulas foram cortadas no comprimento de 13 mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual impedia sua total introdução pelo orifício feito previamente com a broca odontológica.

3.4. Microinjeção Intracerebral

Para a microinjeção intracerebral das drogas foram utilizadas agulhas de 16.2 mm (0.3 mm de diâmetro), confeccionadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas, por um tubo de polietileno, a microsseringas (Hamilton, 5 μ l). As microsseringas foram preenchidas com água destilada, e foi introduzida uma bolha de ar no tubo de polietileno para separar a solução a ser injetada. As agulhas utilizadas para a microinjeção possuíam 3.2 mm a mais que a cânula guia, de maneira que permitiam a microinjeção da droga na SCPd.

Para realizar a microinjeção, os animais foram previamente imobilizados com o auxílio de um pano e, com um alicate foi retirado o mandril previamente adaptado à cânula. Com o auxílio de limas odontológicas, cortadas de maneira a não ultrapassar 13 mm de comprimento, a cânula guia foi limpa antes da microinjeção. Posteriormente a agulha foi introduzida através da cânula. Em cada animal foi injetado 0.1 de solução, durante 20 segundos. Em seguida, o animal permaneceu em uma gaiola durante 10 minutos.

3.5. Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados as seguintes drogas foram utilizadas:

1. Anestésico geral para aplicação IP: utilizou-se uma mistura 1:1 de solução de xilazina, 20mg/ml (Rompum[®], Bayer S.A., Brasil) e cetamina, 100mg/ml (Francotar[®], Virbac do Brasil); 1.5 ml/Kg.
2. Para aplicação intracerebral:
 - a) Líquido cérebro-espinhal (Líquor) artificial - LQ, com a seguinte constituição: NaCl 138.6 mM, KCl 3.35 mM, CaCl₂ 1.26 mM, MgCl₂ 1.16 mM e Na₂CO₃ 9.43 mM;
 - b) Glicina - GLY (Sigma, EUA) dissolvida em LQ;

- c) Ácido 7-Cloro-Quinurênico - 7CK (Sigma, EUA) dissolvido com pequeno volume de NaOH 10 N em LQ, e o pH ajustado para 7.0 com HCl 10 N;
- d) D-Serina – DSER (RBI, EUA) dissolvida em LQ;
- e) Azul de Evans - corante histológico (Sigma, EUA) dissolvido em água destilada.

As doses utilizadas foram selecionadas de acordo com a literatura (Matheus *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1995; Teixeira & Carobrez, 1999).

3.6. Dispositivo para registro comportamental: Labirinto em T Elevado (LTE)

O LTE, proposto por Graeff e colaboradores (1993), consiste em um labirinto de madeira em forma de “T”, modificado a partir do LCE através do bloqueio de um dos braços fechado. O LTE possui dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) e um braço fechado por paredes laterais (50 x 10 x 40 cm), originados a partir de uma plataforma central (10 x 10 cm). É situado a uma altura de 50 cm do chão e os braços abertos são circundados por bordas de acrílico de 1 cm de altura, para minimizar possíveis quedas dos animais. Em nosso laboratório, a base dos braços do LTE foi pintada com resina epóxi impermeável para evitar a impregnação de urina.

Depois de cada sessão de exposição do animal ao LTE, o mesmo era limpo com solução de etanol 10% (v/v). Os experimentos no LTE foram conduzidos em ambiente de baixa iluminação (44 lux), com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), das 08:00 às 13:00 hs.

3.7. Protocolo Experimental

Foram realizados três experimentos, utilizando o LTE como modelo experimental. No primeiro experimento, foram verificados os efeitos de diferentes doses de glicina (GLY)

microinjetadas na SCPd. No segundo experimento, foram verificados os efeitos da D-Serina (D-SER), agonista do sítio GLY-B do receptor NMDA, microinjetada na SCPd. No terceiro experimento, foram avaliados os efeitos do ácido 7-Cloro-Quinurênico (7CK), antagonista do sítio GLY-B do receptor NMDA, da associação 7CK + GLY microinjetados na SCPd, bem como os efeitos da GLY microinjetada no colículo superior (camadas profundas). Em todas os experimentos, foi seguido o protocolo descrito abaixo:

Os animais foram alojados aos pares ou trios por, no mínimo, sete dias após a cirurgia estereotáxica para a implantação das cânulas-guia. No dia do experimento os animais eram transferidos individualmente para a sala experimental, onde era realizada a microinjeção de uma das seguintes soluções (ou associação, item d):

- a) Líquor artificial (LQ);
- b) Glicina (GLY: 1, 10, 80 ou 120 nmol);
- c) Ácido 7-Cloro-Quinurênico (7CK: 8 nmol);
- d) 7CK (8 nmol) + GLY (120 nmol) – o antagonista foi microinjetado 5 minutos antes da GLY, e o experimento foi realizado 10 minutos após a microinjeção desta última;
- e) D-Serina (D-SER: 160 ou 320 nmol).

Após a microinjeção os animais eram recolocados em sua caixa onde permaneciam por 10 minutos, após este tempo os animais eram submetidos ao LTE.

3.7.1. Aquisição de esquiva inibitória (EI) no LTE

Nas sessões de aquisição de aquisição de EI no LTE, os animais foram inicialmente colocados no final do braço fechado do labirinto, com a cabeça voltada para a plataforma central (intersecção entre os braços abertos e o fechado), e o tempo gasto pelo animal para

sair para os braços abertos (latência) foi registrado, sendo fixado em 300 s o tempo máximo. Após a saída do animal para os braços abertos, o mesmo era retirado do LTE, deixado por 30 s em uma caixa e logo após recolocado no braço fechado do labirinto. O procedimento foi repetido sucessivas vezes até que os animais permaneceram durante 300 segundos no braço fechado, sendo este o critério para aquisição de esquiva inibitória – EI adotado (Sanson & Carobrez, 1999; Tomaz *et al.*, 1999). Quando o animal estendia o corpo para fora do braço fechado colocando uma, duas ou três patas em um dos braços abertos e retornava ao interior do braço fechado, este comportamento era registrado como tentativa. O comportamento de avaliação de risco (AR) foi definido como a frequência de tentativas no braço fechado, por minuto, de acordo com a seguinte fórmula: $AR = [n^\circ \text{ de tentativas} / \text{latência de EI}] \times 60$.

Durante as exposições dos animais ao LTE foram registrados os seguintes padrões comportamentais:

a) Padrão de Esquiva Inibitória (EI) nas 3 primeiras exposições ao LTE

Para verificar os efeitos ansio-seletivos dos compostos utilizados, de acordo com Graeff *et al.* (1998), os animais foram inicialmente submetidos a 3 exposições sucessivas ao LTE, e foi registrado:

- a) Latência de EI 1 – tempo gasto pelo animal para sair para os braços abertos do LTE na primeira exposição,
- b) Latência de EI 2 – tempo gasto pelo animal para sair para os braços abertos do LTE na segunda exposição (30 s após a primeira),
- c) Latência de EI 3 – tempo gasto pelo animal para sair para os braços abertos do LTE na terceira exposição (30 s após a segunda).

b) Padrão de Aprendizado do critério de EI no LTE

Para verificar o efeito dos compostos utilizados sobre o aprendizado da tarefa de EI no LTE, foram registrados os seguintes parâmetros:

- a) Latências de saída para os braços abertos, nas sessões de aquisição de EI até que o tempo total de permanência no braço fechado seja 300s (T total: soma das latências);
- b) Número de sessões necessárias para atingir o critério de aquisição de EI (N sessões) - número total de sessões de exposição ao LTE necessárias para que o animal permaneça por 300s no interior do braço fechado;
- c) Frequência de tentativas (AR) – número total de tentativas de saída para os braços abertos do LTE; onde o animal põe uma, duas ou até três patas para fora do braço fechado e após retorna para o seu interior; durante todas as sessões de aquisição de EI. Este parâmetro foi corrigido para o número de tentativas/minuto (AR), conforme descrito anteriormente.

3.7.2. Retenção de EI no LTE

Na sessão de retenção de EI, realizada 48 horas após a sessão de aquisição de EI, os animais foram colocados uma única vez no final do braço fechado com a cabeça voltada para a plataforma central, e foram registradas as seguintes respostas:

- a) Latência de saída para os braços abertos (Latência de retenção) – tempo gasto pelo animal para sair para os braços abertos do LTE. Para esta resposta foi delimitado um tempo máximo de 300s.

- b) Frequência de tentativas (AR) - número de tentativas de saída para os braços abertos do LTE.

3.8. Análise Estatística

Os dados, expressos como média \pm EPM, foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett, para a verificação da homogeneidade de variâncias. Na ocorrência de valores não homogêneos ($p < 0.05$), os dados foram transformados pelo logaritmo [$\log(1 + \text{variável})$], com o objetivo de homogeneizar a amostra.

3.8.1. Padrão de Esquiva Inibitória (EI) nas três primeiras exposições ao LTE

Os dados relativos às variáveis Latência de EI 1, 2 e 3, foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento x sessão) com medidas repetidas. Valores significativos indicados pela ANOVA foram submetidos posteriormente ao teste *post hoc* LSD (Least Square Difference). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

3.8.2. Padrão de Aprendizado da Esquiva Inibitória no LTE

Os dados relativos às variáveis N sessões, T total e AR, foram submetidos ao teste de ANOVA. Valores significativos indicados pela ANOVA foram submetidos posteriormente ao teste *post hoc* Dunnett (grupos que receberam LQ, GLY ou D-SER na SCPd) ou LSD (demais grupos: LQ, GLY 120 ηmol , 7CK 8 ηmol , 7CK + GLY ou GLY-CS). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

3.8.3. Retenção da resposta de EI no LTE

Os dados relativos às variáveis latência de retenção e AR, foram submetidos ao teste de ANOVA. Valores significativos indicados pela ANOVA foram submetidos posteriormente ao teste *post hoc* Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

3.9. Histologia

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma solução (1:1) de xilazina (Rompum[®]), 20 mg/ml, e cetamina (Francotar[®]), 100 mg/ml; 1,5 ml/Kg, por via intraperitoneal (I. P.). Após a perda total dos reflexos, foram perfundidos por via intracardiaca com solução salina fisiológica (NaCl 0.9 %) seguida por solução de formaldeído (10 %). Em seguida foram decapitados e receberam uma microinjeção de solução de Azul de Evans (2 % em 0.3 μ l). Seguiu-se a remoção dos cérebros, que foram acondicionados em solução de formaldeído (10 %), por um tempo mínimo de três dias. Os cérebros foram preparados em blocos da região mesencefálica, posicionados em um micrótomo de congelamento e seccionados em cortes de 40 μ m de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas histológicas, corados pelo método de Nissl com cresil violeta (Sigma, EUA) e as lâminas montadas com DPX (Fluka Biochemika, Switzerland). Os sítios de microinjeção foram identificados e lançados em diagramas coronais do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

