JOSÉ EULALIO CABRAL FILHO

EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE TIOPENTAL E DE HIDROCORTISONA
NO STRIATUM DE RATOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE ESQUIVA
CONDICIONADA

Dissertação apresentada à Fa
culdade de Medicina de Ribeirã
rão Prêto da Universidade de
São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em Fisiol
ogia.

Ribeirão Prêto, 1973.

a minha esposa, Ivanise

a meu filho, Leo

a meus pais

a meus irmãos

dedico este trabalho

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Medi
cina de Ribeirão Preto da USP. Conteí também com a colabora
ção financeira da Universidade Federal de Pernambuco e
da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Su-
perior (CAPES).

A estas entidades, bem como, à minha orientadora
Profa. Maria C. Lico, ao Prof. Miguel R. Covian, à Profa.
Naide Teodosio, ao Prof. Waldemar Ladosky, ao Depto. de
Fisiologia da FMRP, ao Depto. de Fisiologia e Farmacolo-
gia do IBUFPE e a todos os que, de algum modo, contribui-
ram para a realização do mesmo, quero externar os meus
mais sinceros agradecimentos.

INDICE

	Página
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODO.....	12
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	48
SUMARIO.....	49
SUMMARY.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	53

1. INTRODUÇÃO

Em 1945, Brazier e Finesinger descreveram modificações características no EEG do homem, produzidas pela injeção intravenosa de barbituratos, o que aliás se tornou uso comum, por alguns anos, como meio adicional para diagnósticos psiquiátricos (Brazier e Finesinger, 1945; Schneider e Thomalske, 1956; Goldman 1959, 1962). Os barbituratos empregados inicialmente por Brazier foram os sais sódicos de amital, de tiopen-tal e de pentobarbital, em doses totais de 0.125 a 0.65g, num período de 4 min, e as alterações do EEG, similares para as 3 drogas, se caracterizaram por: 1º) atividade rápida (21 a 32 cps) e voltagem alta (25 a 100 micro-volts) para doses mais baixas; 2º) lentificação da frequência até ondas tipo delta de 3 a 4 cps., para doses mais altas. As regiões frontais, isto é, as mais recentes filogeneticamente, foram as mais vulneráveis a tais efeitos.

Importante passo foi dado na pesquisa neurofisiológica e neurofarmacológica, com o surgimento dos métodos de aplicação intracerebral de substâncias químicas sob variadas técnicas, entre as quais sobressaem: 1) a perfusão intracerebral, por meio da qual a substância (solução) é injetada em determinada região, através de uma cânula, sendo o perfusato que banhou a região, recolhido por meio de outra cânula; 2) a microinfusão, que é a injeção de mínimos volumes da substância em velocidade muito lenta (vários minutos ou horas); 3) a microinjeção, onde a injeção é bem mais rápida; 4) a aplicação de microcristais da substância, também através de cânula especial, ainda é outra técnica empregada. Deve-se dizer que cada uma delas tem suas vantagens e desvantagens, tais como velocidade de difusão no tecido cerebral, área abrangida, pressão

exercida etc. (Decima e George, 1964; Myers, 1966; Myers et al. 1971; Delgado, 1966; Marczynski, 1967; Izquierdo e Izquierdo, 1971; Kent, 1972). Por outro lado, uma vantagem comum às varias formas de aplicação intracebral de substâncias é a sua especificidade de ação o que as torna preferíveis, muitas vezes, à estimulação elétrica (Marczynski, 1967; Hull et al., 1967).

Utilizando uma técnica em que associava as cânulas para perfusão e um grupo de eletrodos para registro, num conjunto único (chemitrodes) implantado no cérebro de macacos, Delgado e Kitahata (1966) estudaram a ação da perfusão de fenobarbital, dibucaina e xilocaina sobre a atividade elétrica local em várias regiões do cerebro. Seus achados revelaram um aumento do limiar de crise e atividade elétrica local deprimida em certas regiões, e com prolongada duração: para o fenobarbital até 3 dias na amígdala e hipocampo-- estruturas mais sensíveis - e para a dibucaina, de 12 a 30 dias, nas mesmas estruturas.

Empregando tiopental sob a forma de microinfusão, e usando também "chemitrodes", em estruturas prosencefálicas no macaco, Lico (1972) verificou patentes modificações de ordem simpático-parassimpáticas, isto é, com um caráter acen tuadamente trofotrópico, levando a um quadro comportamental muito típico, caracterizado por profunda adinamia e pobreza de expressão emocional, ao qual denominou de "acinético-abúlico", pela semelhança com aquele descrito por Flügel em pacientes esquizofrênicos tratados com reserpina. As regiões nas quais o tiopental determinou positivamente tal comportamento foram os gânglios basais, especificamente, o núcleo caudado, o putamen e o globo pallidum, e o fascículo prosen

cefálico medial (FPM). A duração do efeito também foi longa e diretamente proporcional às doses do barbiturato; 4 dias para 62.5 µg e 8 dias para 125 µg.

Ultimamente, em nosso laboratório, Coimbra (1973) obteve, por microinjeção de tiopental no putamen e FPM de ratos, uma diminuição da atividade motora que persistiu até 4 horas, sendo contrabalançada com microinjeção de dopamina simultaneamente com o tiopental nas mesmas regiões.

Dos experimentos com administração intracerebral de barbituratos (bem como, do anestésico dibucaina), além das suas ações depressoras sobre a atividade neuronal ou motora, ressalta o fato de que a sua persistencia ultrapassa, de muito, a duração não só da remoção como da propria metabolização pelos tecidos. Sabe-se que o tiopental, por exemplo, injetado intravenosamente (em dose única) alcança o cérebro em cerca de 30 segundos, iniciando sua ação farmacológica, que é de pouca duração em virtude de sua remoção para os tecidos musculares e depois gordurosos que se dá entre 15 e 30 minutos; - torna-se então, inativo, embora sua degradação metabólica seja bem mais demorada (10-15%/hora), (Sharpless, 1970). No caso da microinfusão do tiopental naquelas estruturas, que praticamente constituem os gânglios basais, além do prolongado período de ação, está a obtenção daquele comportamento acinético-abúlico, até então não descrito no macaco ou não associado aos gânglios basais, no caso do homem.

Para explicar o prolongado efeito da droga não tributável a efeitos nervosos uma suposição foi a de que a mesma poderia ocasiona-lo por mecanismos desconhecidos, como por exemplo, desencadeando processos que atuassem sobre a membrana celular e se tornassem independentes da ação barbitúrica

direita, talvez por modificação dos níveis hormonais do organismo.

Em relação ao efeito comportamental a autora propõe que os gânglios basais não estão adstritos apenas à coordenação motora, como tem sido, muitas vezes ainda, apresentados na literatura. É notório que o estudo da patofisiologia dos síndromes hipercinéticos (coreia, atetose, balismo) e hipocinético-rígido (Parkinsonismo), portanto alterações motoras, é relacionado a degenerações de estruturas associadas aos gânglios basais, mais por um lado, não se dá muita atenção ao estudo do comportamento emocional ou intelectual dos pacientes e, por outro lado, são de difícil reprodutibilidade em animais de laboratório.

Na realidade o citado trabalho de Lico viria comprovar idéias que vem sendo ventiladas há certo tempo por vários pesquisadores, através das quais se supõe, além de coordenação motora, funções integradoras em nível bem mais complexo, aos gânglios basais. Partindo do princípio da complexificação do sistema nervoso à medida que se avança na escala filogenética, o mais viável, segundo a autora, será não atribuir somente funções diretas ou simplistas a determinadas estruturas pois cada uma delas já é de constituição enormemente intrínca da e ricamente interligada a outras, de modo que há sempre uma maior probabilidade de funcionamento ou atuação holística e/ou finalística. Em especial, no caso dos gânglios basais, devido a sua situação anatômica no prosencéfalo, das suas aferências e eferências, suas interconexões com o tálamo, outra intrínca da e importante estrutura no SNC etc. Refere Grossman (1967), que apesar dos núcleos basais, fazerem parte do mecanismo de resposta do organismo, com relação à postura e coordenação de movimentos, outros dados nos levam a admitir fun-

ções mais complexas, pelo menos para o caudado e o putamen. Consistentes trabalhos de Rosvold e Delgado (1956) mostraram que lesões na cabeça do caudado, do mesmo modo que na porção medial do tálamo, determinaram queda da "performance" em testes de simples - alternância, sugerindo os autores ser devido à interrupção do sistema caudado-tálamo-cortical. É também interessante referir que a indução de uma queda no desempenho - em testes de resposta retardada é semelhante à produzida por lesão no cortex órbito-frontal (Grossman, 1967). Sabe-se que estes 2 tipos de testes são de natureza mais complexa do que os de simples resposta de esquiva ou mesmo de discriminação - sensorial.

Todos os dados levam à concordância de que, pelo menos esta parte dos gânglios basais (caudado) tem funções complexas no seu desempenho "normal".

Também dignos de nota são os estudos de Buchwald et al., desde 1961 até 1967, com estimulação elétrica inicialmente (Buchwald et al. 1961, I, III e IV) e estimulação química (Hull, Buchwald e Ling, 1967). A estimulação elétrica em baixa frequência no caudado provocou atividade de fuso, rítmica, no cortex motor, bem como sono e comportamento de "parada"; a estimulação em alta frequência, por seu turno, levou a dessincronização cortical do EEG e comportamento de alerta. Com a estimulação colinérgica (carbacol) do caudado esses autores - encontraram também 2 tipos de comportamento: doses menores do que 4 µg levaram à inibição de um comportamento aprendido (semelhante à estimulação elétrica de baixa frequência). Com doses maiores que 4 µg houve excitação e intensa "raiva". Os autores propuseram então 2 sistemas opostos para o caudado: um inibitório dos processos corticais, ativado a baixa frequência ou baixas doses colinérgicas; o outro facilitatório,

estimulado por altas frequências ou altas doses colinérgicas. Como resultante, foi proposto por eles que os efeitos inibitórios seriam a função em situação "normal" do núcleo.

