

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

**Interação entre glutamato e óxido nítrico nas reações
defensivas mediadas pela substância cinzenta
periaquedutal dorsolateral de ratos**

Daniele Cristina de Aguiar

Ribeirão Preto

2005

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

**Interação entre glutamato e óxido nítrico nas reações
defensivas mediadas pela substância cinzenta
periaquedutal dorsolateral de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto-USP para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
Concentração: Farmacologia.

Daniele Cristina de Aguiar
Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Ribeirão Preto
2005

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Aguiar, Daniele Cristina

Interação entre glutamato e óxido nítrico nas reações defensivas
mediadas pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos./
Daniele Cristina de Aguiar; orientador: Francisco Silveira Guimarães.
– Ribeirão Preto, 2005.

64p il.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração:
Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.

1. Óxido Nítrico. 2. Glutamato. 3. Substância cinzenta periaquedutal.

*Aos meus Pais Paulo e Maria que
sempre me apoiaram e sonharam junto
comigo, dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães por ter me aceitado em seu laboratório, pela orientação e por sua disposição de nos ensinar sempre que necessário. Ao “Chico”, pela amizade e pela paciência em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Francisco Godinho por ter me acompanhado desde a iniciação científica e pela nossa amizade.

Aos Profs. Dr. Hélio Zangrossi Jr. e Dr. Antônio Pádua Carobrez pela avaliação e pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao doutorando Fabrício de Araújo Moreira pela contribuição, pela paciência em me ensinar, pelo companheirismo e amizade no laboratório.

Aos técnicos José Carlos de Aguiar e Eleni T. Gomes pelo excelente suporte técnico e pela amizade no dia a dia.

A grande e tão carinhosa família Aguiar, não sei o que seria de mim sem vocês.

A minha irmã Gisele pelo apoio e pela nossa diferente, mas eterna amizade.

Ao Danilo que apesar das dificuldades, esteve do meu lado nos momentos que eu mais precisei.

Aos amigos de laboratório Vanessa, Moriana, Sâmia, Vivian, Cláudia, Marcelo, Ana Carolina e Ana Cláudia, pela convivência e pela alegria de trabalharmos juntos.

Aos amigos Tatiana, Vanessa, Valquíria, Janaina, Leandro, Roger e Cris pela amizade e pelo carinho com que me acolheram.

A Sabrina e Milene grandes amigas e companheiras, obrigada pela paciência e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos Luis Borges, Léo, Chris Becari, Raquel, Mani, Ana Teresa e Tania pelo convívio na pós-graduação e nossa amizade.

As minhas amigas Camilla e Luiza que mesmo distantes, estão comigo em todos os momentos.

Aos secretários do departamento de Farmacologia, Waldick Ramon, Sonia M. Stefanelli e Fátima F. Petean pela competência que realizam seu trabalho, sempre dispostos a solucionar os problemas dos pós-graduandos.

A Eliana e Inês, pelo cuidado com os nossos animais, e a Diva, pelo cuidado com nosso material.

A todos os companheiros de pós-graduação, obrigada pela amizade e convivência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“... as expressões por si mesmas, ou a linguagem das emoções, como por vezes são chamadas, certamente têm importância para o bem estar da humanidade. Entender, na medida do possível, a fonte ou origem das várias expressões que o todo o momento podem ser vistas nos rostos dos homens à nossa volta, sem mencionar nossos animais domesticados, deveria ter um enorme interesse para nós”