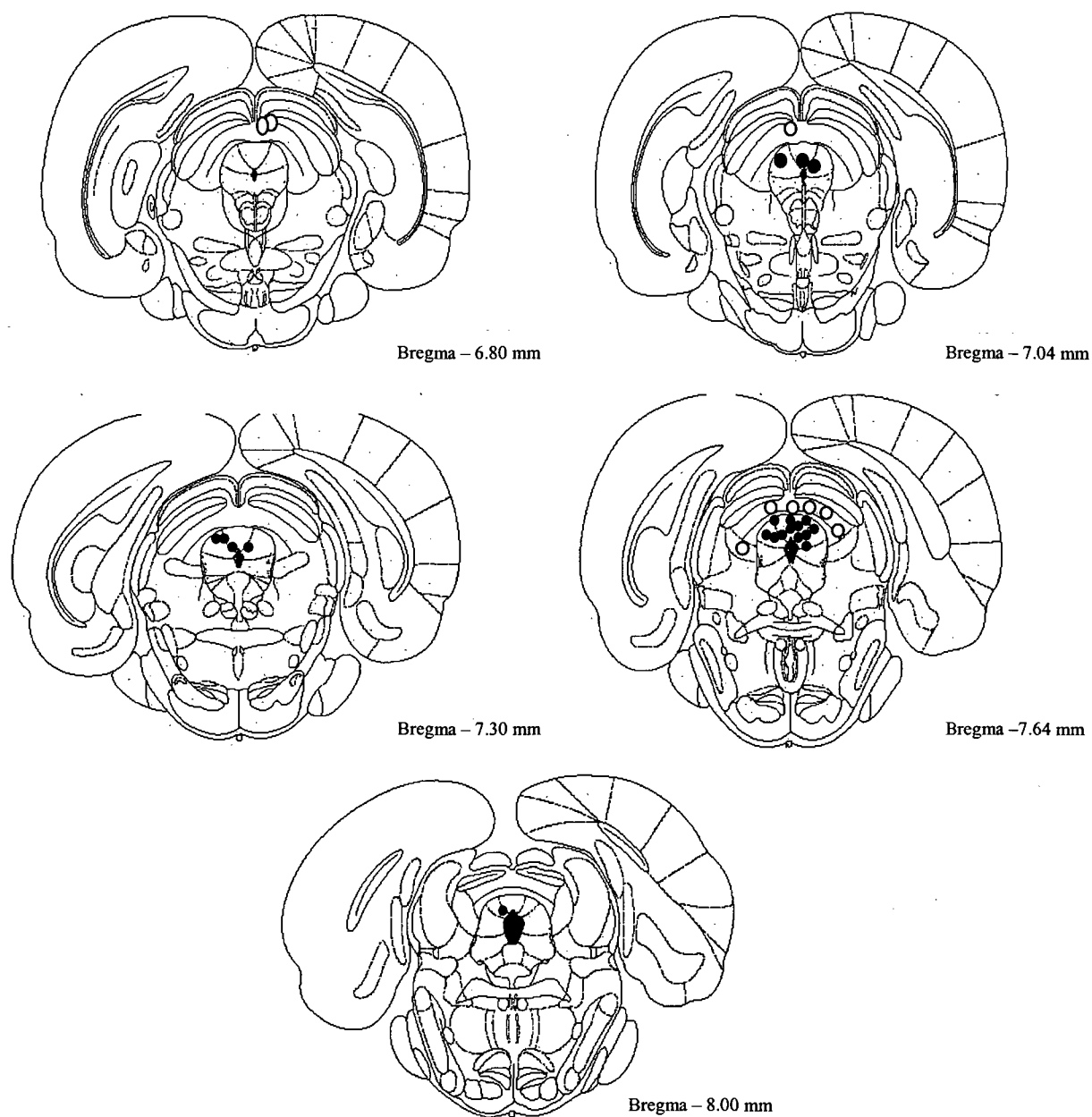


Figura 2. Diagramas de secções coronais mesencefálicas de cérebro de rato, adaptadas do Atlas de Paxinos & Watson (1998), mostrando os sítios de microinjeção dentro (●) e fora (○) da SCPd. O número de sítios é menor que o numero de animais utilizados devido à sobreposição de sítios de microinjeção.

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I. Efeitos da microinjeção de glicina na SCPd

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão demonstrados nas figuras 3 à

5.

4.1.1. Efeito ansio-seletivo da glicina (GLY)

A ANOVA com medidas repetidas das latências de EI 1, 2 ou 3 revelou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(4,56) = 3.9$; $p < 0.01$] e entre as sessões de esquila [$F(2,112) = 53.3$; $p < 0.00001$].

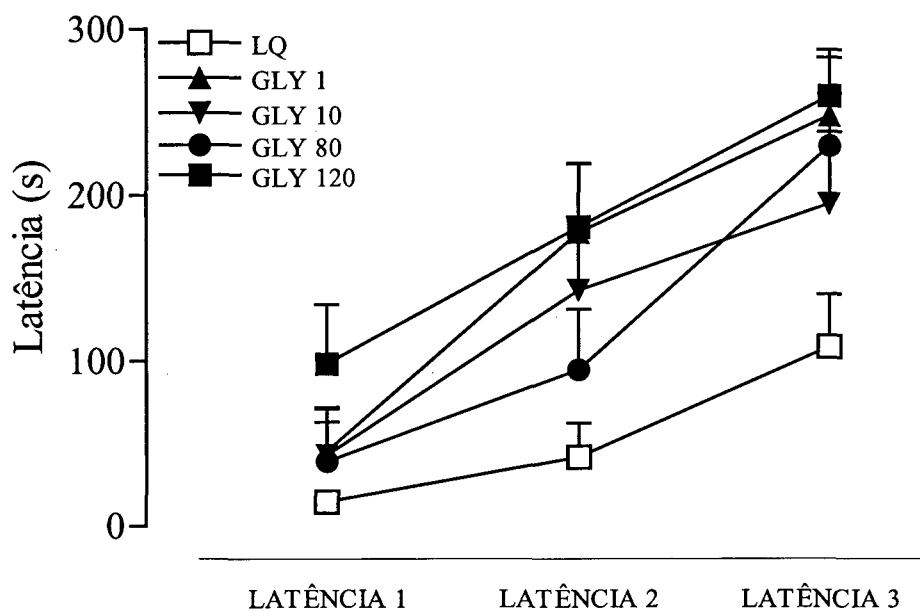


Figura 3. Efeito ansiogênico da glicina (GLY) aplicada na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE). Os animais receberam microinjeções (0.3 μ l) de GLY (1, 10, 80 ou 120 nmol) ou Líquido cérebro-espinhal artificial (LQ) na SCPd 10 minutos antes da exposição ao LTE. As latências 1, 2 e 3 correspondem à latência de saída para os braços abertos do LTE e foram medidas a intervalos de 30 segundos. Os valores estão representados por média \pm EPM. GLY 1: n = 11; GLY 10: n = 10; GLY 80: n = 12; GLY 120: n = 14; LQ: n = 14.

Não houve interação significativa entre tratamento e sessões de esquiava. O teste LSD demonstrou diferença significativa entre as curvas de EI do grupo controle (LQ) e as curvas obtidas com as doses de GLY 1 e 120 nmol. Em adição, o teste demonstrou uma tendência ao aumento dos valores de EI obtidos com as doses de GLY 10 nmol ($p = 0.05$) e 80 nmol ($p = 0.06$) em relação ao LQ (figura 3).

4.1.2. Efeito sobre a aquisição de esquiava inibitória (EI)

A GLY, microinjetada na SCPd, provocou modificação no número de sessões necessárias para a aquisição da esquiava inibitória [$F(4,56) = 5.9$; $p < 0.005$] (figura 3A). A análise *post hoc* revelou que houve uma diminuição no número de sessões necessárias para a aquisição de EI em todas as doses quando comparadas com o grupo controle. A GLY também provocou uma modificação no tempo total (T total) para a aquisição de EI no treino [$F(4,56) = 3.74$; $p < 0.01$], e a análise *post hoc* demonstrou efeito significativo das doses de GLY 10 nmol e 120 nmol em relação ao controle (figura 4A). A ANOVA realizada da avaliação de risco (AR) na sessão de aquisição de EI não demonstrou diferença significativa entre os grupos que receberam GLY na SCPd e o grupo controle (figura 4B).

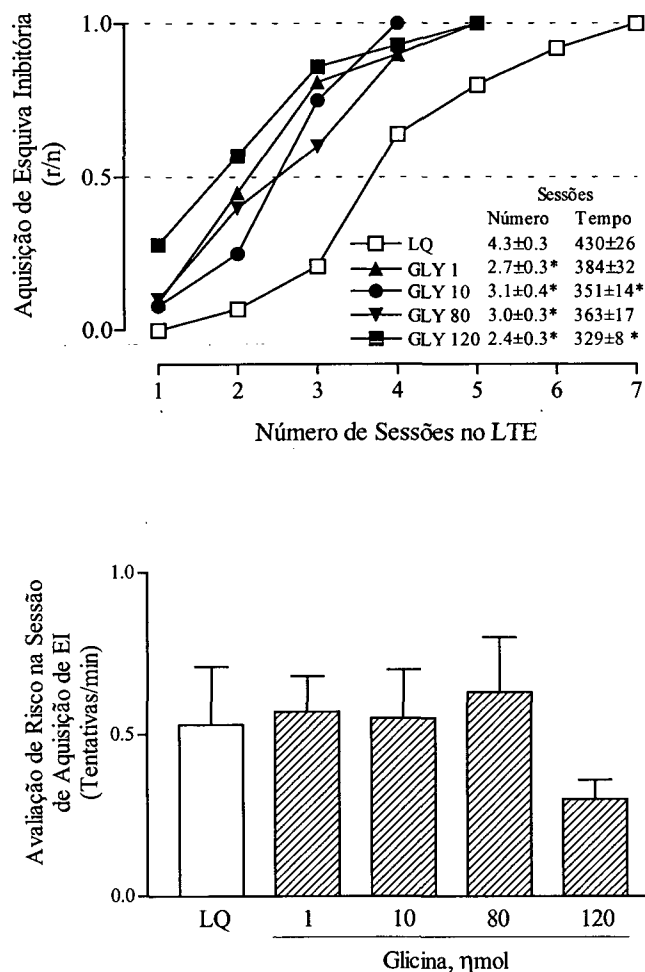


Figura 4. (A) Proporção cumulativa de animais que atingiram o critério de aquisição de Esquiva Inibitória (EI) (permanência do animal por 300 segundos consecutivos no interior do braço fechado do LTE) em cada sessão (r = número de animais que atingem o critério de aquisição de EI em determinada sessão; n = número total de animais do respectivo grupo). A tabela inserida no gráfico representa a média do número de sessões e do tempo total que cada grupo leva para atingir o critério de EI; os valores estão representados pela média \pm EPM. (B) Avaliação de risco (número de tentativas de saída para os braços abertos do LTE/ minuto) na sessão de aquisição de EI no LTE; os valores estão representados pela média \pm EPM. GLY 1: $n = 11$; GLY 10: $n = 10$; GLY 80: $n = 12$; GLY 120: $n = 14$; LQ: $n = 14$. * Diferença significativa do grupo controle (LQ).

4.1.3. Efeito sobre a retenção da resposta de EI

Na sessão de retenção de EI no LTE, realizado 48 horas após a sessão de aquisição, a GLY não provocou alteração significativa na latência de retenção e na avaliação de risco (AR) (figura 5).

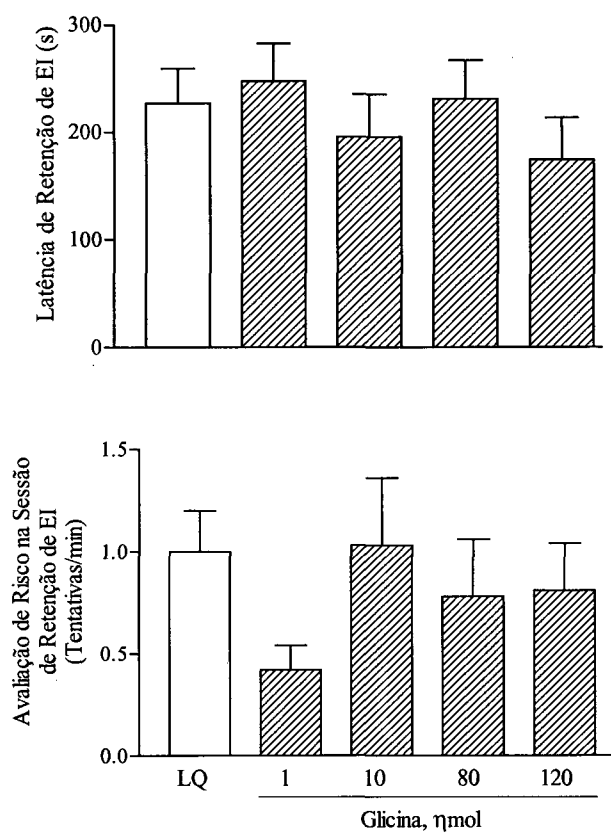


Figura 5. (A) Latência para deixar o braço fechado do LTE na sessão de retenção de EI, realizada 48 horas após a aquisição de EI. (B) Avaliação de risco (tentativas de saída para os braços abertos do LTE/ minuto) na sessão de retenção de EI no LTE (média \pm EPM). GLY 1: n = 11; GLY 10: n = 10; GLY 80: n = 12; GLY 120: n = 14; LQ: n = 14.