Aqui também deve-se falar em recentes trabalhos demonstrando que mais da metade das descargas unitárias no putamen do rato são inibitórias e só 10% são excitatórias (De Long, 1973). O mesmo autor tinha concluído, em trabalho anterior, por uma função do striatum na iniciação de movimentos aprendidos (De Long 1972).

Apesar de se concordar em grande parte na atribuição de funções complexas aos gânglios basais, é útil ter em mente, também, a influência na manutenção de uma esquiva aprendida, dado que lesão no caudado levou a facilitação da extinção da mesma, e dificuldade de reaquisição da resposta (Thompson, 1959).

Finalmente vale a pena citar Segundo e Machne (1956) quando falam do conjunto de evidências a respeito da interdependência neurofisiológica do complexo caudado-putamen (neoes-triado) e globo pallidum com várias outras regiões do SNC: "as extensas e íntimas conexões do corpo estriado com outras porções do SNC (cortex, tálamo, subtálamo, hipotálamo) sugerem que uma "função motora" pode não implicar simplesmente uma regulação de movimentos discretos, mas incluir também a participação na produção de ações complexas ou mesmo comportamentais".

Do exposto ficam, portanto, definidas duas funções principais e gerais para os gânglios basais: a de coordenação motora e a de atividade nas complexas funções adaptativas do organismo.

Colocando de modo esquemático, e naturalmente incompleto, os componentes dos gânglios basais, sua situação anatômica e suas conexões aferentes e eferentes (Kennard, 1944), teremos o seguinte:

- 1) Componentes: núcleo caudado (C); Putamen (PU)
globo pallidum (GP); substância negra (SN);

núcleo subtalâmico de Luys (NST): núcleo rubro (NR).

- 2) Situação: incluído no prosencéfalo, juntamente com o cortex cerebral e o sistema límbico.

O núcleo caudado e o putâmen constituem o neostriado (neostriatum). No rato estes 2 núcleos formam uma estrutura anatomicamente única e compacta, sendo designado por complexo caudado-putamen - CPU (conforme De Groot, 1959). Alguns autores designam todo o conjunto caudado-putamen e globo pallidum, por estriado (Striatum). No decorrer deste trabalho é neste sentido que se usará o termo Striatum. O CPU será chamado de complexo caudado-putamen ou neostriado, indiferentemente.

3) Conexões:

Como neste trabalho só se estudará o striatum (CPU e GP), apenas serão descritas as vias relacionadas a tais estruturas. Na figura 1 estão assinaladas as outras ligações do GB. (Kennard, 1944). Na figura 2 está assinalada, em separado, a importante via nigro-estriatal (do paminérgica), (conforme Ungerstedt, 1971).

CPU:

Vias aferentes de: córtex cerebral, núcleo centro-mediano do tálamo; vias somáticas e sensoriais específicas; o putamen recebe aferências do caudado e da substância negra (feixe nigro-estriatal).

Vias eferentes para: globo pallidum; substância negra.

GP:

Vias aferentes de: córtex cerebral; CPU; núcleos

intralaminares do tálamo; substância negra; núcleo subtalâmico.

Vias eferentes para: núcleos ventrais, anterior e centro-mediano do talâmo; córtex cerebral; núcleo subtalâmico; hipotálamo; substância negra; formação reticular; núcleos motores dos pares cranianos.

Num estudo do striatum é conveniente ter em conta a distribuição de monoaminas pois ele é riquíssimo nesses neurotransmissores. Há variações nos achados de autor para autor e também de espécie para espécie (Kety, 1970). No rato, (Broch Jr. e Marsden, 1972) dão as seguintes concentrações de norepinephrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5 HT) no CPU e GP (em µg/g peso úmido):

	NE	DA	5HT
GP	0.40	1.36	0.77
CPU	0.18	6.71	

De fato, depois dos trabalhos com histofluorescência de Dahlström e Fuxe, para determinação da existência de monoaminas, grande número de autores tem pesquisado este assunto e dois fatos são muito consistentes. O primeiro, é que o striatum contém a maior concentração de DA do cérebro (cerca de 80% está ali); segundo, a via nigro-estriatal contém os corpos neuronais na substância negra, mas nesta a concentração de DA é baixa em relação à grande quantidade que se encontra nos sinaptosomas dentro do striatum (Fuxe, 1965).

Partindo daqueles dados e suposições inicialmente apresentados, bem como das referências que acabaram de ser expostas, esta pesquisa se propõe investigar as seguintes hipóteses de trabalho: 1ª) se, ou até que ponto, a ação duradoura do tiopental poderia ser explicada por um mecanismo

Fig. 1 - Desenho esquemático dos gânglios basais e suas conexões. (segundo Kennard, J. Neurophysiol., 1944)

Fig. 2 - Via dopaminérgica nigro-estriatal no rato (segundo U. Ungerstedt, Acta Physiol. Scand. 1971, supplementum 367)

hormonal; 2º) se, no rato, o tiopental injetado nas mesmas estruturas que determinaram o síndrome acinético-abúlico no macaco, determinaria também alterações comportamentais que pudessem ser atribuídas a funções mais complexas que simplesmente as de coordenação motora.

Ora, há poucas décadas já estava clara e conhecida a ação do sistema nervoso sobre os processos hormonais, sendo assunto tratado classicamente mesmo em livros-textos. A ação inversa, isto é, dos hormônios sobre o SNC somente há bem menos tempo começou a ser explorada e, de fato, hoje se pode dizer que existe bastante literatura a respeito, principalmente relativa ao sistema hipotálamo-hipófise-adrenal. Vários são os trabalhos que tratam da ação de hormônios hipofisários ou adrenais (adrenocorticais) sobre o sistema nervoso (Woodbury, 1958; De Wied 1966; Levine, 1971). Especialmente em relação à hidrocortisona aplicada diretamente no cérebro há os de Woodbury, Timiras e Vernadakis, 1957; Covian, Lico e Antunes-Rodrigues, 1963; Chambers, Freedman e Sawyer, 1963; estes autores demonstraram que aquela substância leva a um aumento da excitabilidade cerebral espontânea ou evocada. Slusher, Hyde e Laufer, em 1965, também demonstraram que a injeção intracerebral de hidrocortisona em gatos provoca aumento da taxa de descargas unitárias neuronais espontâneas no diencéfalo e mesencéfalo; a microinfusão intracerebral deste hormônio provocou também aumento de excitabilidade (Feldman, 1971).

Assim sendo, o presente trabalho foi desenvolvido aplicando-se tiopental, hidrocortisona e associação de tiopental e hidrocortisona sob a forma de microinjeção no striatum de ratos e procurou-se investigar as possíveis alterações comportamentais sobre o aprendizado. Para isto foi empregada a

técnica de condicionamento de uma resposta de esquiva e avaliou-se o desempenho do animal em função do efeito das substâncias injetadas. Apesar de a esquiva a um choque elétrico ser considerada uma tarefa simples e, como foi referido anteriormente, não haver senão poucas referências à ação dos GB nessa situação (Thompson, 1959), justificou-se o trabalho em vista de se pesquisar um assunto não totalmente esclarecido e mesmo porque a situação de esquiva montada neste experimento parecia comportar certa complexidade, dado que só a metade dos ratos alcançavam a "performance" mínima (75% de respostas de esquiva à barra) e, mesmo assim, após 240 a 360 ensaios.

2. MATERIAL E METODO

Foram usados 11 ratos albinos, Wistar, machos, de peso entre 200 e 250 g, no momento dos testes. 8 desses ratos foram testados com injeção no CPU e 3 com injeção no GP.

2.1 Treinamento para aquisição de um desempenho estável.

Foi realizado o treinamento dos animais para aquisição de um desempenho estável de, no mínimo, 75% de respostas de esquiva, por 3 sessões consecutivas, critério este adotado para se considerar consolidado o aprendizado. Para isto cada animal foi submetido diariamente, e no mesmo horário, a uma situação de esquiva ativa sinalizada, constituída de uma sessão de 20 ensaios de estímulos condicionado-incondicionado (EC-EI). Empregou-se um programador eletro-mecânico LEHIGH VALLEY ELECTRONICS (LVE) (Fig 3) que permitia montar o esquema de estímulos desejado, e manter em nível constante, a corrente elétrica para o choque (estímulo incondicionado - EI); o número de esquivas era registrado automaticamente. Conectada eletricamente ao programador estava a câmara de condicionamento, que media 20X20X25 cm, era obscurecida interiormente e tinha um visor no teto para observação do animal pelo experimentador; pelo seu soalho, de barras metálicas paralelas, era liberado o choque; o abaixamento de uma alavanca interna determinava o desligamento do circuito pospondo ou interrompendo o choque (esquiva ou fuga respectivamente); um pouco acima da alavanca uma lâmpada de 5w apresentava o sinal luminoso (estímulo condicionado - EC).

Na situação de esquiva o sujeito experimental era

colocado na câmara de condicionamento, (Fig 4) onde se lhe apresentava o esquema de estimulação em cada um dos 20 ensaios, constituído de 9 s de EC, associado nos últimos 5 s ao EI. A intensidade de corrente do choque era constante em 0.5 mA, C.A. O intervalo inter-ensaios era fixo, durando 16 s; a duração total de uma sessão era, portanto, 500 s. A condição de esquivas era o apertar a barra nos primeiros 4 s de cada ensaio, o que determinava o desligamento do circuito, com o consequente encerramento do sinal luminoso e eliminação do choque relativo àquele ensaio. Com esta posposição do EI o animal ficava, portanto, com um período de prêmio de, pelo menos, 25 s. O apertar a barra durante o choque (resposta de fuga), também desligava o circuito, interrompendo ambos os estímulos. Quando o animal continuava pressionando a alavanca ou voltava a pressioná-la no intervalo inter-ensaio era recolocado no centro da câmara. Aqueles que, após as 5 primeiras sessões de treinamento não demonstravam, pelo menos 20% de esquivas eram eliminados do experimento. Os que atingiam este nível, continuavam até atingirem o critério de consolidação exigido. Para isto foram necessárias de 12 a 18 sessões.