C. Darwin

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	I
Resumo	II
Abstract	III
Introdução	1
1. Neurotransmissão Glutamatérgica.....	2
1.1 Receptores metabotrópicos de glutamato	3
1.2 Receptores ionotrópicos de glutamato	4
2. Óxido Nítrico.....	5
3. Neurotransmissão Glutamatérgica e Nitrérgica na Substância Cinzenta Periaquedutal.....	8
3.1 Substância Cinzenta Periaquedutal.....	8
3.2 Neurotransmissão Glutamatérgica na SCP	10
3.3 Neurotransmissão Nitrérgica na SCP	11
4 Via rNMDA, NO e GMPc.....	12
Objetivo	15
Material e Métodos	17
Animais.....	18
Drogas.....	18
Implantação da cânula-guia	19
Microinjeção.....	19
Testes Comportamentais.....	20
Histologia	23
Protocolos Experimentais e Procedimento	24
Análise estatística	26
Resultados	27
Localização do sítio de injeção.....	28
Experimento I: Efeito do L-NAME na reação de fuga induzida pelo SIN-1 na SCPdl.....	30
Experimento II: Efeito do ODQ injetado na SCPdl na ansiedade medida no LCE.....	33
Experimento III: Efeito do Carboxy-PTIO na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl.....	36
Experimento IV: Efeito do L-NAME na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl	39
Experimento V: Efeito do ODQ na reação de fuga de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl.....	41
Discussão	44
Referências Bibliográficas	52

Lista de Abreviaturas

AAE: aminoácidos excitatórios	iNOS: óxido nítrico sintase induzida
AMPA: α -amino 3-hidroxi 5-metil 4-isoxazolepropionato	nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
ANOVA: análise de variância	NTS: núcleo trato solitário
BA: braços abertos LCE	ODQ: 1H-[1,2,4] Oxadiazolol [4, 3-a] quinoxalin-1-one
DMSO: dimetil sulfóxido	PDE: enzimas fosfodiesterases
ERDF: fator relaxamento derivado do endotélio	PDE5: enzimas fosfodiesterases tipo 5
EPM: erro padrão da média	rNMDA: receptor(es) NMDA
GABA: ácido gama-amino butírico	RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro
GC: enzima guanilato ciclase	SIN-1: cloreto de 3 morfolinilsidnoneimina
GMPc: guanosina monofosfato cíclico	SCA: Sistema Cerebral Aversivo
GTP: guanosina trifosfato	SCP: Substância Cinzenta Periaquedutal
i.c.v.: intracerebroventricular	SCPD: Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
iGluR: receptores ionotrópicos de glutamato	SCPdl: Substância Cinzenta Periaquedutal dorsolateral
IP₃: trifosfato de inositol	SNC: Sistema Nervoso Central
I.R.: intervalo interquartil	
LCE: Labirinto em Cruz Elevado	
L-NAME: Nitro-L-arginina- N-metil éster	
LTD: depressão a longo prazo	
LTP: potenciação a longo prazo	
MANOVA: Análise Multivariada de Variância	
mGluR: receptores metabotrópicos de glutamato	
NADPH: co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato	
NMDA: N-metil-D-aspartato	
NO: óxido nítrico	
N₂O: óxido nitroso	
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial	

Resumo

A administração de glutamato na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) produz reações de fuga. Uma das conseqüências da ativação de receptores NMDA pelo glutamato é o influxo de cálcio, ocorrendo ativação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) e conseqüente formação do óxido nítrico (NO). Neurônios que contêm a enzima NOS estão localizados na SCPdl. A administração de inibidores da NOS nesta região produz efeitos ansiolíticos, enquanto doadores de NO como o SIN-1, induzem reações de fuga. O objetivo do presente trabalho foi testar a hipótese de que as respostas de fuga promovidas pela administração de um doador de NO ou de um agonista de rNMDA na SCPdl, dependem da formação de NO endógeno. Utilizaram-se ratos Wistar machos com cânulas direcionadas à SCPdl. Os animais receberam injeções de salina, L-NAME (inibidor da NOS, 100-200 nmoles), carboxy-PTIO (1-3 nmoles, seqüestrador de NO) ou ODQ (inibidor de guanilato ciclase, 1-3 nmoles) seguidas de SIN-1 (150 nmoles, doador de NO) ou NMDA (0,1 nmol, agonista NMDA). A análise das alterações comportamentais e a medida da distância percorrida foram realizadas em uma caixa de observação ou em uma arena circular. Realizou-se também uma curva-dose resposta para a administração intra-SCPdl do ODQ no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O pré-tratamento com o L-NAME não foi capaz de inibir a reação de fuga promovida pelo SIN-1. Esses resultados sugerem que o efeito promovido pelo doador de NO, injetado na SCPdl, não depende da formação de NO endógeno. A microinjeção de NMDA promoveu reação de fuga caracterizada por um aumento no número de cruzamentos e pulos no interior da caixa de injeção. O pré-tratamento com drogas que inibem a neurotransmissão nitrérgica, como o L-NAME, Carboxy-PTIO ou ODQ, não modificaram a resposta de fuga promovida pela administração de NMDA. Entretanto, o ODQ (1 nmol/0,2 μ l) administrado na SCPdl aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE. Os resultados obtidos sugerem que a ativação da via NO/GC/GMPc não é essencial para as respostas defensivas desencadeadas pela administração de NMDA ou SIN-1 na SCPdl. Entretanto, os resultados obtidos com o ODQ no LCE, confirmam o possível envolvimento dessa via na modulação de respostas defensivas frente a estímulos ameaçadores naturais.