4.2. EXPERIMENTO II. Efeitos da microinjeção de D-Serina na SCPd

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 6 à 8.

4.2.1. Efeito ansio-seletivo da D-serina (D-SER)

A ANOVA com medidas repetidas das latências de EI 1, 2 e 3 revelou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(2,25) = 3.9$; $p < 0.05$], entre as sessões de esquiva [$F(2,50) = 71.3$; $p < 0.00001$] e na interação entre tratamento e sessões de esquiva [$F(4,50) = 3.4$; $p < 0.05$]. O teste LSD demonstrou diferença significativa entre as curvas de EI do grupo controle (LQ) e a curva obtida com a dose de D-SER 320 nmol. Em adição, o teste demonstrou uma tendência de aumento dos valores de EI obtidos com a dose de D-SER 160 nmol ($p = 0.06$) (figura 6).

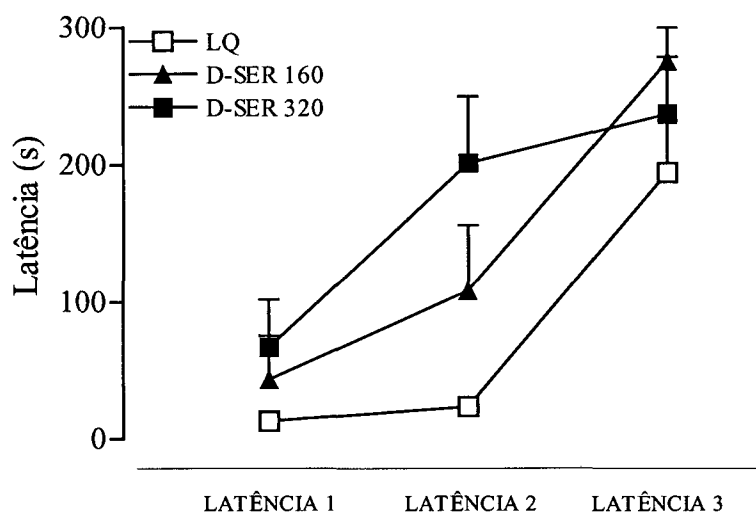


Figura 6. Efeito ansiogênico da D-serina (D-SER) aplicada na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE). Os animais receberam microinjeções de D-SER (160 ou 320 nmol) ou Líquido cérebro-espinhal artificial (LQ) na SCPd 10 minutos antes da exposição ao LTE. As latências de EI 1, 2 e 3 correspondem às latências de saída para os braços abertos do LTE e foram medidas a intervalos de 30 segundos. Os valores estão representados por média \pm EPM. D-SER 160: $n = 9$; D-SER 320: $n = 8$; LQ: $n = 11$.

4.2.2. Efeito sobre o aprendizado de esquiva inibitória (EI)

No LTE a DSER, microinjetada na SCPd, provocou modificação no número de sessões necessárias para a aquisição da esquiva inibitória [$F(2,25) = 4.8$; $p < 0.05$] (figura 6A). A análise *post hoc* revelou que houve uma diminuição no número de sessões necessárias para a aquisição de EI nas duas doses utilizadas, quando comparadas com o grupo LQ. A DSER também demonstrou uma tendência a diminuir o T total para a aquisição de EI no treino [$F(2,25) = 2.9$; $p = 0.07$], e a análise *post hoc* demonstrou efeito significativo somente da dose de DSER 160 nmol em relação ao controle (figura 7A). A ANOVA realizada da AR não demonstrou diferença significativa entre os grupos que receberam D-SER na SCPd e o grupo controle (figura 7B).

4.2.3. Efeito sobre a retenção da resposta de EI

Na sessão de retenção de EI no LTE, realizada 48 horas após a aquisição de EI, a DSER não provocou alteração significativa na latência de retenção e na avaliação de risco (AR) (figura 8).

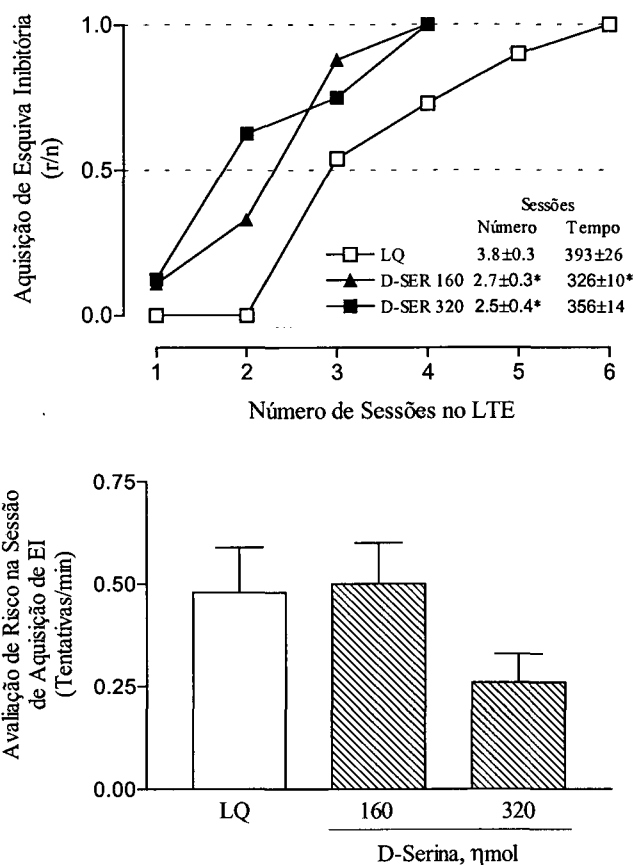


Figura 7. (A) Proporção cumulativa de animais que atingem o critério de aquisição de Esquiva Inibitória (EI) (permanência do animal por 300 segundos consecutivos no interior do braço fechado do LTE) em cada sessão (r = número de animais que atingem o critério de aquisição de EI em determinada sessão; n = número total de animais do respectivo grupo). A tabela inserida no gráfico representa a média do número de sessões e do tempo total que cada grupo leva para atingir o critério de EI; os valores estão representados pela média \pm EPM. (B) Avaliação de risco (número de tentativas de saída para os braços abertos do LTE/ minuto) na sessão de aquisição de EI no LTE; os valores estão representados pela média \pm EPM. * Diferença significativa quando comparada ao grupo controle (LQ). D-SER 160: $n = 9$; D-SER 320: $n = 8$; LQ: $n = 11$.

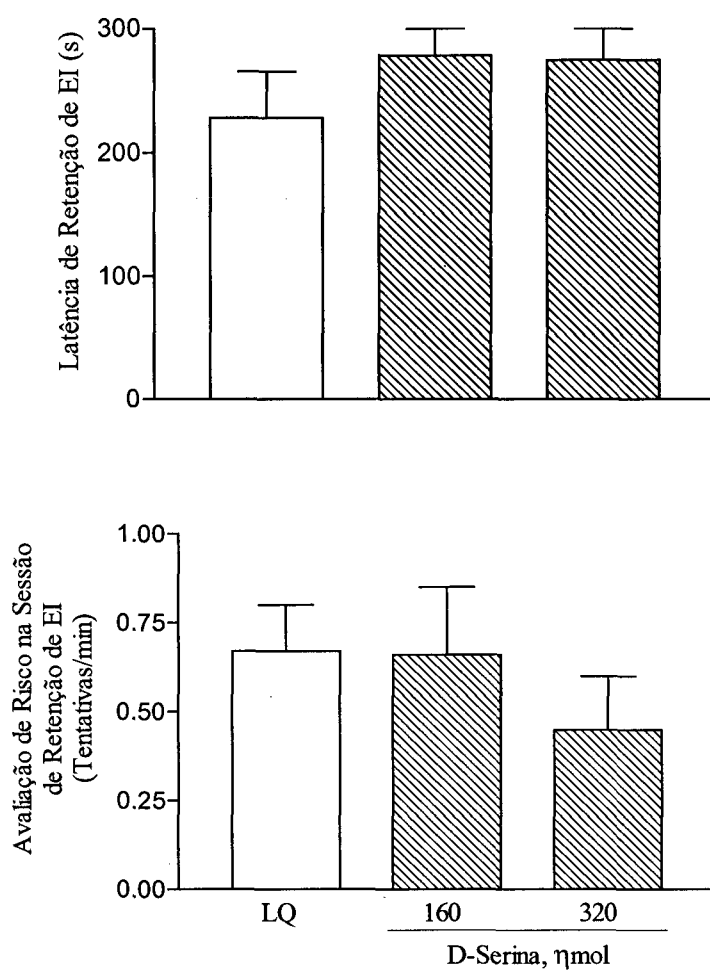


Figura 8. (A) Latência para deixar o braço fechado do LTE na sessão de retenção de EI, realizada 48 horas após a aquisição de EI. (B) Avaliação de risco (tentativas de saída para os braços abertos do LTE/ minuto) na sessão de retenção de EI no LTE (média \pm EPM). D-SER 160: $n = 9$; D-SER 320: $n = 8$; LQ: $n = 11$.

4.3. EXPERIMENTO III. Efeitos da microinjeção de ácido 7-Cloro- Quinurênico (7CK) ou 7CK + GLY na SCPd de ratos submetidos ao LTE

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 9 à 11.

4.3.1. Efeito ansio-seletivo

A ANOVA com medidas repetidas das latências de EI 1, 2 e 3 revelou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(4,75) = 4.4$; $p < 0.005$] e entre as sessões de esQUIVA [$F(2,150) = 37.3$; $p < 0.00001$]. Não houve interação significativa entre tratamento e sessões de esQUIVA. O teste LSD demonstrou diferença significativa entre as curvas de EI do grupo controle (LQ) e as curvas obtidas com a dose de GLY 120 nmol. Em adição, o teste demonstrou uma diferença significativa entre os valores de EI obtidos com 7CK 8 nmol e 7CK + GLY e o grupo GLY 120 nmol (figura 9).

4.3.2. Efeito sobre o aprendizado de EsQUIVA Inibitória (EI)

A ANOVA demonstrou um efeito do tratamento sobre o número de sessões necessárias para a aquisição de EI no LTE [$F(4,75) = 4.5$; $p < 0.005$], e o teste LSD demonstrou um efeito significativo em relação ao grupo controle da GLY 120 nmol e do 7CK, diminuindo e aumentando, respectivamente o número de sessões necessárias para a aquisição de EI. Adicionalmente, houve um efeito do tratamento sobre o T total para aquisição de EI [$F(4,75) = 4.6$; $p < 0.005$], e o teste *post hoc* demonstrou que o 7CK, microinjetado na SCPd, causou um aumento neste parâmetro em relação ao (LQ) (figura 10A). A ANOVA também demonstrou efeito significativo do tratamento sobre a AR [$F(4,75) = 3.05$; $p < 0.05$], sendo que a GLY microinjetada na SCPd ou nas camadas

profundas do Colículo Superior (CS), e o 7CK microinjetado na SCPd, causaram uma diminuição nesse parâmetro em relação ao LQ (figura 10B).