2.2 Implantação de cânulas-guia transcranianas

O rato era anestesiado com nembital (40 mg/kg de peso) por via intraperitoneal e colocado adequadamente no aparelho estereotáxico (David Kopf, para pequenos animais). A seguir era exposto o osso craneano por incisão longitudinal da pele e rebatimento bilateral; o periosteio -

Fig. 3 - Programador eletromecânico
LEHIGH VALLEY ELECTRONICS
(LVE) e câmaras de esquiva

Fig. 4 - Câmara de esquiva, com o teto aberto,
para visão interna da mesma e do ani-
mal. Na situação experimental o teto
era coberto, como na câmara ao lado.

era removido por raspagem. Tomando-se como referência o atlas estereotáxico de De Groot, marcava-se, no osso, o ponto determinado para implantação da cânula-guia, e ali, se efetuava uma trepanação com o auxílio de uma broca de dentista, com o cuidado de não lesar o cérebro. A cânula-guia era de aço inoxidável, com 7 mm de comprimento, confeccionada a partir de agulha de injeção hipodérmica de calibre 7. Pelo orifício trepanado, cujo diâmetro era igual ao diâmetro externo da cânula, esta era introduzida verticalmente, com o auxílio do aparelho estereotáxico e de tal maneira que apenas ultrapassasse a dura-mater. Assim, 6 mm da mesma ficavam acima do crânio. Este procedimento visava deixar a região a estudar livre de possíveis alterações teciduais pela presença prolongada de um objeto estranho.

As implantações que visavam a injeção no CPU foram unilaterais em 6 ratos e bilaterais em 2. As que visavam o GP foram unilaterais, e somente em 3 animais.

A cânula era fixada ao osso, primeiramente com cimento de zinco oxifosfato e, após a secagem deste, com uma cobertura de acrílico autopolimerizável, formando um bloco único. Para melhor fixação do conjunto ancorava-se o mesmo em um pequeno parafuso de bronze previamente implantado no crânio, mas sem ultrapassar a tábua ossea (Fig 5). Com a finalidade de evitar ou diminuir problemas de obstrução da cânula colocava-se um mandril de arame de aço ductil, dobrado superiormente e penetrando ajustadamente no interior da mesma até o seu limite inferior. Ao fim da operação aplicava-se - uma injeção intramuscular de benzetacil suspensão (40 000 U). Esta injeção ainda era aplicada, em dias alternados no período pós-operatório (4 a 6 dias), e se necessário, durante o

período de testes.

2.3 Retreino

Recuperados cirurgicamente, os ratos eram treinados novamente, na mesma situação de esquiva do período de treinamento. Desde que respondessem ao nível de desempenho mínimo de 75% de esquivas, em duas sessões consecutivas, eram introduzidos na fase de testes.

2.4 Fase de testes

Era a fase da experiência em que os animais recebiam a injeção intracerebral das drogas e logo depois, se submetiam novamente à situação de esquiva padronizada, isto é, igual ao treino e retreino.

Foram injetadas 4 soluções:

- 1) Solução fisiológica pura
- 2) Solução de tiopental sódico a 2.5% (Pentothal Sodium; Thiopental Sodium for injection, ABBOT)
- 3) Solução de hidrocortisona a 0.1% (Flebocortid: Hemissuccinato sódico de hidrocortisona, RICHTER)
- 4) Associação das soluções de tiopental com hidrocortisona a 5% e 0.2%, respectivamente, a fim de injetar-se volume e dose iguais às aquelas usadas separadamente.

Utilizou-se, como diluente, em todos os casos, solução fisiológica. O volume injetado foi constante, de 1 mi-

erolitro (1 μ l), portanto equivalente a 25 microgramas (25 μ g) de tiopental e/ou 1 micrograma de hidrocortisona. O intervalo entre as injeções no mesmo animal e na mesma estrutura foi de 24 h e a sequencia: solução fisiológica, tiopental, associação tiopental/hidrocortisona e hidrocortisona pura. Esta última só foi testada em 5 animais (no CPU) e em 1 (no GP). Cada estrutura (CPU ou GP) foi injetada uma só vez por cada solução e na sequencia e intervalo acima mencionados.

Para a realização da injeção conectava-se uma seringa microlitro de Hamilton com uma agulha odontológica, através de um tubo de polietileno PE-10, de 30 cm de comprimento e enchia-se o sistema com a solução desejada; a seguir retirava-se o mandril da cânula-guia, verificava-se a permeabilidade da mesma e, com cuidadosa contenção manual do rato, introduzia-se a agulha odontológica dentro da cânula até atingir o plano horizontal predeterminado (Fig 6). Para o CPU as coordenadas previstas foram: vertical (V): 8.2; lateral (L): 2.0 ou 3.0; horizontal (H): + 2.0 ou + 0.5. Para o GP: vertical: 7.0; lateral: 3,0; horizontal: 0.0. (atlas de De Groot). Atingido o sítio em questão começava-se imediatamente a injetar a solução, com a duração de 2 min, procurando-se manter uma velocidade constante.

20 a 30 min previamente a cada sessão experimental se procedia a um preteste para verificar o desempenho do sujeito pouco antes de receber a droga, o que levou a um experimento pareado, sendo cada sujeito controle de si mesmo em relação à solução injetada.

Os testes de esQUIVA foram levados a efeito durante os seguintes períodos após a administração da solução:

Fig. 5 - Rato com cânulas implantadas bilateramente

Fig. 6 - Sistema montado para a microinjeção intracerebral

CPU

Para 3 animais: uma sessão - (0 a 500 s)

Para 5 animais: tres sessões - (0 a 500 s)

(600 a 1100 s)

(1200 a 1700 s)

GP

Para 3 animais: uma sessão (0 - 500 s). Portanto - isto levou a que os 3 primeiros injetados no CPU e os 3 únicos injetados no GP se submetessem a apenas uma sessão (aproximadamente 8 minutos) para cada teste, e os 5 restantes injetados no CPU se submetessem a 3 sessões consecutivas para cada teste, separadas uma da outra por um período de 2 min, intervalo que foi estabelecido entre as sessões. Estas 3 sessões, portanto, cobriam um período de 28 minutos.

Durante os pretestes e testes foi registrado o número de esquivas por sessão, o período de latência da resposta de esquiva, é observado e anotado o comportamento motor - mais claramente manifesto, como possíveis déficits, movimentos rotatórios ou atitudes estereotipadas.

Ao fim do experimento, cada rato foi sacrificado por anestesia de mebutal, perfundido o cérebro com solução fisiológica e formalina e após retirado o mesmo, fixado em formalina a 10%. A determinação do traço da injeção intracerebral e do local injetado foi feita por observação direta através de corte do cérebro em secções de 25 μ em micrótomo de congelação. Para alguns cérebros foi feito tratamento histológico usando-se para coloração a técnica de Weigert modificada por Eros Erhart, 1961 (Figs 7, 8 e 9).

O tratamento estatístico empregado neste trabalho foi feito somente para a análise do desempenho dos animais

que receberam injeção no CPU, por motivos que serão esclarecidos na exposição dos resultados.

Tendo em vista tratar-se de um tipo de resposta comportamental "sim" ou "não" e o experimento ser pareado, utilizou-se o teste não-paramétrico "da soma dos postos" de Wilcoxon (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test), ao nível de significância de 0.05, em forma bicaudal.

Fig. 7 - Traço da cânula (injeção) no CPU direito, em situação mais medial

Fig. 8 - Traço da cânula de injeção no CPU esquerdo, em situação mais lateral e profunda

Fig. 9 - Traço da cânula de injeção no GP

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos da microinjeção no CPU

3.1.1 Solução Fisiológica

Por motivo de se empregar solução fisiológica como diluente das substâncias experimentais, ela foi também injetada isoladamente com o objetivo de estudar-se possíveis efeitos que pudessem interferir na ação daquelas substâncias, servindo portanto, também, como um teste-controle.

A tabela Ia mostra que após a injeção da solução fisiológica houve só discretas alterações no desempenho da esquiva: 3 animais, apresentaram algum decréscimo em relação aos controles preteste, sendo o de mais baixo índice, igual a 60% (12 respostas em uma sessão). Nas 7 injeções restantes o nível preteste foi mantido ou mesmo superado. Note-se também que tanto no preteste como sob a ação da solução fisiológica vários animais tiveram taxa de resposta mais alta do que o pre-requisito mínimo considerado estável (75% ou 15 respostas por sessão). As médias do grupo nas duas situações também foram maiores do que aquele mínimo: 16.0 para o preteste e 15.4 para a solução fisiológica, (Fig 10). Finalmente verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre ambas as situações. Pode-se, portanto, dizer, que a solução fisiológica, quando injetada no CPU não provoca alteração no desempenho de uma esquiva ativa aprendida, - na situação experimental estudada.

O período médio de latência, definido como a media das latências de cada resposta de esquiva de um animal nos

20 ensaios de uma sessão, apresentou grande variação, para os diferentes animais; isso, tanto no preteste como sob a ação da solução fisiológica, o que é mostrado na tabela Ib. Aliás, para a solução fisiológica a variabilidade foi maior, pois a amplitude vai de 0.0 s a 1.4 s, com média geral do grupo de 0.5 s. A amplitude de variação do preteste foi de 0.0 s a 0.9 s, com média geral de 0.4s.

Finalmente, não foram observadas alterações motoras ou movimentos estereotipados. Os efeitos da solução fisiológica, só foram estudados durante os 8 primeiros minutos seguintes à injeção (uma sessão-teste).