Abstract

Intra-dorsolateral periaqueductal gray matter (dlPAG) administration of glutamate induces flight reactions. The enzyme neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is intimately linked to NMDA receptors and is activated by calcium influx through these receptors. nNOS positive neurons are located in dlPAG. Administration of NOS inhibitors into this region induces anxiolytic-like effects in the EPM whereas NO-donors produce defensive reactions characterized by wild running and jumps. To test the hypothesis that the defensive reactions induced by intra-dlPAG injection of SIN-1, a nitric oxide (NO) donor, or NMDA involve endogenous NO formation, male Wistar rats with cannulas aimed at the dlPAG received intra-cerebral injections of the following treatments: L-NAME (NOS inhibitor, 100-200 nmol), carboxy-PTIO (NO scavenger, 1-3 nmol) or ODQ (guanylate cyclase inhibitor 1-3 nmol), followed, 10 min later, by SIN1 (NO donor, 150 nmol) or NMDA (0.1 nmol, NMDA agonist). The behavioral observations and distance moved were recorded in the injection box or in an open arena. In addition, the effects of intra-dlPAG administration of ODQ in the elevated plus maze (E.P.M.) were evaluated. L-NAME pre-treatment did not prevent flight reactions induced by SIN-1 in the open arena, suggesting that NO donor effects in the dlPAG are not dependent on endogenous formation of NO. Intra-dlPAG injection of NMDA produced flight reactions characterized by wild cross and jumps in the box injection. These effects were not prevented by pre-treatment with L-NAME, carboxy-PTIO or ODQ. ODQ (1 nmol), increased the percentage of open arm entries in the E.P.M. Together these results suggest that endogenous activation of the NO/guanylate cyclase/GMPc pathway is not essential for defensive reactions induced by exogenous administration of NMDA or SIN-1 into the dlPAG. Results obtained with ODQ in the E.P.M., however, confirm the possible involvement of this pathway in modulation of defensive responses to natural threatening stimuli.

1. Neurotransmissão Glutamatérgica:

O glutamato ou ácido glutâmico é um aminoácido dicarboxílico que foi descrito pela primeira vez por Rithauser em 1866 e teve sua estrutura desvendada por Wolff em 1890 (apud YONG; AJAMI, 2000). É uma das biomoléculas mais abundantes nos seres vivos, estando presente em 10 a 20 % das proteínas animais (YONG; AJAMI, 2000), sendo também o precursor de vários outros aminoácidos (glutamina, arginina, prolina e ácido γ -aminobutírico-GABA). Além disso, possui um papel metabólico, pois fornece compostos intermediários para obtenção de energia através do Ciclo de Krebs (para revisão ver NEWSHOLME et al., 2003).

Em 1952, Hayashi propôs pela primeira vez que o glutamato poderia ter um papel como neurotransmissor, quando observou que a injeção intracérebro ventricular (i.c.v.) dessa substância em cachorros e macacos causava convulsões, sugerindo um possível efeito excitatório. Curtis, Phillis e Watkins (1959) demonstraram que a injeção iontoforética de glutamato despolarizava neurônios em medula espinhal de gatos. Hoje, já é bem estabelecido que o glutamato é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) e, aproximadamente 60 % dos neurônios no cérebro, o utilizam como neurotransmissor primário (JAVITT, 2004).