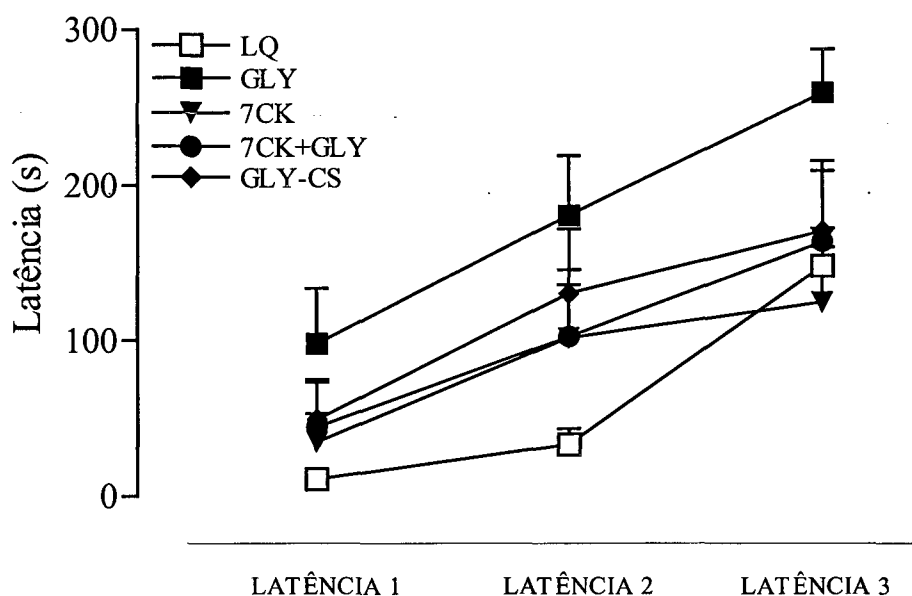


Figura 9. Antagonismo do efeito ansiogênico da glicina (GLY) pelo ácido 7-Cloro-Quinurênico (7CK) aplicados na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE). Os animais receberam microinjeções de GLY(120 nmol), 7CK (8 nmol), a associação 7CK+GLY (5 minutos de intervalo entre as microinjeções) ou Líquido cérebro-espinhal artificial (LQ) na SCPd 10 minutos antes da exposição ao LTE. As latências 1, 2 e 3 correspondem à latência de saída para os braços abertos do LTE e foram medidas com um intervalo de 30 segundos. O grupo GLY-CS corresponde aos animais que receberam microinjeções de GLY no Colículo Superior (camadas profundas). Os valores estão representados por média \pm EPM. GLY 120: n = 14; 7CK: n = 16; 7CK+GLY: n = 10; GLY-CS: n = 11; LQ: n = 29.

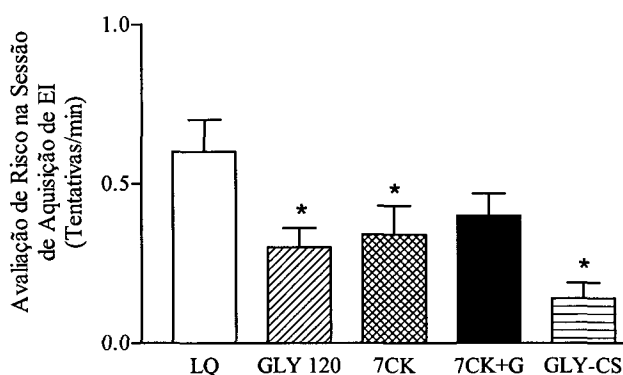
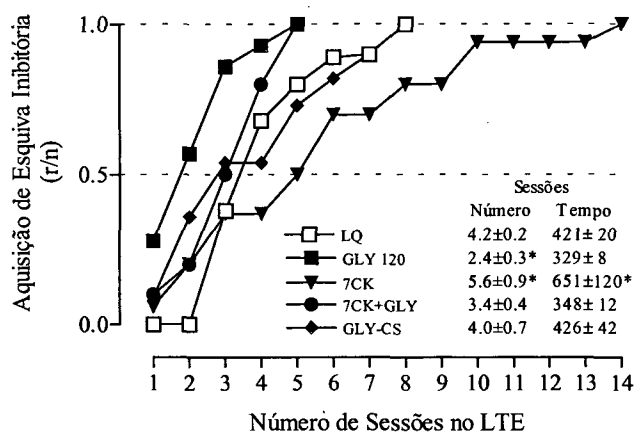


Figura 10. (A) Proporção cumulativa de animais que atingem o critério de aquisição de Esquiva Inibitória (EI) (permanência do animal por 300 segundos consecutivos no interior do braço fechado do LTE) em cada sessão (r = número de animais que atingem o critério de aquisição de EI em determinada sessão; n = número total de animais do respectivo grupo). A tabela inserida no gráfico representa a média do número de sessões e do tempo total que cada grupo leva para atingir o critério de EI; os valores estão representados pela média \pm EPM. (B) Avaliação de risco (número de tentativas de saída para os braços abertos do LTE/ minuto) na sessão de aquisição de EI no LTE; os valores estão representados pela média \pm EPM. O grupo GLY-CS corresponde aos animais que receberam microinjeções de GLY no Colículo Superior (camadas profundas).* Diferença significativa do grupo controle (LQ), $p < 0.05$. GLY 120: $n = 14$; 7CK: $n = 16$; 7CK+GLY: $n = 10$; GLY-CS: $n = 11$; LQ: $n = 29$.

4.3.3. Efeito sobre a retenção da resposta de EI

A ANOVA detectou alteração significativa na latência de retenção de EI pelo tratamento [$F(4,72) = 3.84$; $p < 0.01$], e o teste LSD demonstrou um efeito do 7CK na SCPd causando diminuição significativa na latência de retenção em relação ao grupo LQ (figura 11A). Com relação ao parâmetro AR, não foi detectado efeito do tratamento (figura 11B).

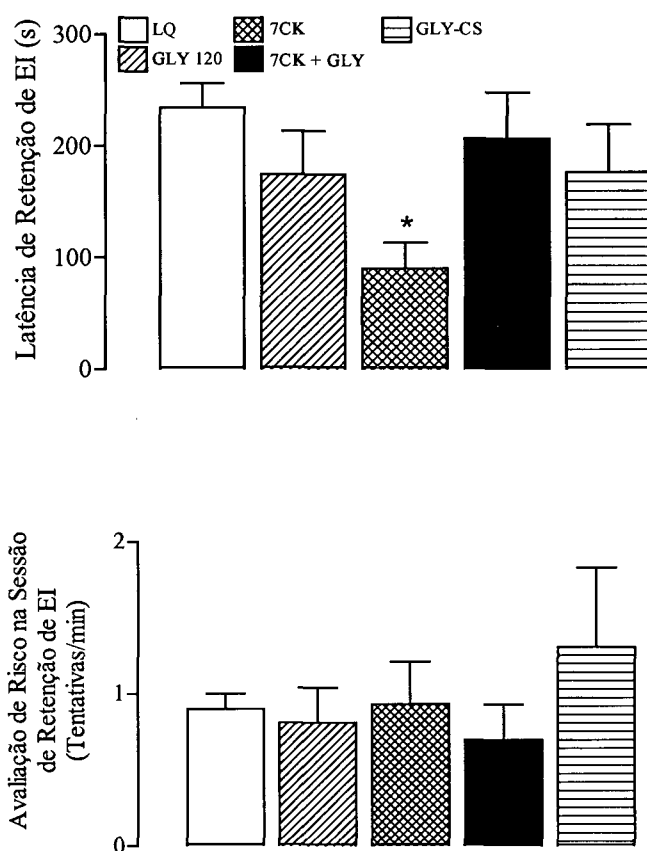


Figura 11. (A) Antagonismo da GLY sobre os efeitos do 7CK na sessão de retenção de EI, realizada 48 horas após a aquisição de EI. (B) Avaliação de risco (tentativas de saída para os braços abertos do LTE/ minuto) na sessão de retenção de EI no LTE (média \pm EPM). O grupo GLY-CS corresponde aos animais que receberam microinjeções de GLY no Colículo Superior (camadas profundas). * Diferença significativa do grupo controle (LQ). GLY 120: n = 14; 7CK: n = 16; 7CK+GLY: n = 10; GLY-CS: n = 11; LQ: n = 29.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que compostos com ação no sítio GLY-B/NMDA microinjetados na SCP causaram alterações no desempenho dos animais no LTE.

Neste trabalho, utilizou-se o LTE não só como modelo para o estudo de efeitos ansiolíticos de drogas, mas também para o estudo da aquisição de uma resposta aversiva (Esquiva inibitória - EI) e da retenção desta resposta.

O Labirinto em T Elevado (LTE), é um modelo animal de ansiedade e memória desenvolvido por Graeff e colaboradores (1993). Neste modelo o animal é colocado inicialmente no final do braço fechado e somente ao colocar a cabeça para fora deste, verá os braços abertos. Considerando o fato de que os ratos têm um medo inato de espaços abertos (Montgomery, 1955; Treit *et al.*, 1993), e que estar nos braços abertos do LTE é uma experiência aversiva para estes animais, tal situação permite aos animais o aprendizado de uma resposta de esquiva inibitória (EI) aos braços abertos (Graeff *et al.*, 1993 b), a qual representa uma resposta aprendida ou condicionada de medo (Calixto *et al.*, 2001; Graeff *et al.* 1998). Por outro lado, quando o animal é colocado no final de um dos braços abertos, ele se movimenta em direção ao braço fechado, realizando uma resposta de fuga (Graeff *et al.*, 1993 b), a qual representa o medo inato ou incondicionado (Calixto *et al.*, 2001; Graeff *et al.* 1998). Segundo Graeff e colaboradores (1993 b), a EI pode ser representativa de condições patológicas, como a ansiedade antecipatória e o transtorno de ansiedade generalizada, enquanto a fuga dos braços abertos do LTE pode ser explorada como um modelo potencial de fobia ou distúrbio de pânico. O comportamento de esquiva passiva ou ativa é freqüentemente encontrado na ansiedade clínica, e nos modelos animais

utilizados a análise destes comportamentos bem como do comportamento de avaliação de risco são preditivos de respostas emocionais (Sanson & Carobrez, 1999).

O LTE foi inicialmente utilizado para o estudo do efeito ansio-seletivo de drogas, onde eram medidas três latências de saída para os braços abertos do labirinto (latências de EI) consecutivamente, e, após 72 horas, era realizada a sessão teste onde era medida uma única latência de EI, visando verificar a retenção da resposta de EI aos braços abertos.

A validação farmacológica deste modelo foi inicialmente realizada utilizando o diazepam (DZP). Os animais que foram tratados com DZP não demonstraram um aumento das latências de saída para os braços abertos, como observado para os animais controle, o que demonstrou que esta droga causou um prejuízo na aquisição de EI e na consolidação da memória de maneira dose dependente (Graeff *et al.*, 1993 b). Outras drogas foram utilizadas para validação farmacológica adicional do LTE. Alguns compostos supostamente ansiolíticos com ação no sistema serotoninérgico também prejudicaram a EI, enquanto os agentes conhecidamente ansiogênicos facilitaram a aquisição de EI. Já outras drogas de ação alucinógena, estimulante psicomotora, neuroléptica, e inibidora da monoamina oxidase (MAO), foram ineficazes (Graeff *et al.*, 1998). O comportamento de fuga no LTE não foi afetado pela maioria das drogas testadas, porém foi prejudicado pelo tratamento sistêmico com TFPP e mCPP (agonistas 5-HT_{2C/2B}), D-fenfiuramina (liberador de 5-HT e inibidor da sua recaptação), o alucinógeno ALEPH 2, e pela microinjeção de ácido caínico no núcleo dorsal da rafe (NDR). Os resultados farmacológicos e comportamentais no LTE dão suporte à visão de que a EI no LTE pode estar relacionada ao distúrbio de ansiedade generalizada, enquanto a fuga pode ser associada com o transtorno de pânico (Graeff *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos na validação comportamental deste modelo indicam que a principal causa para o animal emitir a resposta de EI aos braços abertos não parece ser a aversão à manipulação dos animais pelo experimentador, mas sim a experiência nos braços abertos, e que a EI no LTE não está sujeita à habituação, o que evidencia uma motivação aversiva para esta resposta (Zangrossi & Graeff, 1997).