3.1.2 Efeitos do tiopental

O tiopental (25 µg) provocou nítidos efeitos, pelo menos nos 8 minutos consecutivos à injeção, como pode ser visto na tabela Ia. Para 8 das injeções, (6 sujeitos, sendo 2 com cânulas bilaterais), verifica-se um decréscimo substancial do desempenho quando comparado ao preteste correspondente. Naqueles animais a taxa de respostas caiu para níveis entre 10 a 55% (2 a 11 esquivas). É certo que a amplitude de variação foi grande, mas isso torna-se menos significativo se for observado que para a metade de todo o grupo o desempenho está abaixo de 35% (2 a 7 respostas). Note-se ainda que no animal com 2 respostas o seu desempenho preteste tinha sido baixo - só 12 respostas. Por outro lado só 2 amostras do grupo tiveram pequena diminuição do desempenho, chegando a atingir 60 a 70%, respectivamente.

A média de esquivas para o grupo foi de 8.4 contra 15.5 de média para o preteste correspondente, (42 e 77.5%,

respectivamente), sendo esta diferença estatisticamente significativa (Fig 10).

Comparando-se o efeito do tiopental com o da solução fisiológica, injetada 24 hs antes no mesmo local, verifica-se que a diferença, quanto ao desempenho, também é significativa; as médias, como já visto, são 8.4 e 15.4, respectivamente (Tab. Ia e Fig 10).

Ademais pode-se notar, que cada animal considerado individual e pareadamente, demonstrou menor desempenho quando testado com o tiopental do que quando testado com a solução fisiológica.

O efeito relativamente curto do tiopental já começava a ser observado quando, à medida que a sessão de condicionamento ultrapassava a metade de sua duração, as respostas de esquiva começavam a reaparecer. Isto levou a que a 2ª metade da sessão, em vários casos, apresentasse maior número de esquivas do que a 1ª; a taxa dessa evolução, entretanto, não foi registrada.

Mas o experimento indica, por estes dados, que o tiopental, quando injetado no CPU do rato, determina uma diminuição da taxa de respostas de uma esquiva condicionada.

O período médio de latência da resposta de esquiva por sessão continuou revelando grande variação tanto no preteste como sob a ação do tiopental, sendo neste último ainda maior (tabela Ib), encontrando-se médias desde 0.0 s em 3 ratos, até 2.4 s em 1 rato, para o tiopental, enquanto no preteste a amplitude vai somente de 0.0 s a 1.0 s. A média geral de latência para todo o grupo sob ação do tiopental é entretanto mais de duas vezes a do preteste (0.7 s e 0.3 s - respectivamente); é também maior do que para a solução fisiológica.

lógica (0.5 s)

Quanto à atividade motora espontânea em campo aberto, observou-se em todo o grupo, que, logo após a injeção, o rato permanecia parado, ou então, se movimentava lentamente quando manuseado para ser levado à câmara. Dentro desta, continuava parado, sem procurar a alavanca de esquiva, como ocorria frequentemente na situação de preteste. Também foi observado que aqueles que tiveram maior queda do desempenho de esquiva tendiam a ficar encolhidos e com a cabeça abaixada nos primeiros minutos do decorrer da sessão. À medida que esta se desenvolvia eles começavam a se locomover um pouco, fato este que era correlato com a melhora do desempenho.

Não foi possível assegurar se, ou em que grau havia deficit motor por não se haver medido tal parâmetro, porém se havia, não era absoluto, pois os animais, ao receberem o choque saltitavam no mesmo lugar ou chegavam a saltar violentamente dentro da câmara; isso parecia estar também ligado à intensidade do efeito do tiopental (comparando-se através da taxa de esquivas, e também porque ao fim da sessão vários animais tinham uma resposta motora mais nítida, chegando mesmo a bater na alavanca com força suficiente para baixa-la).

Um comportamento motor característico e constante em todos os ratos durante aqueles primeiros 8 minutos foi a presença de uma atividade rotatória ipsilateral ao sítio da injeção e que aparecia muito nitidamente quando os mesmos eram obrigados a se locomover. Desse modo, quando, ao receber o estímulo, saltitava, saltava ou corria dentro da câmara, fazia-o sempre seguindo uma trajetória curva e no sentido do lado injetado. Em alguns ensaios acertava desorientadamente

a barra de esquiva, desligando o choque. Este comportamento rotatório decrescia também à medida do decorrer da sessão e, após a mesma, já era muito discreto ou não mais existia. De tal modo, foi verificado que sua intensidade e duração mantiveram uma relação direta com a queda da taxa de esquiva. O animal, sob sua ação não conseguia acertar a alavanca a não ser ocasionalmente; também não se desviava de obstáculos postos à sua frente quando o lado da rotação era contido.

Nas duas sessões seguintes, aos 10-18 min e 20-28 min, realizadas somente para 5 animais, que representaram 7 amostras, dado que 2 deles tinham cânulas-guia bilaterais, foi verificado que todos já tinham voltado ao comportamento preteste, não só quanto à taxa de esquiva como quanto à atividade rotatória, esta já muito discreta ou inexistente. As tabelas IIa e IIIa mostram os resultados relativos ao desempenho, notando-se a proximidade das médias do grupo em comparação com as do preteste e a volta ao nível de desempenho estável (mínimo de 15 respostas) em todos os animais; não há diferença significativa entre os valores encontrados nestas duas últimas sessões e os do preteste. Para as médias grupais destas duas sessões, ver também fig. 11 e 12.

Estes dados levam a admitir-se, portanto, que o efeito do tiopental, injetado no CPU, segundo a técnica deste experimento, sobre o desempenho de esquiva condicionada, é de curta duração, não ultrapassando 10 minutos.

No que diz respeito aos períodos médios de latência por sessão, continuou ocorrendo a grande variabilidade, sendo que na sessão de 10-18 min a média foi de 0.3 s e na de 20-28 min, de 0.6 s.

-3.1.3 Efeitos da associação tiopental/hidro cortisona.

Entre os 8 sujeitos, 6 mostraram uma taxa de respostas igual ou superior à do preteste e os 2 restantes, ambos com cânulas bilaterais, uma diminuição, nos 8 minutos imediatos à injeção (tabela Ib). É preciso dizer que o intervalo da injeção da mesma substância entre um lado e outro nos ratos com cânulas bilaterais, era de 4 dias. Um deles apresentou taxas de 45 e 30% respectivamente, para os lados esquerdo e direito, e o outro, taxa discretamente mais baixa que a de estabilidade, de um lado (60%) e alta do outro lado (90%). Deve-se notar, porém, que o rato nº 7 com injeção no lado direito, já vinha com desempenho inferior à média do grupo, não só no preteste atual, como no do dia anterior. De qualquer modo verifica-se uma manutenção dos níveis de resposta preteste em 7 injeções (6 sujeitos unilaterais e 1 bilateral); ademais a média do grupo é de 15.2, portanto praticamente igual à linha de desempenho estável e do preteste, não havendo diferença significativa em relação a estas duas ultimas situações (fig 10). Ao contrário, o desempenho em relação ao tiopental puro é muito superior, tanto nos sujeitos comparados individualmente (exceto no bilateral, nº 7), quanto na média. Isso leva a uma diferença estatisticamente significativa. Nas sessões de 10-18 min o desempenho para os 5 sujeitos analisados (2 deles com cânulas-guia bilaterais, o que permite estudar 7 amostras), está igual ao superior ao nível do preteste, exceto para a injeção em um dos lados do rato nº 8; mesmo assim, está acima de 75%. Nota-se também que aos 20-28 min, só para o lado esquerdo do rato nº 7 o desempenho volta a cair. Exceto para 1 animal, todo o restante

está acima do preteste. É importante também observar que, apesar dos baixos desempenhos do rato nº 7 (lados esquerdo e direito) nos 8 primeiros minutos, isso não ocorre nas duas últimas sessões. As médias grupais de 15.3 e 16.3 respectivamente para as sessões 10-18 min e 20-28 min não refletem diferenças significativas em relação aos controles-preteste (Fig 11 e 12).

Os períodos médios de latência por sessão, como nos outros casos, continuam com ampla variabilidade indo de 0.0 s a 1.3 s, sendo que na 1ª sessão-teste (8 min) 7 entre as 10 injeções têm-nas superiores a 0.5 s, com média de 0.6 s para todo o grupo. Nas 2ª e 3ª sessões-testes as variações são menores, bem como as médias grupais (respectivamente 0.3 e - 0.5 s).

Alterações motoras observáveis ou movimentos de rotação estiveram ausentes em todas as 3 sessões-teste, e mesmo nos animais com mais fraco desempenho.

É lícito inferir pois, que o uso da associação tiopental/hidro cortisona parece levar a uma neutralização dos efeitos do tiopental, não só em relação ao deficit de desempenho da esquiva condicionada, como em relação ao movimento rotatório ipsilateral.

3.1.4 Efeitos da hidro cortisona pura

Sob este aspecto estudaram-se apenas 5 animais sendo 2 deles com implantação bilateral de cânula, o que permitiu 7 amostras. Destas, 3 já tinham demonstrado baixas taxas de esquiva no preteste, com valores iguais ou inferiores a 35% (6, 7 e 7 respostas), como se ve na tabela Ia. As duas respostas de 35% foram para o mesmo rato (nº 7), com 4 dias de intervalo

de uma para a outra. Os 3 animais restantes (4 amostras) tinham taxas preteste altas, chegando, 2 deles, até 90%. Em vista de haver grande discrepância de respostas para quase a metade das amostras, e, além disso, o grupo ser bastante pequeno, não foi feito tratamento estatístico, já que se poderia ter uma amostra viciada; o rato com 7 respostas preteste já vinha apresentando fraco desempenho nas sessões dos 2 dias anteriores, embora isso não ocorresse com o outro também de baixo desempenho (nº 5). Conjecturou-se que, a esta altura eles já tinham submetido a 3 injeções na mesma região (o nº 7 recebera 3 injeções de cada lado), embora os outros estivessem sob as mesmas condições. Mais provável porém é que aqueles começavam a dar sinais de infecção em torno do bloco de fixação da cânula guia. Pode-se admitir enfim que houvesse algum efeito residual do tiopental devido à injeção de tiopental/hidrocortisona no dia anterior, mas isto também seria pouco provável já que o efeito do barbiturato se tinha revelado de pouca duração.