Sanson & Carobrez (1999) e Conde e colaboradores (1999) propuseram um novo procedimento para a utilização do LTE. Este novo procedimento utilizado baseia-se no aprendizado (ou aquisição) de um critério de esquiva inibitória (EI), que consiste na permanência do animal por 300 segundos, continuamente, no interior do braço fechado do labirinto. Segundo este procedimento o animal é colocado no labirinto tantas vezes quanto necessário para que atinja o critério de EI. Os resultados obtidos demonstraram que os animais treinados até o critério de aprendizado mostraram um desempenho significativamente melhor no teste, realizado 72 horas após, indicando uma melhor retenção de EI (Conde *et al.*, 1999). Esta resposta de EI, também chamada memória emocional no LTE (Conde *et al.*, 1999) é mantida a longo prazo, de três dias a até três meses após a sessão de aquisição de EI (Conde *et al.*, 1999; Sanson & Carobrez, 1999), o que sugere que o estímulo emocional aversivo ao qual o animal é exposto no LTE é suficientemente forte para que ocorra uma retenção duradoura desta resposta de EI. Adicionalmente, foi proposta a inclusão do comportamento de avaliação de risco (AR), que faz parte do repertório defensivo dos animais (Blanchard & Blanchard, 1989; Blanchard *et al.*, 1991), como uma medida importante visando qualificar melhor a EI enquanto o animal encontra-se no interior do braço fechado; este comportamento de AR revela o conflito aproximação-esquiva do animal no braço fechado do labirinto (Sanson & Carobrez, 1999).

Os resultados obtidos no primeiro experimento mostraram que os animais que receberam microinjeções de GLY na SCPd exibiram latências de EI significativamente maiores que o grupo controle nas sessões de aquisição de EI. Existem dados na literatura demonstrando que agentes conhecidamente ansiogênicos como a ioimbina (antagonista adrenérgico α_2 seletivo), o TFPP e o mCPP (agonistas 5-HT_{2C/2B}) facilitam a aquisição de EI no LTE. Também foram realizados experimentos utilizando microinjeção intracerebral no NDR de duas drogas que estimulam os neurônios 5-HT, o ácido caínico e o agonista inverso do receptor benzodiazepínico FG 7142, sendo que estes dois compostos facilitaram a EI. Em contraste, a microinjeção de 8-OH-DPAT no NDR, que inibe os neurônios 5-HT prejudicou a EI de maneira similar aos compostos ansiolíticos administrados por via sistêmica. (Graeff *et al.*, 1998). Estudos anteriores também demonstraram um perfil ansiogênico da GLY, agonista do sítio GLY-B/NMDA, microinjetada na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (De-Souza *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1995; Teixeira & Carobrez, 1999; Carobrez *et al.*, 2002).

O aumento na latência basal de EI, induzido pela GLY (120 nmol) aplicada na SCPd pode sugerir uma resposta defensiva ao novo ambiente aumentada. Já está bem estabelecido que os ratos têm uma aversão natural a espaços abertos (Montgomery, 1955; Treit *et al.*, 1993), logo, no LTE os braços abertos podem representar uma ameaça potencial para estes animais. Em adição, está descrito na literatura que a microinjeção de aminoácidos excitatórios (AAE) na porção mais caudal da SCP dorsolateral (dl) evocam uma estratégia defensiva caracterizada preferencialmente por fuga ao invés do confronto com o perigo potencial (Bandler *et al.*, 2000).

Todos os animais que receberam LQ ou GLY na SCPd adquiriram EI dos braços abertos no LTE. Entretanto, eles não exibiram o mesmo perfil de aprendizado de EI. A GLY, microinjetada na SCPd diminuiu o número de sessões, bem como o tempo total necessário para a aquisição de EI na sessão treino, o que indica uma facilitação no aprendizado da tarefa de EI, e também pode ser relacionado ao efeito ansiogênico deste composto. O fato do comportamento de AR não ter sido modificado na sessão treino, apesar do número de sessões necessárias para a aquisição de EI ter sido reduzido, indica um aumento relativo deste parâmetro. Este fato sugere que a redução de saídas não ocorreu pela habituação do rato ao LTE ou por um efeito sedativo, mas por uma resposta de medo.

Na sessão de retenção de EI, realizada 48 horas após a aquisição de EI, não houve diferença entre os animais que receberam microinjeções de GLY ou Líquor artificial (LQ) na SCPd. Todos os animais mostraram uma latência de saída para os braços abertos do labirinto próxima ao limite máximo estabelecido (300 s), o que representa a manutenção da esquiwa aos braços abertos e uma boa retenção da resposta de EI. Este resultado confirma achados prévios que demonstraram que a introdução do critério de aquisição de EI no LTE induz uma boa performance dos animais na sessão teste (Conde *et al.*, 1999; Sanson & Carobrez, 1999). O comportamento de AR também não sofreu alteração significativa no teste quando comparado ao controle, o que demonstra que a resposta de esquiwa aos braços abertos não sofreu habituação.

No segundo experimento os resultados demonstraram que a microinjeção de D-SER, outro agonista endógeno do sítio GLY/NMDA, causou aumento nas latências de saída para os braços abertos na sessão de aquisição de EI quando microinjetada na SCPd, o que também sugere um efeito ansiogênico deste composto. A D-serina é um ligante endógeno do sítio GLY-B no receptor NMDA, ocupa este sítio plenamente em algumas sinapses

funcionais (Mothet *et al.*, 2000). Anteriormente, também havia sido demonstrado um perfil ansiogênico deste composto microinjetado na SCPd de ratos avaliados em outro modelo animal de ansiedade, o LCE (Schmitt *et al.*, 1995; Carobrez *et al.*, 2002).

Os animais que receberam D-SER na SCPd também não exibiram o mesmo perfil de aprendizado de EI, comparados ao grupo controle (LQ). A D-SER exibiu o mesmo efeito de facilitação na aquisição de EI observado para a GLY, o que indica um aumento da aversividade produzida pela estimulação da SCPd através da ativação do sítio GLY-B/NMDA pelos agonistas, GLY e D-SER. Na sessão de retenção de EI, o padrão de expressão de EI da D-SER também foi semelhante ao apresentado pelos animais que receberam GLY. Estes resultados comportamentais corroboram estudos bioquímicos e eletrofisiológicos que demonstram a ação destes dois compostos no mesmo sítio receptor (Mothet *et al.*, 2000). Em adição, Nossos resultados demonstrando que a GLY e a D-SER facilitaram o aprendizado da resposta de EI no LTE estão de acordo com dados da literatura relatando que agonistas do sítio GLY-B/NMDA podem facilitar certas formas de aprendizado (Monahan *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1992).

Alguns estudos têm demonstrado que o ácido 7-Cloro-Quinurênico (7CK), antagonista seletivo do sítio GLY-B/NMDA (Kemp *et al.*, 1988), possui efeitos ansiolíticos em modelos animais de ansiedade e comportamento defensivo (Faiman *et al.*, 1994; Trulas *et al.*, 1989), e que esse efeito ansiolítico também pode ser observado após a microinjeção do 7CK na SCPd de ratos avaliados no LCE (De-Souza *et al.*, 1998; Matheus *et al.*, 1994). Também tem sido demonstrado um papel neuroprotetor deste composto na neurotoxicidade mediada pelo receptor NMDA (Foster *et al.*, 1989).

Os resultados observados no terceiro experimento demonstraram que a microinjeção de 7CK na SCPd demonstrou um efeito ansiolítico, evidenciado através do aumento do

tempo e do número de sessões necessárias para a aquisição de EI em relação ao controle (LQ), demonstrando um prejuízo na aquisição e retenção da resposta de EI no LTE. A associação da GLY com 7CK bloqueou os efeitos facilitatório e inibitório, respectivamente, destas duas drogas aplicadas isoladamente na aquisição de EI, o que corrobora a ação competitiva destes dois compostos pelo mesmo sítio receptor, bem como indica que os efeitos destes compostos são seletivos para o sítio GLY-B/NMDA.

O fato de o 7CK não ter apresentado o efeito ansiolítico caracterizado pela diminuição das latências de EI 1, 2 e 3, poderia levantar a questão se o LTE e o LCE possuem as mesmas características aversivas, uma vez que a mesma droga aplicada na mesma área cerebral demonstrou efeitos ansiolíticos apenas no LCE. Considerando-se que no LCE o tempo de exposição aos braços abertos do labirinto normalmente tende a ser maior que no LTE, devido ao procedimento experimental, isto pode indicar que realmente existe uma diferença no nível de aversividade evocado pelos dois modelos, ou seja, no LCE o tempo maior de exposição aos braços abertos tende a produzir um nível maior de aversão nos animais, e então os efeitos das drogas ansiolíticas poderiam se tornar mais claros neste modelo do que no LTE. Adicionalmente, o fato de doses de GLY tão baixas quanto 1 η mol terem produzido efeitos ansiogênicos no LTE também pode estar indicando uma maior sensibilidade deste modelo para a detecção de efeito de drogas ansiogênicas.

Na sessão de retenção de EI, o 7CK, microinjetado na SCPd, diminui a latência de EI em relação ao grupo LQ, mostrando um prejuízo na expressão da resposta de EI (Conde *et al.*, 1999; Sanson & Carobrez, 1999). Este efeito de prejuízo na memória foi bloqueado pela associação de 7CK + GLY, indicando que o efeito do 7CK na SCPd sobre a memória emocional é mediado pelo sítio GLY-B do receptor NMDA. Há alguns trabalhos na

literatura demonstrando que o 7CK administrado intracerebralmente, antes da sessão de aquisição de esquiava, inibe a formação de memória em experimento de esquiava passiva (Steele & Stewart, 1993) e prejudica a performance de ratos no Labirinto Aquático de Morris (LAM), um modelo animal de aprendizado e memória (Morris, 1984) durante a aquisição da memória espacial de referência (Bannerman *et al.* 1997).

Alguns autores têm demonstrado uma relação entre a SCP e memória. A microinjeção do neuropeptídeo arginina-vasopressina (arg-vasopressina - AVP, também conhecido como Hormônio anti-Diurético – ADH) na SCP retardou a extinção da resposta de esquiava, produzindo uma melhora da memória aversiva, em experimento utilizando o modelo experimental de esquiava ativa *shuttle-box* (Xiong *et al.*, 1994). Neste mesmo experimento, lesões eletrolíticas da SCP bloquearam a influência da AVP administrada intra-peritonealmente na melhora da memória. Estes resultados indicaram que a SCP parece ter um papel importante na ação deste neuropeptídeo na modulação da memória. Adamec (2001) demonstrou que a estimulação de baixa frequência na SCP de ratos reverteu mudanças no comportamento relacionado à ansiedade produzidas por exposição ao predador (gato). Têm sido demonstrado que essas mudanças no estado de ansiedade devem-se a uma sensibilização de longa duração de substratos neurais do comportamento defensivo, como a AM e a SCP. Segundo este autor, pode ocorrer uma sensibilização da SCP, decorrente da exposição a estímulos aversivos como a exposição ao predador, a qual medeia as modificações de longa duração no comportamento relacionado à ansiedade, induzidas por eventos estressantes (Adamec, 2001), o que pode também ser relacionado a memória aversiva ou emocional. Acrescentando a estes achados, segundo Beitz (1995) a SCP está envolvida no armazenamento de memória.