Entretanto, o que da observação resulta muito sugestivo é o fato de que a aplicação da hidrocortisona pura manteve (ou não interferiu) com o alto nível de respostas para os que já o tinham alto no preteste, e elevou o dos 2 (3 amostras) com baixo índice de respostas preteste, para 60, 80 e 85% respectivamente; ou seja, no mínimo, duplicou as suas taxas de respostas. Além disso, na 2ª sessão estes níveis continuaram altos, sendo que, para um rato, ainda aumentou. Na última sessão, para um outro (nº 7), com cânulas bilaterais, as respostas já começaram a diminuir porém ainda foram quase o duplo do preteste. Saliente-se que nas 3 sessões-teste as médias do grupo foram maiores do que a do preteste e da mesma ordem do desempenho estável. Mais significativo pode ser o fato de que a

ação da hidrocortisona sobre os sujeitos com fraco desempenho durante o preteste foi muito potente e duradoura (pelo menos até os 28 min estudados).

Quanto às médias de latência por sessão, continua a amplitude de variação já referida no emprêgo das outras soluções e nos controles. As suas médias gerais para o grupo caíram na 1ª sessão, mas aumentaram nas duas últimas (0.6 s e 0.5 s, respectivamente), em relação ao preteste.

Não houve movimentos rotatórios, estereotipados ou deficits motores; pareceu haver maior atividade exploratória em campo aberto. Dentro da câmara os ratos permaneciam parados nos intervalos interensaios e se orientavam bem para a barra de esquiva.

Procurando apresentar os resultados para a latência das respostas de esquiva, vê-se que em todas as 4 etapas de teste está evidente a sua grande variabilidade (tomando a média de cada animal por sessão). Por outro lado as médias gerais entre grupos apresentam discrepâncias nos 4 testes. Isto pode ter sido motivado pela insuficiência dos meios de medição do período de latência de cada resposta, tendo em vista a natureza da situação experimental - os animais saltavam sobre a barra de esquiva, na maioria das vezes, imediatamente após o sinal luminoso, cujo inicio era concomitante a um ruído brusco dos relés no fechamento do circuito. Isto levava a considerar, nessas ocasiões, a latência igual a 0.0 s ou a cronometrar com pouca precisão. Por estas razões foi analisado apenas o quadro geral das latências ou médias de latência, e não se aplicou tratamento estatístico. Na sua análise só uma coisa parece clara: poucas médias são acima de 1.0 s e a maioria é abaixo de 0.6 s. Daí não se poder tirar conclusões objetivas a não

ser a seguinte: houve uma tendência para curto período de latência da resposta esquivada em todo o experimento.

Quanto ao comportamento motor parece muito significativo o da rotação ipsilateral sob a ação unicamente do tiopental e seu desaparecimento sob a ação do tiopental/hidrocortisona e da hidrocortisona pura.

3.2 Efeitos das microinjeções no GP

Os ratos que receberam injeção no GP, foram somente 3, e destes só 1 recebeu a sequência completa de drogas, isto é: tiopental, tiopental/hidrocortisona e hidrocortisona pura. Neles não foi estudada a latência das respostas. Também só se estudou o efeito das substâncias durante 1 sessão-teste (8 min). Isto leva necessariamente a um estudo incompleto e é apresentado aqui apenas como um dado a mais no experimento. Não se fez, naturalmente análise estatística. Na tabela IV estão os resultados encontrados. Far-se-á uma análise global dos mesmos. Ali se verifica que os níveis de desempenho preteste se mantêm iguais ou acima dos 75% (15 a 18 respostas em 20 ensaios), em todas as ocasiões pretestadas. A solução fisiológica também não provocou queda das respostas, sendo todas elas também acima de 75% (16 e 17 respostas). Em relação ao tiopental foi nítida a diminuição do desempenho nos 2 primeiros animais, dando 4 e 5 esquivas respectivamente, concomitante também com rotação ipsilateral. O 3º animal apresentou 12 respostas de esquivada e não foi observado efeito rotatório. Com a injeção da associação tiopental/hidrocortisona, 2 ratos mantiveram desempenho alto (15 e 19 respostas) e 1 demonstrou uma queda para 8 respostas. Vale notar que este apresentara desempenho preteste

um pouco abaixo do nível de estabilidade. O único rato que recebeu a injeção de hidrocortisona pura elevou seu índice de 75% preteste para 95% sob a ação de droga (15 para 19 respostas).

Em suma, os resultados mostram que, também no GP, a injeção do tiopental determina o deficit da resposta de esquiiva, acompanhado da rotação ipsilateral ao local da injeção; e por outro lado o desempenho sob a ação do tiopental/hidrocortisona e de hidrocortisona pura mantêm o nível de estabilidade ou dos controles. Entretanto 2 ocorrências devem ser salientadas: uma delas é que não foi observado o movimento rotatório - em um rato com injeção de tiopental, mas como ele também demonstrou um número de respostas não muito baixo (rato 3, 12 respostas), pode-se imputar isto à dificuldade de observação do movimento rotatório por este já estar num momento fronteiro. O 2º fato é que sob o efeito do tiopental/hidrocortisona o rato 2 apresentou uma queda de respostas em relação ao preteste, diferentemente dos outros; porem fato semelhante se deu para um outro rato com mesma injeção no CPU e possivelmente os motivos sejam os mesmos ali analisados. Tanto é que este animal, já não se submeteu a injeção com hidrocortisona pura no dia seguinte por se encontrar, com atividade espontânea, em campo aberto, deprimida.

Assim sendo estes dados são somente complementares aos estudos do CPU, com os quais concordam na parte principal. Daí ter-se apresentado o conjunto de resultados do trabalho - como estudo da injeção no striatum.

T A B E L A Ia

Nº RATO	COORDENADAS DA REGIÃO INJETADA			PT	SF	PT	T 25µg	PT	T/HC 25µg-1µg	PT	HC 1µg
	A	H	L								
1	D: 6.2	-3.0	3.0	14	16	16	7	16	18		
2	E: 7.8	-2.5	2.0	15	18	17	11	16	20		
3	D: 6.2	-2.5	3.0	17	18	17	10	16	16		
4	E: 7.4	-1.0	2.0	16	12	15	6	15	15	16	17
5	E: 8.6	-1.0	3.0	16	16	16	12	16	18	6	12
6E	E: 7.8	0.0	2.5	16	13	15	8	15	12	18	16
6D	D: 8.2	-2.0	2.0	18	16	15	7	15	18	17	18
7E	E: 8.2	-0.5	3.0	16	16	16	14	15	9	7	16
7D	D: 8.6	-0.5	3.5	16	16	12	2	12	6	7	17
8	E: 8.6	-1.0	2.0	16	13	16	7	18	20	18	19
MEDIAS				16.0	15.4	15.5	8.4 [§]	15.4	15.2	12.7	16.4

Efeito, no período de 0-8 min, da injeção de 1 µl de várias substâncias, a intervalos de 24 hs, no caudado-putamen de ratos sobre o desempenho de esquiva.

Convenções: as filas representam o número de esquivas de cada rato em uma sessão de 20 ensaios; A= plano vertical; H= plano horizontal; L= plano lateral; D= lado direito; E= lado esquerdo; PT= preteste; SF= solução fisiológica; T= tiopental; T/HC= associação tiopental/hidrocortisona; HC= hidrocortisona; § = estatisticamente significativo.

Coordenadas: atlas de De Groot, para ratos.

OBS: As mesmas referências estereotáticas e convenções para as tabelas IIa, IIIa, Ib, IIb, e IIIb e IV

T A B E L A Ib

Nº RATO	PT	SF	PT	T (25µg)	PT	T/HC (25µg/1µg)	PT	HC (1µg)
1	0.3	0.5	0.0	0.7	1.0	0.5		
2	0.4	0.1	0.3	0.0	0.2	0.3		
3	0.9	1.4	0.1	2.4	0.2	1.3		
4	0.4	0.2	0.8	0.3	0.0	0.8	0.2	0.3
5	0.5	1.2	1.0	1.6	0.0	0.0	0.3	0.3
6 E	0.0	0.3	0.2	1.0	0.1	0.6	0.3	0.1
6 D	0.4	0.3	0.0	0.0	0.6	0.2	0.0	0.3
7 E	0.3	0.6	0.4	0.6	0.3	0.8	0.6	0.9
7 D	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.7	1.1	0.4
8	0.3	0.8	0.6	0.3	0.8	0.7	0.3	0.0
MÉDIAS DO GRUPO	0.4	0.5	0.3	0.7	0.3	0.6	0.4	0.3

Médias dos períodos de latência (em segundos) das respostas de esquiva, no período de 0-8 min, após injeção de 1 µl de várias substâncias, a intervalo de 24 hs, no caudado-putamen de ratos. Para as outras referencias ver tab Ia.

T A B E L A IIa

Nº RATO	PT	T (25µg)	PT	T/HC (25µg - 1µg)	PT	HC (1µg)
4	15	15	15	15	16	16
5	16	15	16	18	6	16
6E	15	18	15	16	18	17
6D	15	17	15	15	17	17
7E	16	16	15	13	7	16
7D	12	15	12	14	7	16
8	16	20	18	16	18	13
MÉ- DIAS	15.0	16.5	15.1	15.3	12.7	16.0

Efeito, no período de 10-18 min, da injeção de 1 µl de várias substâncias, a intervalos de 24 hs, no caudado-putamen de ratos sobre o desempenho de esquiva. Para outras referências ver tab Ia.

T A B E L A IIIa

Nº RATO	PT	T (25µg)	PT	T/HC (25 µg - 1µg)	PT	HC (1µg)
4	15	15	15	17	16	17
5	16	14	16	18	6	16
6E	15	18	15	16	18	16
6D	15	16	15	17	17	15
7E	16	14	15	15	7	11
7D	12	14	12	12	7	12
8	16	17	18	19	18	16
MÉ- DIAS	15.0	15.4	15.1	16.3	12.7	14.7

Efeito, no período de 20-28 min, da injeção de 1 µl de várias substâncias, a intervalos de 24 hs, no caudado-putamen de ratos sobre o desempenho de esquiva. Para outras referências ver tab Ia.

T A B E L A I I b

Nº RATO	PT	T (25µg)	PT	T/HC (25µg - 1µg)	PT	HC (1µg)
4	0.8	1.1	0.0	0.3	0.2	0.5
5	1.0	0.0	0.0	0.3	0.3	1.5
6E	0.2	0.5	0.1	0.0	0.3	0.1
6D	0.0	0.2	0.6	0.0	0.0	0.8
7E	0.4	0.2	0.3	0.6	0.6	0.4
7D	0.1	0.1	0.0	0.5	1.1	0.3
8	0.6	0.3	0.8	0.4	0.3	0.6
Medias do Grupo	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.6

Medias dos períodos de latência(em segundos) das respostas de esquiva no período de 10-18 min após injeção de 1 µl de várias substâncias, a intervalos de 24 hs no caudado-putamen de ratos. Para outras referências ver tab Ia.

T A B E L A I I I b

Nº RATO	PT	T (25µg)	PT	T/HC (25µg - 1µg)	PT	HC (1µg)
4	0.8	0.7	0.0	0.6	0.2	0.8
5	1.0	0.2	0.0	0.0	0.3	0.4
6E	0.2	0.6	0.1	0.2	0.3	0.5
6D	0.0	1.0	0.6	0.2	0.0	0.4
7E	0.4	0.5	0.3	1.1	0.6	0.4
7D	0.1	0.5	0.0	1.0	1.1	0.7
8	0.6	0.9	0.8	0.5	0.3	0.5
Medias do Grupo	0.4	0.6	0.3	0.5	0.4	0.5

Medias dos períodos de latência (em segundos) das respostas de esquiva no período de 20-28 min, após injeção de 1 µl de várias substâncias a intervalos de 24 hs no caudado-putamen de ratos. Para outras referências ver tab Ia.

T A B E L A IV

Nº RATO	COORDENADAS DA REGIÃO INJETADA			PT	SF	PT	T (25µg)	PT	T/HC 25µg-1µg	PT	HC
	A	H	L								
9	E: 7.0	-1.0	3.0	15	16	16	5	17	15		
10	E: 7.0	-1.0	3.0	18	17	16	4	14	8		
11	E: 7.4	0.0	3.0	15	16	15	12	16	19	15	19
MEDIAS				16.0	16.3	15.7	7.0	15.7	14.4	15.0	19.0

Efeito, no período de 0-8 min, da injeção de 1 µl de várias substâncias, a intervalos de 24 hs, no globo pallidum de ratos, sobre o desempenho de esquiva. Para outras referências ver tab. Ia.

Fig. 10 - Representação gráfica da 1ª sessão (0-8min) após injeção, no CPU, de 1 µl de: solução fisiológica (SF), tiopental (T) e tiopental/hidro cortisona - (T/HC), a intervalos de 24hs. As colunas representam a media das respostas de esquiva por sessão de 20 ensaios para 10 amostras (8 animais). PT:preteste; DES. EST.: desempenho estavel. Só houve diferença estatisticamente significativa, em relação ao DES. EST., ao PT, ou a SF, para a injeção do tiopental.

Fig. 11 - Representação gráfica da 2ª sessão (10-18min) após injeção, no CPU, de 1 µl das soluções de tiopental e tiopental/hidro cortisona (T/HC), a intervalos de 24hs. As colunas representam a média das respostas de esquiva por sessão - de 20 ensaios, para 10 amostras (8 animais). PT:preteste; DES. EST.: desempenho estavel. Não houve diferenças estatisticamente signifi

Fig. 12 - Representação gráfica da 3ª sessão (20-28min) após injeção, no CPU, de 1 µl das soluções de tiopental (T) e de tiopental/hidro cortisona (T/HC), a intervalos de 24 hs. As colunas representam a média de respostas - de esquiva por sessão de 20 ensaios, para 10 amostras (8 animais). PT: preteste; DES. EST.: desempenho estavel. Não houve diferenças estatisticamente significantes em qualquer situação experimental.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho tornam evidentes os seguintes fatos:

Relativamente à injeção do tiopental: 1º) a indução de uma rotação ipsilateral ao sítio injetado; 2º) uma queda acentuada, estatisticamente significativa, do desempenho de uma esquiva aprendida; 3º) estes dois efeitos mantêm uma correlação positiva entre si, em intensidade e duração, e, não ultrapassam o período de 10 minutos após a injeção.

Relativamente às injeções de tiopental/hidrocortisona e de hidrocortisona pura: 1º) o movimento rotatório não ocorre; 2º) o desempenho de esquiva se mantém no nível dos controles ou do desempenho estável. Portanto parece que estas duas soluções ou não tem ação sobre os dois comportamentos acima referidos, ou, se for analisado o efeito da associação tiopental/hidrocortisona, é possível atribuir ao hormônio uma neutralização da ação do barbiturato.

Analizar-se-ão, inicialmente, os resultados obtidos com o tiopental.

Foi mencionado, anteriormente, que a duração do seu efeito como anestésico é muito pequena, sendo por isso mesmo considerado como anestésico de ação ultra-curta. Ora, isto ocorre quando não há efeito cumulativo de várias doses, isto é, quando os depósitos gordurosos ainda não estão saturados. Assim sendo, em dose anestésica única, verifica-se, duração de efeitos da mesma ordem que aquela aqui encontrada. É de se indagar se o efeito neste experimento será anestésico, ou não, Não foi testado este aspecto, mas os animais sentiam o choque nas patas pois saltitavam ou saltavam ao recebe-lo.

Por outro lado, os efeitos mais duradouros e relacionados à atividade motora ou comportamental dos trabalhos de outros autores colocam a questão dos motivos destas discrepâncias. Quanto à queda da atividade motora com duração de 4 hs - (Comibra com o uso da mesma técnica: microinjeção de 0.5 μ l), note-se que a situação estudada foi completamente diferente, - já que se analisava a quantidade de movimento espontâneo do rato, enquanto no presente experimento, o mesmo era submetido a intensa e repetida estimulação. Aliás, alguns ratos, aqui, foram testados 1 e 2 hs depois da injeção do tiopental e continuaram com desempenho alto, o que também ocorria nos pretestes realizados cada 24 hs.

Quanto aos efeitos comportamentais, em macaco, bem mais duradouros, nas experiências de Lico e mesmo de Delgado e Kitahata (para o fenobarbital) é possível que as diferenças estejam também associadas às características de cada método, no que diz respeito à velocidade de administração, e daí ao tempo de contato da droga ativa com o tecido cerebral. Assim, nos casos de microinfusão, conforme empregados por aqueles autores, - as velocidades são de 6 e 3 vezes mais lentas, respectivamente, do que nesta experiência, sendo o tempo total de aplicação da droga de 30 e 60 min (Lico) e 1 a 4 dias (Delgado), levando pois a um prolongado período de contato com a região intracerebral estudada. É certo que mesmo nestes 2 casos a duração dos efeitos fisiológicos ultrapassa, de muito, a esperada, tendo-se em conta as características do tiopental e do fenobarbital, e é precisamente aí onde reside um ponto crítico do problema.

Na presente experiência pode-se dizer que o que

se fez foi injetar, no tecido cerebral, um volume fixo de 1 μ l de tiopental a 2.5%, no espaço de tempo de 2 minutos e com isto é de se esperar que os seguintes fatos tenham ocorrido: 1º) uma pressão várias vezes maior do que as de perfusão ou micro-infusão, de modo que a substância se difundiu e foi removida do tecido com muito maior rapidez; 2º) consequente inativação pela deposição nos compartimentos gordurosos.

O efeito sobre o comportamento motor, que apareceu - imediatamente após a injeção, provocando o movimento ipsiversivo, quando o rato era obrigado a movimentar-se, foi semelhante ao efeito causado pela lesão unilateral extensa do núcleo caudado em gatos e macacos (Lidell e Phillips, 1940), e em ratos com lesões unilaterais no feixe nigro-estriatal ou remoção do striatum (Andén et al., 1966; Corrodi et al., 1972). Deve-se notar que o volume de 1 μ l injetado numa estrutura tão pequena quanto o CPU ou GP de um rato, poderá abranger grande extensão da mesma, ainda mais levando-se em conta o grau de difusão do volume injetado (Myers, 1966). A possibilidade de se estar causando um efeito mecânico devido à velocidade e volume injetado fica afastada, pois somente acima de 50 μ l/min e em volume de 1 ml isso pode influenciar os resultados (Nashold, - 1959); quanto à lesão causada pela própria agulha de injeção pode também ser excluída, porque não se observaram movimentos rotatórios quando injetada a solução salina ou as outras soluções experimentais. Saliente-se ademais que nos referidos trabalhos de Corrodi e Andén foram obtidos movimentos ipsi ou contralaterais em ratos por depleção ou aumento respectivamente da dopamina no striatum unilateralmente. Os efeitos ipsiversivos, provocados por lesão são anulados pela injeção de drogas bloqueadoras da transmissão dopaminica, como clorpromazina, ha

loperidol ou reserpina; por outro lado movimentos contralaterais são produzidos pela injeção de dopamina ou ativadores da mesma, como a apomorfina, e são também eliminados pela injeção de clorpromazina e haloperidol (Cools e Rossum, 1970; Cools, 1971; Hornykiewicz, 1972).