De acordo com os resultados obtidos no LTE, juntamente com os citados anteriormente, a neurotransmissão na SCP parece ter um papel importante na modulação da formação da memória emocional e sua expressão, além das já bem descritas funções relacionadas a emoções como medo e ansiedade. É também importante ressaltar que a SCP tem uma grande diversidade de conexões, o que pode dar suporte às distintas funções atribuídas à SCP (Carobrez *et al.*, 2002; Beitz & Shepard, 1985). Através de suas conexões a SCP pode estar influenciando algumas áreas cerebrais relacionadas à formação e armazenamento de memória como o córtex pré-frontal (PFC) (Bandler *et al.*, 2000), a AM (Rizvi *et al.*, 1991); e através de projeções eferentes para o tálamo (Cameron *et al.*, 1995; Krout & Loewy, 2000), que por sua vez é uma grande fonte de projeções para a formação hipocampal, as quais exercem um importante papel modulatório sobre a neurotransmissão no sistema hipocampal (Canteras & Goto, 1999). Por fim, na formação hipocampal pode ocorrer a modulação do processamento mnemônico, através destas conexões. De um ponto de vista funcional, parece bastante razoável que a SCPd possua algum papel na modulação da memória emocional, considerando-se que as respostas defensivas produzidas pela ativação da SCPd tem um grande valor para a sobrevivência dos animais.

Além da SCP, outra região muito próxima, o colículo superior (CS), nos roedores, é uma região intimamente envolvida na resposta defensiva a certos tipos de estímulos aversivos (Dean *et al.*, 1989). Esta região cerebral parece ser uma conexão essencial na informação da SCP sobre tipos particulares de emergência, como estímulos visuais ameaçadores, e na preparação das reações defensivas a tais estímulos. As camadas profundas do CS possuem conexões diretas com a SCPd, nos níveis rostral e caudal desta estrutura, e esta é uma evidência neuroanatômica que sugere a existência de uma via pela qual a informação relacionada a estímulos visuais ameaçadores poderia ser conduzida do

CS para a SCP (Redgrave & Dean, 1991). A diminuição do comportamento de AR causada pela GLY nesta estrutura pode indicar que o CS também esteja envolvido na modulação de algumas respostas defensivas exibidas no LTE, como uma reação de exacerbação na percepção visual de um ambiente potencialmente aversivo. Porém, nossos resultados demonstram que o receptor GLY-B/NMDA do CS não modula todas as respostas defensivas exibidas no LTE em que a SCP está envolvida, o que pode indicar uma diferença no comportamento defensivo induzido pela estimulação destas duas estruturas.

De acordo com nossos resultados, microinjeções de GLY localizadas nas camadas profundas do CS (grupo GLY-CS), não reproduziram o mesmo perfil comportamental observado nos animais que receberam GLY na SCPd. O perfil de aprendizado de EI no grupo GLY-CS é muito similar ao do grupo LQ, exceto pela diminuição do comportamento de avaliação de risco observada na sessão de aquisição. Isto sugere que a neurotransmissão por AAE na SCPd está provavelmente envolvida na modulação de respostas exibidas no LTE, enquanto em outras áreas muito próximas, como o CS, as mesmas respostas não são observadas após a estimulação com AAE.

Recentemente, foi realizada a análise da expressão da proteína c-Fos, para o mapeamento de áreas cerebrais ativadas pela exposição de ratos ao LTE. Os animais foram analisados separadamente após a performance da tarefa de esquiva inibitória (EI) ou fuga. Observou-se uma ativação diferencial de áreas cerebrais na realização das duas tarefas; a performance da tarefa de EI aumentou a expressão de c-Fos no núcleo medial da AM, no núcleo anterior do hipotálamo e no núcleo mediano da rafe; o desempenho da tarefa de fuga aumentou a expressão de c-Fos no núcleo basolateral da Amígdala e na SCP dorsal; e ambas as tarefas promoveram ativação do núcleo paraventricular do tálamo e do núcleo dorsomedial hipotalâmico (Silveira *et al.*, 2001). Embora a ativação da SCP não tenha sido

evidenciada na performance da tarefa de EI, dois núcleos hipotalâmicos (anterior e dorsomedial) que possuem conexões com a SCP foram ativados, e existem evidências de que estas vias neurais estejam relacionadas à manifestação de comportamentos defensivos (Canteras, 2002; Fuchs & Siegel, 1984; Fuchs *et al.*, 1985). Em adição, nossos resultados utilizando estimulação da SCPd por agonistas do sítio GLY-B/NMDA demonstraram uma facilitação na aquisição de EI, sugerindo que esta estrutura pode participar na modulação do desempenho da tarefa de EI no LTE.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que compostos com ação no sítio GLY-B do receptor NMDA, aplicados na SCPd, alteram a performance dos animais no LTE, demonstrando a participação deste sítio de ligação na modulação dos processos de aquisição e expressão da resposta de esquiva inibitória, bem como reforçam o papel deste sítio receptor na modulação do comportamento defensivo e, possivelmente, na ansiedade e memória emocional.

6. CONCLUSÃO

Os compostos agonistas do sítio GLY-B/NMDA, quando microinjetados na SCPd, demonstraram efeitos ansiogênicos verificados através da facilitação da aprendizagem de esquiva inibitória (EI), confirmando e estendendo resultados prévios utilizando outros modelos animais baseados no aprendizado de respostas aversivas. Por outro lado, o antagonista deste sítio receptor prejudicou a aquisição de EI, bem como a performance na sessão de retenção de EI, onde ocorre a evocação da memória para a tarefa de EI adquirida. Os efeitos individuais da glicina (GLY, agonista GLY-B/NMDA), e do ácido 7-cloro-quinurênico (7CK, antagonista do mesmo sítio receptor) foram inibidos pela associação dos dois compostos, o que indica que os efeitos produzidos por estes compostos quando microinjetados na SCPd foi seletivo para o sítio GLY-B/NMDA.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que os compostos com ação no sítio GLY-B/NMDA na SCPd alteram a performance dos animais no LTE, o que sugere a participação deste sítio receptor na SCPd na modulação da aquisição de esquiva inibitória e sua expressão posterior (retenção de EI). Estes resultados reforçam o papel do sítio receptor GLY-B/NMDA na SCPd na modulação do comportamento defensivo e, possivelmente, na ansiedade, bem como sugerem uma participação deste sítio receptor em processos de aprendizagem aversiva e memória aversiva ou emocional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, V.C.; HILTON, S.M.; ZBROZYNA, A.W. Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defense reaction. **J. Physiol. (Lond)**. 154: 491-513, 1960.
- ADAMEC, R. Does long term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress? – Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress. **Behav. Brain Res.**, 120: 111-135, 2001.
- 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.
- BALCAR, V.J.; JOHNSTON, G.A.R. High affinity uptake of glutamine in rat brain slices. **J. Neurochem.**, 24:875-879, 1975.
- BANDLER, R.J. Induction of 'rage' following microinjection of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. **Neurosci. Lett.**, 30: 183-188, 1982.
- BANDLER, R. and McCULLOCH, T. Afferents to a midbrain periaqueductal gray region involved in the "defense reaction" in the cat as revealed by horseradish peroxidase. II. The diencephalon. **Behav. Brain Res.**, 13: 270-285, 1984.

- BANDLER, R. Identification of hypothalamic and midbrain neurons mediating aggressive and defensive behavior by intracerebral microinjections of excitatory amino acids. In: **Modulation of sensorimotor activity during alterations in behavioral states**, Edited by R. Bandler and R. Alan. Liss, New York, 1984. p. 369-392.
- BANDLER, R.J.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurons mediating defensive behavior in the rat by microinjection of excitatory amino acids. **Behav. Brain Res.**, 15: 107-119, 1985.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. 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, p. 1-8.
- 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, 175-198.
- BANDLER, R. and SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, 17(9): 379-389, 1994.
- 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.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res. Bull.**, 53: 95-104, 2000.
- BARD, P.; MACHT, M.B. The behavior of chronically decerebrate cats. In: **CIBA Foundation Symposium on Neurological Basis of Behaviour**, Edited by G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor. Churchill, London, 1958. p. 55-75.
- BANNERMAN, D.M.; BUTCHER, S.P.; GOOD, A.M.; MORRIS, R.G.M. Intracerebroventricular Infusion of the NMDA Receptor-Associated Glycine Site Antagonist 7-Chlorokynurenate Impairs Water Maze Performance but Fails to Block Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo. **Neurobiology of Learning and Memory**, 68: 252-270, 1997.
- BARBARESI, P.; MANFRINI, E. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons and terminals in the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, 27: 183-191, 1988.
- BEHBEHANI, M.M.; FIELDS, H.L. Evidence that an excitatory connection between periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Res.**, 170: 85-93, 1979.
- BEHBEHANI, M.M.; JIANG, M.; CHANDLER, S.D.; ENNIS, M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in rat. **Pain**, 40: 195-204, 1990.
- BEITZ, A.J. The organization of afferent projections to the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, 7: 133-159, 1982.
- BEITZ, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **J. Comp. Neurol.**, 237: 445-459, 1985.

- BEITZ, A.J.; MULLET, M.A.; BRANDT, N. The relationship of periaqueductal gray projections to bulbospinal neurons: A combined fluorogold-PHA-L analysis. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 14: 856, 1988.
- BEITZ, A.J. Periaqueductal Gray. In: **The Rat Nervous System**. Second edition. Edited by G. Paxinos, Academic Press, 1995. p. 173-182.
- BEITZ, A.J.; BUGGY, J.; TERRACIO, L.; WELLS, W.E. Autoradiographic localization of opiate, beta-adrenergic, cholinergic and GABA receptors in the midbrain periaqueductal gray. **Neurosci. Abstr.**, 8: 265, 1982.
- 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.; 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**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler. Plenum Press, New York, 1991, p. 305-327.
- 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, 1987. pp. 213-216.
- BENNETT, M.R.; BALCAR, V.J. Forty years of amino acid transmission in the brain. **Neurochemistry Internacional**, 35: 269-280, 1999.
- BHARGAVA, H.N. Enhancement of morphine actions in morphine-naive and morphine-tolerant mice by LY 235959, a competitive antagonist of the NMDA receptor. **Gen. Pharmacol.**, 28: 61-64, 1997.

- BITTENCOURT, A.S., CAROBREZ, A.P., SCHENBERG, L.C. Intrinsic properties of lateral and dorsolateral columns of periaqueductal gray matter. **Soc Neurosci Abstr**, 18: 2257, 2000.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. **J. Comp. Psychol.**, 103: 70-82, 1989.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; RODGERS, R.J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: **Animal Models in Psychopharmacology**, Edited by B. Olivier, J. Mos, J.L. Slagen. Birkhauser, Basel, 1991. pp. 117-134.
- 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.
- BLANCHARD, D.C.; HYND, A.L.; MINKE, K.A.; BLANCHARD, R.J. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 25: 761-770, 2001.
- BLANPIED, T.A.; BOECKMAN, F.A.; AIZENMAN, E.; JOHNSON, J.W. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. **J. Neurophysiol.**, 77:309-323, 1997.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: A novel neuronal messenger. **Neuron**, 8: 3-11, 1992.
- BURES, J. AND HUSTON, J.P. Physiological psychology research. In: **Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior**, Edited by BURES, J.A., O. BURESÓVÁ and J.P. HUSTON. New York, 1983. pp. 1-6.

- CALIXTO, A.V.; VANDRESEN, N.; DE NUCCI, G.; MORENO JR, H; FARIA, M.S.
Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain Res. Bull.**, 55,1:
37-42, 2001.
- CAMERON, A.A.; KHAN, I.A.; WESTLUND, K.N.; CLIFFER, K.D.; WILLIS, W.D. The
efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-
leucoagglutinin study. I. Ascending projections. **J. Comp. Neurol.**, 351: 568-584, 1995.
- CANTERAS, N.S.; GOTO M. Connections of the Precommissural Nucleus. **J. Comp.
Neurol.**, 408: 23-45, 1999.
- CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization
and functional implications. **Pharm. Biochem. Behav.**, 71: 481-491, 2002.
- CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In:
Neuroscience and Behavior. Vitória, UFES, 1987. p. 21-29.
- CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of Defensive behavior
by Periaqueductal Gray NMDA/GLY_B receptor. **Neurosci. Behav. Rev.**, 25: 697-709,
2002.
- CARRIVE, P.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Flight induced by microinjection of D-
tubocurarine or α -bungarotoxin into medial hypothalamus or periaqueductal gray
matter: Cholinergic or GABAergic mediation? **Behav. Brain Res.**, 22: 233-248, 1986.
- 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.