Estes dados, juntamente com os aqui encontrados após a microinjeção de tiopental, são todos compatíveis, de maneira que se pode admitir uma ação bloqueadora desta substância sobre o striatum, talvez depletando a dopamina pelo menos em parte, ou por bloqueio no próprio receptor como é suposto fazerem o haloperidol e a clorpromazina (Hornykiewicz, 1972), e tornando-a mais disponível do lado não injetado. Na verdade isso levaria àquele desequilíbrio dopamínico entre o striatum esquerdo e o direito postulado como causa dos movimentos rotatórios (Ungerstedt, 1971). Em suma, tais movimentos seriam explicados em virtude da interrupção funcional do circuito córtico-putamen-pallidum-tálamo-cortical, de modo que a atividade inibitória, coordenadora, responsável também pelos movimentos lentos (De Long, 1973), normalmente exercida pelo striatum sobre o cortex motor, estaria eliminada.

O decréscimo da taxa de respostas de esquia sob a ação do tiopental, com variação diretamente proporcional à incoordenação motora, tanto em intensidade como em duração, é indicativo de que o efeito da droga sobre o desempenho de esquia é devido apenas à incoordenação e não a uma ação sobre processos de retenção do aprendizado. É claro que não se pode excluir definitivamente esta ultima possibilidade pois poderá haver também diminuição de noradrenalina no striatum. É suposto que drogas que depletem ou bloqueiam a noradrenalina nas sinapses, retardam a consolidação ou a retenção (Kety, 1972).

Mas uma única dose de tiopental, como foi o caso, se tiver efeito sobre a própria consolidação ou retenção, deverá ser muito discreto. Corroborando a ideia de que a queda do desempenho é devida à incoordenação motora, pelo simples fato de que o rato não acerta a barra mesmo quando procura dirigir-se a ela, está o fato de que sob a injeção de tiopental/hidrocortisona - ou hidrocortisona pura, não ocorre a incoordenação e o desempenho se mantém em níveis não significativamente diferentes daqueles das condições controle. Deve-se notar ainda que a hidrocortisona isoladamente, até produziu um aumento no desempenho dos ratos com baixa taxa pré-teste. Nestes casos, entretanto, também é possível pensar-se que a hidrocortisona, nesta dose (1 µg) pode não ter efeito em testes agudos como neste caso, e a aparente melhora da "performance" pudesse ser devida a um efeito de memória a curto termo; isto porque os animais eram submetidos a 3 sessões-testes consecutivas num período de 30 minutos, além do pré-teste.

É difícil aventar uma hipótese muito consistente - com respeito ao que foi chamado de neutralização, pela hidrocortisona, dos efeitos do tiopental. Pode-se, entretanto, fazer algumas referências a ações e possíveis mecanismos daquele hormônio no tecido cerebral. Já foram mencionados, no início desta exposição, estudos sobre ações de hormônios corticosteroides sobre o sistema nervoso. A aplicação da hidrocortisona diretamente na superfície cortical (Covian, Lico, Antunes-Rodrigues, 1963) ou intracerebralmente (Chambers, Freedman e Sawyer, 1963; Feldman, 1971) provocou efeito excitatório sobre a atividade evocada ou espontânea dos neurônios cerebrais. Ademais este aumento de excitabilidade estaria na dependência do decréscimo da relação extra-intracelular cerebral na concentra-

ção de sódio, conforme proposto por Woodbury em 1957. Desse modo poder-se-ia sugerir que, mesmo depletada uma grande parte da dopamina estriatal, o efeito neutralizante do hormônio fosse devido ao aumento da excitabilidade neuronal através da reversão eletrolítica da concentração de sódio intra-extracelular, graças a isso a célula podendo utilizar o restante estoque de dopamina e voltar àquele estado de equilíbrio anteriormente referido (eliminando assim a incoordenação motora).

Na análise dos efeitos hormonais sobre a esQUIVA condicionada é preciso salientar os resultados muito consistentes de vários pesquisadores que aparentemente contradizem os apresentados neste trabalho. Todos eles tem demonstrado que a hidrocortisona e outros glicocorticoides, quer injetados intracerebralmente, quer por via sistêmica dificultam a aquisição e facilitam a extinção da resposta de esQUIVA. Efeitos opostos tem o ACTH (De Wied, 1966; Bohus, Nyakas e Endroczi, 1968; Bohus e Lissák, 1968; Bohus, 1970; Davidson e Levine, 1972). Comparando-se porem os métodos aqui empregados com os desses autores ficam evidentes as seguintes diferenças esclarecedoras: 1ª) Os seus experimentos foram desenvolvidos com a aplicação e estudo do efeito da droga aguda e/ou cronicamente; 2ª) Desse modo analisaram o problema com métodos que aquilatavam o desenvolvimento dos próprios processos de aquisição e retenção; 3ª) Nenhum deles se refere a injeção no striatum e isto é um ponto a levar em consideração por causa da conhecida heterogeneidade funcional de regiões cerebrais, às vezes muito próximas; 4ª) A correlação positiva aqui encontrada com respeito ao distúrbio de coordenação motora e a queda do desempenho, sob a ação do tiopental, e o desaparecimento de ambos sob a ação do tiopental/hidrocortisona. É evidente, portanto, que a

diferença metodológica explica a aparente contradição, pois na realidade são estudados mecanismos diferentes.

Importa comparar, em suma, os pressupostos dos quais se partiu para esta experiência e os resultados obtidos: ou seja, quanto à duração do efeito do tiopental e quanto ao comportamento do animal. Em relação ao primeiro já foi discutido suficientemente, devendo-se ressaltar, mais uma vez, que além da técnica de administração da droga existe o outro aspecto, que é o da situação experimental estudada. Quanto ao segundo, isto é, obtenção de uma resposta de integração complexa no macaco (experiência de Lico) e aparentemente não obtenção da mesma no rato, deve-se ter em conta além desses dois aspectos, o da diferença de espécies.

Finalmente faz-se necessário dizer que esta abordagem do comportamento a partir da injeção de tiopental no striatum é naturalmente incompleta e requer ampliação para outras estruturas prosencefálicas, bem como o emprego de outros hormônios e outras situações experimentais, no sentido de uma melhor compreensão dos mecanismos neurofisiológicos, neuro-farmacológicos e comportamentais envolvidos.

5. CONCLUSÕES

- 1) A microinjeção unilateral do tiopental no striatum de ratos determinou uma diminuição significativa no desempenho de uma esquiva condicionada, concomitante a uma rotação ipsilateral, não ultrapassando 10 minutos. Estes dois comportamentos mantiveram uma correlação positiva entre si, em intensidade e duração.
- 2) O efeito ipsiversivo foi devido provavelmente ao bloqueio da transmissão dopaminérgica no striatum.
- 3) A queda do desempenho de esquiva foi devida à incoordenação motora e não a interferência sobre processos de retenção do aprendizado ou de natureza adaptativa complexa associada aos gânglios basais.
- 4) O efeito da microinjeção do tiopental no striatum do rato, foi muito menos prolongado do que é o da microinfusão na mesma estrutura em macacos.
- 5) A hidrocortisona associada ao tiopental neutralizou a ação deste; quando administrada isoladamente manteve ou não interferiu no desempenho de esquiva e não provocou alterações motoras perceptíveis.

6. SUMARIO

Ratos albinos foram treinados numa situação de es-
quiva ativa até consolidação do aprendizado - desempenho esta-
vel (DE). A seguir submeteram-se à implantação de cânulas-guia
transcranianas uni ou bilaterais ao nível do striatum (cauda -
do-putamen, CPU e/ou globo pallidum, GP), e, após recuperação
cirúrgica, retreinados até atingirem novamente o DE. Então fo-
ram testados por um período de 0 a 28 min (CPU) ou 0 a 8 min -
(GP), imediatamente após injeção, naquelas estruturas, de 1 µl
das seguintes soluções, a intervalos de 24 hs: solução fisioló-
gica (SF); tiopental (T); tiopental/hidrocortisona (T/HC) e hi-
drocortisona (HC). Cada rato foi controle de si próprio. Os re-
sultados mostraram que, sob a ação da T/HC e da HC o desempe-
nho não diferiu dos controles, nem houve alterações motoras, -
Sob ação do tiopental o desempenho decresceu significativamente
e foi observada rotação ipsilateral ao sítio injetado. Ambos -
os comportamentos não se prolongaram por mais de 10 min e man-
tiveram correlação positiva, entre si, quanto à intensidade e
duração.

Foi concluído que:

- 1) O efeito ipsiversivo foi devido, provavelmente, ao bloqueio,
pelo barbiturato, da transmissão dopaminérgica no striatum.
- 2) A queda do desempenho foi devida à incoordenação motora e
não a interferência nos mecanismos de retenção do aprendizado
ou de natureza adaptativa complexa associada aos gânglios ba-
sais.
- 3) O efeito da microinjeção do tiopental, no striatum do rato,
quanto aos aspectos aqui estudados, foi muito menos duradouro
do que o da sua microinfusão na mesma estrutura no macaco, -

quanto a aspectos adaptativos complexos.

4) A hidrocortisona associada ao tiopental neutralizou a ação deste; isoladamente manteve, ou não interferiu, no desempenho de esquiva nem provocou alteração motora.

Foi discutido um possível mecanismo de ação para o efeito da hidrocortisona.

7. SUMMARY

Albino male rats were trained in an active avoidance conditioned situation until consolidation of learning — stable performance (SP). Afterwards, implantation of guide-cannulas through the skull both uni or bilaterally was performed, at the level of striatum (n. caudatus-putamen, CPU and/or globus pallidus, GP). After surgical recuperation they were re-trained to regain SP. Subsequently they were tested, in the same avoidance situation for periods of 0-28 min (CPU) and 0-8 min (GP), immediately after injection of 1 μ l of the following solutions, with 24 hs intervals among them: 1) saline solution (SS); 2) sodium thiopental (T); 3) sodium thiopental/hydrocortisone (T/HC) and 4) hydrocortisone (HC). Every rat was its own control. The results showed that under the action of thiopental a significant decrease in performance occurred; an ipsilateral rotational body movement was also observed. The duration of both behaviors was lower than 10 min. The intensity and duration of rotational behavior maintained a positive correlation with the performance decrease.

It was concluded that:

- 1) The ipsiversive movement was probably due to blockade of the dopaminergic transmission in the striatum, by the barbiturate.
- 2) The decrease in performance was caused by motor incoordination, and not by interference on the retention mechanisms of learning or on the processes of complex nature related with basal ganglia.
- 3) The microinjection of thiopental in the striatum of rat in the observed behaviors had an effect of less duration than a

microinfusion in the same structure in monkey, respecting to complex adaptative behavior.

4) Hydrocortisone injected simultaneously with thiopental neutralized its action; when used alone hydrocortisone maintained or did not influence avoidance performance, and no elicited motor alterations.

A possible mechanism for the action of hydrocortisone and thiopental was discussed.

8. BIBLIOGRAFIA

- Andén, N.E.; Dahlström, A.; Fuxe, K. and Larsson, K. Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons. Acta pharmacol. (Kbh) 24:263-274, 1966.
- Bohus, B. The medial thalamus and the opposite effect of corticosteroids and adrenocorticotrophic hormone on avoidance extinction in the rat. Acta physiol. Acad. Sci. hung. 38(2-3):217-223, 1970.
- Bohus, B. Central nervous structures and the effect of ACTH and corticosteroids on avoidance behaviour: a study with intracerebral implantation of corticosteroids - in the rat. Progr. Brain Res. 32:171-184, 1970.
- Bohus, B.; Lissák, K. Adrenocortical hormones and avoidance behaviour of rats. Int. J. Neuropharmacol. 7:301-306, 1968.
- Bohus, B.; Nyakas, Cs. and Endröczy, E. Effects of adrenocorticotrophic hormone on avoidance behaviour of intact and adrenalectomized rats. Int. J. Neuropharmacol. 7:307-314, 1968
- Brazier, M.A.B. and Finesinger, J.E. Action of barbiturates on the cerebral cortex. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.) 53:51-58, 1945.
- Broch, Jr., O.J. and Marsden, C.A. Regional distribution of monoamines in the corpus striatum of the rat. Brain Res. 38:425-428, 1972.
- Buchwald, N.A.; Wyers, E.J.; Okuma T. and Heuser, G. The "date-spindle" I. Electrophysiological properties. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 13:509-518, 1961.

Buchwald, N.A.; Heuser, M.D.; Wyers, E.J. and Lauprecht, C.W.
The "caudate-spindle" III. Inhibition by high frequency stimulation of subcortical structures. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 13:525-530, 1961.

Buchwald, N.A.; Wyers, E.J.; Lauprecht, C.W. and Heuser, G.
The "caudate-spindle" IV. A behavioral index of caudate-induced inhibition. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 13:531-537, 1961.

Chambers, W.F.; Freedman, S.L. and Sawyer, C.H. The effect of adrenal steroids on evoked reticular responses. - Exp. Neurol. 8:458-469, 1963.

Coimbra, T.M. Estudos das alterações comportamentais induzidos pela injeção do tiopental em estruturas prosencefálicas. Mecanismos envolvidos. Fac. Med. Rib. - Preto, 1973.

Cools, A.R. The Function of dopamine and its antagonism in the caudate nucleus of cats in relation to the stereotyped behaviour. Arch. int. Pharmacodyn 194,(2):259-268, 1971.

Cools, A.R. and Rossum, J.M. Caudal dopamine and stereotype behaviour of cats. Arch. int. Pharmacodyn. 187:163-173, 1970.

Corrodi, H.; Fuxe, K. and Lidbrink, P. Interaction between cholinergic and catecholaminergic neurones in rat brain. Brain Res. 43:397-416, 1972.

Covian, M.R.; Lico, M.C. and J. Antunes-Rodrigues. Effects of adrenal corticoids on visual evoked cortical potentials

in the cat. Arch int. Pharmacodyn. 146, (1-2):81-92, 1963.

Davidson, J.M. and Levine, S. Endocrine regulation of behavior. Ann. Rev. Physiol. 34:375-408, 1972.

De Groot, J. The rat forebrain in stereotaxic coordinates. Trans. roy. Neth. Acad. Sci. 52, (4), 1959.

Decima, E. and George, R. A simple cannula for intracerebral injection in chronic animals. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 17:438-429, 1964.

Delgado, J.M.R. Intracerebral perfusion in awake monkey. Arch. int. Pharmacodyn. 161, (2):442-462, 1966.

Delgado, J.M.R. and Kitahata, L.M. Reversible depression of hippocampus by local injections of anesthetics in monkeys. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 22:453-464 1967.

DeLong, M.R. Activity of basal ganglia neuron during movement. Brain Res. 40:127-135, 1972.

DeLong, M.R. Putamen: Activity of single units during slow and rapid arm movements. Science. 179, (4097):1240-1242, 1973.

De Wied, D. Inhibitory effect of ACTH and related peptides on extinction of conditioned avoidance behavior in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.). 122 (1):28-32, 1966.

Feldman, S. Electrical activity of the brain following cerebral microinfusion of cortisol. Epilepsia (Amst.). 12:249-262, 1971.

- Fuxe, K. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. Acta physiol. scand. 64, (suppl. 247):41-80, 1965.
- Goldman, D. Specific electroencephalographic changes with pentothal activation in psychotic states. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 9, (4):657-667, 1959.
- Goldman, D. Electroencephalographic changes brought to light under pentothal activation in psychotic (Schizophrenic) patients, with particular reference to changes produced by pharmacologic agents. Ann. N.Y. Acad. Sci. 96, art 1:356-374, 1962.
- Grossman, S.P. A Textbook of Physiological Psychology. pp 760-762. John Wiley & Sons, Inc. 1967.
- Hornykiewicz, O. Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction. Neurotransmitters. 50:390-415, 1972.
- Hull, C.D.; Buchwald. N.A. and Ling, G. Effects of direct cholinergic stimulation of forebrain structures. - Brain Res. 6:22-35, 1967.
- Izquierdo, I. y Izquierdo J.A. Effects of drugs on deep brain centers. Ann. Rev. Pharmacol. 11:189-208, 1971.
- Kennard, M.A.J. Experimental analysis of the functions of the basal ganglia in monkeys and chimpanzees. J. Neurophysiol. 7:127-149, 1944.
- Kent. E.W. Behavior of CNS single units in the vicinity of topically applied crystalline neurohumors. Physiol. Behav. 8:987-991, 1972.

- Kety, S.S. The central physiological and pharmacological effects of the biogenic amines and their correlations with behavior. In: A Study Program., pp 444-451. The Rockefeller University Press, 1970.
- Kety, S.S. The possible role of the adrenergic systems of the cortex in learning. Neurotransmitters. 50:378-389, 1972.
- Levine, S. Stress and behavior. Sci. Am. 224, (1):26-31, - 1971.
- Lico, M.C. Estudos qualitativos da regulação somato-autonômica e do comportamento por estruturas prosencefálicas. Tese de Docência Livre. Fac. Med. Ribeirão Preto, 1972.
- Liddell, E.G.T. and Phillips, C.G. Brain. 63:264, 1940. (Cit. in "Handbook of Physiology", Neurophysiology II, pp 863-927. American Physiological Society, 1959).
- Marczynski, T.J. Topical application of drugs to subcortical brain structures and selected aspects of electrical stimulation. Ergebn. Physiol. 59:87-159, 1967.
- Myers, R.D. Injection of solutions into cerebral tissue: relation between volume and diffusion. Physiol. Behav. 1:171-174, 1966.
- Myers, R.D.; Tytell, M.; Kawa, A. and Rudy T. Micro-injection of ^3H - acetylcholine, ^{14}C - Serotonin and ^3H - Norepinephrine into the hypothalamus of the rat: diffusion into tissue and ventricles. Physiol. Behav. - 7:743-751, 1971.

- Náshold, B.S. Cholinergic stimulation of globus pallidus in man. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 101:68-80, 1959. (Cit. por Delgado, J.M.R. e Kitahata, L.M. in Electroenceph. clin. Neurophysiol., 22:453-464, 1967).
- Rosvold, H.E. and Delgado J.M.R. The effect on delayed-alternation test performance of stimulation or destroying electrically structures within the frontal lobes of the monkey brain. J. comp. physiol. Psychol. 49:365-372, 1956. (Cit. in Grossman S.P.: a Testbook of Physiological Psychology 1967, pg 761).
- Schneider, V. et Thomalske, G. L' exploration pharmacodynamique cortico-sous-corticale et ses critères électrographiques. La détermination d' un foyer lésionnel - chez l'homme par la technique pentothalique. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 8, (3):353-369, 1956.
- Segundo, J.P. and Machne, X. Unitary responses to afferent volleys in lenticular nucleus and claustrum. J. Neurophysiol. 19, (4):325-339, 1956.
- Sharpless, S.J. Hypnotics and sedatives. I. The Barbiturates. In "The Pharmacological Basis of Therapeutics": Goodman, L. S. and Gilman, A. pp 98-119. The Macmillan Company, 4^e ed., 1970.
- Slusher, M.A.; Hyde, J.E. and Laufer, M. Effect of intracerebral hydrocortisone on unit activity of diencephalon and midbrain in cats. J. Neurophysiol. 29:157-169, 1966.

Ungerstedt, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta physiol. scand. Suppl. 367: 1-39, 1971.

Ungerstedt, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. Acta physiol. scand. Suppl. 367:49-65, 1971.

Woodbury, D.M.; Timiras, P.S. and Vernadakis, A. Influence of adrenocortical steroids on brain function and metabolism. In "Hormones, Brain Function, and Behavior". pp 27-54. Academic Press, N.Y., 1957.

Woodbury D.M. Relation between the adrenal cortex and central nervous system. Pharmacol. Rev. 10:257-357, - 1958.