- CONDE, C.A.; COSTA V.; TOMAZ, C. Measuring Emotional Memory in the Elevated T-Maze Using a Training-to-Criterion Procedure. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 63: 63-69, 1999.
- CONTI, F.; BARBARESI, P.; FABRI, M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions 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.; MONAGHAN, D.T.; OTTERSEN OP. And STORM-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory aminoacid receptors and their pathways. **Trends Neurosci**, 10: 273-280, 1987.
- COTMAN, C.W.; MONAGHAN, D.T.; GANONG, A.H. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. **Annu. Rev. Neurosci.**, 11:61-80, 1988.
- 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.
- DANYSZ, W.; WROBLEWSKI, J.T.; BROOKER, G.; COSTA, E. Modulation of excitatory amino acid transmission by phencyclidine and glycine in the rat cerebellum in vivo. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 13: 383, 1987.

- DANYSZ, W.; WROBLEWSKI, J.T.; BROOKER, G.; COSTA, E. Modulation of glutamate receptors by phencyclidine and glycine in the rat cerebellum: cGMP increase in vivo. **Brain. Res.**, 479: 270-276, 1989.
- DANYSZ W.; PARSONS C.G. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol. Rev.**, 50: 597-664, 1998.
- DEAN, P.; REDGRAVE, P.; WESTBY, G.W.M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. **Trends Neurosci.**, 12: 137-147, 1989.
- DELOREY, T.M.; OLSEN, R.W. GABA and Glycine. In: **Basic Neurochemistry**. 4th ed. Raven Press, New York, 1989. p.: 389-399.
- DE-OLIVEIRA, R.M.W.; DEL BEL E.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. **Neurosci. Behav. Rev.** (in press), 2002.
- DE-SOUZA, M.M.; SCHENBERG, L.C.; CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled Periaqueductal gray receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behav. Brain Res.**, 90: 157-165, 1998.
- DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F. The Glutamate Receptor Ion Channels. **Pharmacol. Rev.**, 51 (1): 8-51, 1999.
- EBERHART, J.A.; MORREL, J.I.; KRIEGER, M.S.; PFAFF, D.W. An autoradiographic study of projections ascending from the midbrain central gray, and from the region lateral to it, in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 241: 285-310, 1985.

- EISENBERG, E.; PUD, D. Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine? **Pain**, 74: 337-339, 1998.
- ELIASSON, S.; LINDGREN, P.; UVNAS, B. The hypothalamus , a relay station of the sympathetic vasodilator tract. **Act. Physiol. Scand.**, 31: 290-300, 1954.
- ELISSON, G.D.; FLYNN, J.P. Organized aggressive behavior in cats after surgical isolation of the hypothalamus. **Arch. Ital. Biol.**, 106: 1-20, 1968.
- FANSELOW, M. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler. Plenum Press, New York, 1991.
- FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W. Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in the cat. **J. Physiol. (Lond.)**, 160: 200-213, 1962.
- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochem.**, 42: 1-11, 1984.
- FOSTER, A.C.; KEMP, J.A. HA-966 antagonizes N-methyl-D-aspartate receptors through a selective interaction with the glycine modulatory site. **J. Neurosci.**, 9: 2191-2196, 1989.
- FOSTER, A.C.; WILLIS, C.L; TRIDGETT, R. Protection against N-methyl-D-aspartate receptor – mediated neuronal degeneration in rat brain by 7-chlorokynurenate and 3-amino-1-hydroxy-pyrrolid-2-one, antagonists at the allosteric site for glycine. **Eur. J. Neurosci.**, 2: 270-277, 1989.

- FUCHS S.A.; EDINGER, H.M.; SIEGEL, A. The organization of the hypothalamic pathways mediating affective defense behavior in the cat. **Brain Res.**, 330: 77-92, 1985.
- FUCHS, S.A.; SIEGEL, A. Neural pathways mediating hypothalamically elicited flight behaviour in the cat. **Brain Res.**, 306: 263-281, 1984.
- GELLEN, B.; GYORGY, L.; DODA, M. Influence of the surgical isolation of the hypothalamus on oxotremorine-induced rage reaction and sympathetic response in the cat. **Act. Physiol. Acad. Sci. Hung.**, 42: 195-202, 1972.
- GOODCHILD, A.K.; DAMPNEY, R.A.L.; BANDLER, R. A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. **J. Neurosci. Meth.**, 6: 351-363, 1982.
- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 14: 239-265, 1981.
- GRAEFF, F.G. The anti-aversive action of minor tranquilizers. **Trends Pharmacol. Sci.**, 5: 230-233, 1984.
- GRAEFF, F.G. Animal models of aversion. In: **Selected models of anxiety, depression and psychosis**, Edited by P. Simon, P. Soubrié and D. Willacher. Karger, Basel, 1988. p. 115-141.
- GRAEFF, F.G.; CAROBREZ, A.P.; SILVEIRA, M.C.L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: **Frontiers in excitatory amino acids research**. Liss, New York, 1988. p. 325-332.

- GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: **Handbook of Anxiety, vol. 3: The Neurobiology of Anxiety**, Edited by G.D. Burrows, M. Roth and R. Noyes Jr. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990. p. 307-354.
- GRAEFF, F.G. Role of 5HT in defense behavior and anxiety. **Rev. Neurosci.**, 4: 181-211, 1993 a.
- GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 26: 67-70, 1993 b.
- GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an animal model of anxiety. **Neurosci. Behav. Rev.**, 23: 237-246, 1998.
- GRAY, J.A. **The neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system.** Oxford University Press, Oxford, 1982.
- GRAY, J.A. **The psychology of fear and stress.** Second edition. Cambridge University Press, New York, 1987.
- GREENAMYRE, J.T.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B. Quantitative autoradiographic distribution of L-[³H] glutamate binding sites in rat central nervous system. **J. Neurosci.**, 4: 2247-2258, 1984.
- GREENAMYRE, J.T.; MARAGOS, W.F.; ALBIN, R.L.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, 12: 421-430, 1988.
- 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.

GUNDLACH, A.L. Regional subdivisions in the midbrain periaqueductal gray of the cat revealed by *in vitro* receptor autoradiography. In: **The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization**, Edited by A. Depaulis and R. Bandler, Plenum Press, New York, 1991.

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.

HANAFY, K.A.; KRUMENACKER, J.S.; MURAD, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.**, 7(4): 801-819, 2001.

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.

HASHIMOTO, A.; NISHIKAWA, T.; OKA, T.; TAKAHASHI, K. Endogenous D-Serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. **J. Neurochem.**, 60: 783-786, 1993.

HESS, W.R.; BRÜGER, M. Das subkorticale Zentrum den affektiven Abwehrreaktion. **Acta Helv. Physiol.**, 1: 33-52, 1943.

HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. Bases Neuroanatômicas da Ansiedade. Em: **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Editores: L.A.B. Hetem & F.G. Graeff, Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, RJ, 1997. p. 155-171.

- HILTON, S.M.; REDFERN, W.S. A search for brainstem cell groups integrating the defense reaction in the rat. **J. Physiol.**, 378: 213-228, 1986.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors, **Ann. Rev. Neurosci.**, 17: 31-108, 1994.
- HOLSTEGE, G.; COWIE, R.J. Nucleus prepositus hypoglossi projects to the dorsolateral PAG: a link between visuomotor and limbic systems. **Soc. Neurosci. Abst.**, 16: 3033, 1990.
- HUNSPERGER, R.W. Affkreationen auf elektrische reisierung in hirmstamm der katse. **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta**, 14: 70-92, 1956.
- HUNTER, J.C.; ATWAL, P.; WOODRUFF, G.N.; SINGH, L. Differential modulation of kappa and mu opioid antinociception by the glycine/NMDA receptor agonist Dserine. **Br. J. Pharmacol.**, 112: 1002-1003, 1994.
- ISHIMARU, M.J.; TORU, M. The glutamate hypothesis of schizophrenia: Therapeutic implications. **CNS Drugs**, 7: 47-67, 1997.
- JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Glycine potencies the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, 325: 529-531, 1987.
- JÜRGENS, U.; RICHTER, K. Glutamate-induced vocalization in the squirrel monkey . **Brain Res.**, 373: 349-358, 1986.
- KAUFMAN, G.D.; ANDERSON, J.H.; BEITZ, A.J. Fos-defined activity in brainstem following centripetal acceleration. **J. Neurosci.**, 12: 4489-4500, 1992.
- KELLER, A.D. Autonomic discharges elicited by physiological stimuli in midbrain preparations. **Am. J. Physiol.**, 100: 576-586, 1932.

- KELLY, A.H.; BEATON, L.E.; MAGOUN, H.W. A midbrain mechanism for facio-vocal activity. **J. Neurophysiol.**, 9: 181-189, 1946.
- KEMP, J.A., FOSTER, A.C.; LEESON, P.D.; PRIESTLY, T.; TRIDGETT, R.; IVERSEN, L.L.; WOODRUFF, G.N. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 6547-6550, 1988.
- 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.
- KESSLER, M.; BAUDRY, M.; TERRAMANI, T.; LYNCH, G. Complex interaction between a glycine binding site and NMDA receptors (abstract). **Soc. Neurosci.**, 13: 750, 1987.
- KESSLER, M.; TERRAMANI, T.; LYNCH, G.; BAUDRY, M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: Characterization and identification of a new class of antagonists. **J. Neurochem.**, 52: 1319-1328, 1989.
- KEW, N.C.J.; KOESTER, A.; MOREAU, J.-L.; JENCK, F.; OUAGAZZAL, A.-M.; MUTEL, V.; RICHARDS, G.; TRUBE, G.; FISCHER, G.; MONTKOWSKI, A.; HUNDT, W.; REINSCHIED, R.K.; PAULY-EVERS, M.; KEMP, J.A.; BLUETHMANN, H. Functional Consequences of Reduction in NMDA Receptor Glycine Affinity in Mice Carrying Targeted Point Mutations in the Glycine Binding Site. **J. Neurosci.**, 20 (11): 4037-4049, 2000.

- KLECKNER, N.W.; DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptor expressed in *Xenopus* oocyte. **Science**, 241: 835– 837, 1988.
- 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.
- KROUT, K.E.; LOWEWY, A.D. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. **J. Comp. Neurol.**, 424: 111-141, 2000.
- LEESON, P.D. Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: **Drug Design for Neuroscience**. Raven Press, New York, 1993. p. 339-381.
- LEESON, P.D.; IVERSEN, L.L. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potencial. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 37, nº. 24, 1994.
- LINDGREN, P. The mesencephalon and the vasomotor system. **Acta Physiol. Scand.**, 35 (121): 1-183, 1955.
- LINDGREN, P.; ROSEN, A.; STRANDBERG, P.; UVNAS, B. The sympathetic vasodilator outflow – a cortico-spinal autonomic pathway. **J. Comp. Neurol.**, 105: 95-109, 1956.
- LIPSKI, J.; BELLINGHAM, M.C.; WEST, M.J.; PILOWSKY, P. Limitations of the technique of pressure microinjection of excitatory amino acids for evoking responses from localized regions of the CNS. **J. Neurosci. Meth.**, 26: 169-179, 1988).
- MAES, M.; DEBACKER, G.; SUY, E.; MINNER, B. Increased plasma serine concentrations in depression. **Neuropsychobiology**, 31: 10–15, 1995.

- MANTYH, P.W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: A Nissl, Weil and Golgi analysis. **J. Comp. Neurol.**, 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.
- MAREK, P.; BENELIYAHU, S.; GOLD, M.; LIEBESKIND, J.C. Excitatory amino acid antagonist (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. **Brain Res.**, 547: 77-81, 1991.
- 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 (3-4): 565-569, 1994.
- MATSUI, T.; SEKIGUSHI, M.; HASHIMOTO, A.; TOMITA, U.; NISHIKAWA, T.; WADA, K. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: The effect in cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. **J. Neurochem.**, 65: 454-458, 1995.
- MCCULLOCH, J. Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 34(2):106-114, 1992.
- MCGEER, P.L. and MCGEER, E.G. Amino acid neurotransmitters. In: **Basic Neurochemistry**, Edited by G. Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers and P. Molinoff. 4th ed. Raven Press, New York, 1989. p. 311-332.
- MELDRUM, B. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. **Clin. Sci.**, 68:113-122, 1985.

- MELLER, S.T. and DENNIS, B.J. Afferent projections of the periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience*, 19: 927-964, 1986.
- MELLER, S.T. and DENNIS, B.J. Quantitative Nissl study of the neuronal types and recognition of cytoarchitectural subdivisions, within the rabbit periaqueductal gray. *J. Comp. Neurol.*, 302: 87-99, 1990.
- 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.
- MONAHAN, J.B.; HANDELMANN, G.E.; HOOD, W.F.; CORDI, A.A. D-Cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharm. Biochem. Behav.*, 34: 649-653, 1989.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol.*, 48: 254-260, 1955.
- MORONI, F.; ALESIANI, M.; FACCI L.; FADDA E.; SKAPER, S.D.; GALLI, A.; LOMBARDI, G.; MORI, F.; CIUFFI, M.; NATALINI, B.; PELLICCIARI, R. Thiokynurenates prevent excitotoxic neuronal death in vitro and in vivo by acting as glycine antagonists and as inhibitors of lipid peroxidation. *Eur. J. Pharmacol.*, 218:145-151, 1992.
- MORRIS, R.G.M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, 11, 1: 47-60, 1984.
- 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.

- MOTHET, J.P.; PARENT, A.T.; WOLOSKER, H.; BRADY JR, R.O.; LINDEN, D.J.; FERRIS, C.D.; ROGAWSKI, M.A.; SNYDER, S.H. D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 97, 9: 4926-4931, 2000.
- NAITO, S.; UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. **J. Neurochem.**, 44: 689-693, 1985.
- NASHOLD Jr, B.S.; WILSON, N.P.; LAUGHTER, G.S. The midbrain and pain. In: **Advances in Neurology**, vol. 4: **Internacional Symposium on Pain**, Edited by J.J. Bonic, Raven Press, New York, 1974. p. 191-196.
- NICHOLLS, D.G. Release of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. **J. Neurochem.**, 52: 331-341, 1989.
- OMORI, N.; ISHIMOTO, T.; MUTOH, F.; CHIBA, S. Kindling of the midbrain periaqueductal gray in rats. **Brain Res.**, 903: 162-167, 2001.
- ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A.J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: Analysis using laser confocal microscopy. **Brain Res.**, 610: 317-324, 1993.
- PANKSEPP, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. In: **Handbook of Anxiety**, vol.3: **The Neurobiology of Anxiety**. Edited by G.D. Burrows, M. Roth and R. Noyes Jr., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990. p. 3-58.
- PARVIZI, J.; VAN HOESEN, G.W.; DAMASIO, A. Selective Pathological Changes of the Periaqueductal Gray Matter in Alzheimer's Disease. **Ann. Neurol.**, 48 (3): 344-353, 2000.

- PAUDICE, P.; GEMIGNANI, A.; RAITERI, M. Evidence for functional native NMDA receptors activated by glycine or D-serine alone in the absence of glutamatergic coagonist. **Eur. J. Neurosci.**, 10 (9): 2934-2944, 1998.
- PAXINOS G.; WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, fourth edition. Academic Press, San Diego, 1998.
- PETRALIA, R.S.; RUBIO, M.E.; WANG, Y.X.; WENTHOLD, R.J. Regional and synaptic expression of ionotropic glutamate receptors. In: **Handbook of chemical neuroanatomy, vol 18: Glutamate**, Edited by O.P. Ottersen and J. Storm-Mathisen Elsevier Science, Amsterdam, 2000. p.145-182.
- 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.
- PRATT, J.A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacol. Ther.**, 55: 149-181, 1992.
- PRICE, R.H.; MAYER, B.; BEITZ, A.J. Nitric oxide synthase neurons in rat brain express more NMDA receptor mRNA than non-NOS neurons. **NeuroReport**, 4: 807-810, 1993.
- RAMON Y CAJAL, S. "**Histologie des Systems Nerveux de l'Homme et des Vertébrés**". Vol. 2. Maloine, Paris, 1911.
- REDGRAVE, P.; DEAN, 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. p. 199-209.
- RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M.M.; SHIPLEY, M.T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J. Comp. Neurol.**, 303: 121-131, 1991.

- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, Methodology and ethology. In: **Ethology and Psychopharmacology**, Edited by S.J. Cooper and C.A. Hendric. Wiley, New York, 1994. p. 9-44.
- ROSSETTI, Z.L.; CARBONI, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, 283: 177-183, 1995.
- ROSETH, S.; FYKSE, E.M.; FONNUM, F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effects of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. **J. Neurochem.**, 65: 96-103, 1995.
- SANDKÜLER, J. Induction of the proto-oncogene c-fos as a cellular marker of brainstem neurons activated from the PAG. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization**, Edited by: A. Depaulis and R. Bandler. Plenum Press, New York, 1991.
- SANSON, L.T.; CAROBREZ, A.P. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. **Behav. Brain Res.**, 101: 59-64, 1999.
- SCHELL, M.J.; MOLLIVER, M.E.; SNYDER, S.H. D-Serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 3948-3952, 1995.
- 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.; CAROBREZ A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal Periaqueductal gray matter of rats. **Neurosci. Lett.**, 189: 93-96, 1995.
- SCHRAMM, L.P.; BIGNALL, K.E. Central neural pathway mediating active sympathetic muscle vasodilation in cats. **Am. J. Physiol.**, 221: 754-767, 1971.
- SCHWARTZ, B.L.; HASHTROUDI, S.; HERTING, R.L.; SCHWARTZ, P.; DEUTSCH, S.I. D-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. **Neurology**, 46:420-424, 1996.
- SHERMAN, A.D.; GEBHART, G.F. Pain-induced alteration of glutamate in periaqueductal central gray and its reversal by morphine. **Life Sci.**, 15: 1781-1789, 1975.
- SHIPLEY, M.T.; ENNIS, M.; RIZVI, T.A.; BEHBEHANI, M.M. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: Evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization**, Edited by: A. Depaulis and R. Bandler. Plenum Press, New York, 1991.
- SILVEIRA, M.C.L.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M. B.; SILVEIRA, R.; GRAEFF, F.G. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behav. Brain Res.**, 126: 13-21, 2001.
- SINGH, L.; OLES, R.J.; TRICKLEBANK, M.D. Modulation of seizure susceptibility in the mouse by strychnine-insensitive glycine recognition site of the NMDA receptor ion channel complex. **Br. J. Pharmacol.**, 99: 285-288, 1990.
- SKULKETY, F.M. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. **Arch. Neurol.**, 8: 609-620, 1963.

- SMITH, G.S.; SAVERY, D.; MARDEN, C.; LÓPEZ COSTA, J.J.; AVERILL, S.; PRIESTLEY, J.V.; RATTRAY, M. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 350 (1): 23-40, 1994.
- SNYDER, S.H. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. **Science**, 257: 494-496, 1992.
- STEELE, R.J.; STEWART, M.G. 7-Chlorokynurenate, an antagonist of the glycine binding site on the NMDA receptor, inhibits memory formation in they old chicks (gallus domesticus). **Behav. Neural Biol.**, 60: 89-92, 1993.
- 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.
- STONE, T.W.; CONNICK, J.H.; BURTON, N.R.; SMITH, D.A.S. Quinolinic and kynurenic acids as endogenous ligands at NMDA receptors. In: **Excitatory Amino Acid Transmission**, Edited by T.P. Hicks; D. Lodge and H. McLennan. Alan R. Liss, New York, 1987. pp. 147-152.
- STONE, T.W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. **Pharmacol. Rev.**, 45 (3): 309-379, 1993.
- SUPPLISSON, S.; BERGMANN, C. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus oocytes*. **J. Neurosci.**, 17: 4580-4590, 1997.

- TAGO, H.; McGEER, P.L.; McGEER, E.G.; AKIYAMA, H.; HERSH, L.B. Distribution of choline acetyltransferase immunopositive structures in the rat brain stem. **Brain Res.**, 495: 271-297, 1989.
- TEIXEIRA, K.V.; CAROBREZ, A.P. Effects of Glycine or (\pm)-3-Amino-1-Hydroxy-2-Pyrrolidone Microinjections Along the Rostrocaudal Axis of the Dorsal Periaqueductal Gray Matter on Rats' Performance in the Elevated Plus-Maze Task. **Behav. Neurosci.**, 113: 196-203, 1999.
- THOMPSON, L.T.; MOSKAL, J.R.; DISTERHOFT, J.F. Hippocampal-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. **Nature**, 359: 638-641, 1992.
- THOMSON, A.M. Glycine is a coagonist at the NMDA receptor/channel complex. **Prog. Neurobiol.**, 35: 53-74, 1990.
- TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.L.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Neurotransmitter interactions and cognitive functions**. Birkhaeuser Boston Inc., Cambridge, 1992. pp. 240-256.
- TREDICI, G.; BIANCHI, R.; GIOIA, M. Short intrinsic circuit in the periaqueductal gray matter of the cat. **Neurosci. Lett.**, 39: 131-136, 1983.
- 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.; SKOLNICK, P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine-insensitive glycine receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 34: 313-316, 1989.

- VEENING, J.; BUMA, P.; TER HORST, G.J.; ROELING, T.A.P.; LUITEN, P.G.M.; NIEUWENHUYS, R. Hypothalamic projections to the PAG in the rat: Topographical, immunoelectronmicroscopical and functional aspects. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization**, Edited by: A. Depaulis and R. Bandler. Plenum Press, New York, 1991.
- VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The Elevated T-Maze: A New Animal Model of Anxiety and Memory. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 49 (3): 549-554, 1994.
- VON ESSEN, C.; RYDENHAG, B.; NYSTROM, B.; MOZZI, R.; VANGELDER, N.; HAMBERGER, A. High levels of glycine and serine as a cause of the seizure symptoms of cavernous angiomas? **J. Neurochem.**, 67:260-264, 1996.
- WAMSLEY, J.K.; LEWIS, M.S.; YOUNG, W.S.; KUCHAR, M.J. Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptor in rat brain stem. **J. Neurosci.**, 1: 176-191, 1981.
- WATKINS, J.C. and EVANS, R.H. Excitatory amino acid transmitter. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 21: 165-204, 1981.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORÉ, T. Structure activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.**, 11: 25-33, 1990.
- WILLIAMS, F.G.; BEITZ, A.J. Ultrastructural morphometric analysis of GABA-immunoreactive terminals in the ventrocaudal periaqueductal gray: Analysis of the relationship of GABA terminals and the GABA_A receptor to periaqueductal gray-raphe magnus projection neurons. **J. Neurocytol.**, 19: 686-696, 1990.

- WROBLEWSKI, J.T.; FADDA, E.; MAZETTA, J.; LAZAREWICZ, J.W. Glycine and D-serine act as positive modulators of signal transduction at NMDA-sensitive glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. **Neuropharmacology**, 28: 447-452, 1989.
- XIONG, Y.; ZHANG, C.C.; ZHANG, G.H. Memory enhancing effects of argipressin and its relationship with Periaqueductal Gray. **Acta Pharmacologica Sinica**, 15: 152-154, 1994.
- YENARI, M.A.; TONG, D.C.; ALBERS, G.W. Glycine antagonists for treatment of ischemic brain injury. In: **Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia**, Edited by G.J. Terhorst and J. Korf. Humana Press, Totowa, 1997. p.127-151.
- ZANGROSSI Jr., H. AND GRAEFF, F.G. Behavioral Validation of the Elevated T-Maze, a New Animal Model of Anxiety. **Brain Res. Bull.**, 44 (1): 1-5, 1997.