O glutamato é liberado a partir de terminais pré-sinápticos em resposta à despolarização neuronal, e recaptado dos terminais pré-sinápticos por transportadores de aminoácidos excitatórios (AAE), localizados tanto nos neurônios quanto nas células da glia. Dentro das células da glia, o glutamato é convertido em glutamina e liberado no fluido extracelular, onde ele é recaptado para o terminal pré-sináptico e convertido novamente em glutamato via ação da enzima glutaminase neuronal (AMARA; FONTANA, 2002).

A existência de múltiplos receptores para o glutamato foi primeiramente proposta por McLennan, Huffinan e Marshall em 1968, os quais descobriram que o L-glutamato e o análogo do

ácido ω -sulfônico, D,L homocistêmico, apresentavam potências relativamente distintas em diferentes regiões do cérebro. Estes receptores seriam canais iônicos permeáveis a cátions, os quais foram nomeados de acordo com seus agonistas mais seletivos. Por outro lado, Sladeczek et al. (1985) demonstraram que o glutamato era capaz de promover a formação do segundo mensageiro trifosfato de inositol (IP_3) em culturas de células de estriado, sugerindo a existência de receptores metabotrópicos para o glutamato, os quais agiriam por meio de receptores acoplados a proteínas G.

Através da clonagem dos primeiros receptores glutamatérgicos confirmou-se a classificação obtida previamente por meios farmacológicos (HOLLMAN et al., 1989; HOLLMANN; HEINEMANN, 1994). Atualmente, os receptores de glutamato dividem-se em dois grandes grupos: os receptores metabotrópicos (mGluR) e os receptores ionotrópicos (iGluR, NAKANISHI, 1992; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998).

1.1- Receptores metabotrópicos de glutamato

Os mGluR regulam a neurotransmissão tanto pré como pós-sinápticamente. Eles são divididos em três grupos baseados no acoplamento de segundo mensageiros e sensibilidade ao ligante. Os receptores do Grupo I são ligados positivamente a fosfolipase C, enquanto que tanto os receptores do Grupo II como os do Grupo III são ligados negativamente à adenilato ciclase (SPOOREN et al., 2003). Aparentemente, a função dos receptores do Grupo I é intensificar a liberação do glutamato, potencializando a neurotransmissão mediada pelo rNMDA. Enquanto que a função dos receptores do Grupo II e III seria de auto-regulação, particularmente durante condições em que há um excesso de liberação de glutamato na fenda sináptica (CHAVEZ-NORIEGA; SCHAFFHAUSER; CAMPBELL, 2002).

1.2- Receptores ionotrópicos de glutamato:

Os iGluR são diferenciados de acordo com a seletividade de derivados sintéticos do glutamato. Dessa forma, os receptores ionotrópicos foram divididos em três subtipos: o N-metil-D-aspartato (NMDA), o α -amino-3 hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e o cainato. (para revisão ver WATKINS, 2000).

Os receptores NMDA (rNMDA) são compostos de múltiplas subunidades incluindo pelo menos uma subunidade NR1 e uma ou mais subunidades modulatórias chamadas de NR2A-NR2D e NR3A-NR3B (NISHI et al., 2001; JAVITT, 2004).

Os rNMDA contêm sítios neuromodulatórios para glicina os quais, da mesma maneira que o sítio benzodiazepínico do receptor do ácido gama-amino butírico (GABA), afetam o tempo de abertura do canal e a taxa de dessensibilização na presença do agonista (glutamato), mas não induzem isoladamente a abertura do canal (JAVITT, 2004). Em adição, o complexo do rNMDA contêm sítios regulatórios que são sensíveis a poliaminas, Zn^{2+} , prótons e agentes redutores como a glutathione (YAKAMURA; SHIMOJI, 1999). Além disso, são bloqueados de maneira sensível à voltagem pelo Mg^{2+} (NOWAK et al., 1984), o qual se liga em um sítio dentro do canal.

Os receptores AMPA e Cainato medeiam a maioria da transmissão glutamatérgica rápida no cérebro, sendo geralmente agrupados como receptores não-NMDA por causa da falta de seletividade entre as drogas disponíveis (WENTHOLD; ROCHE, 1998).

Os receptores AMPA são canais permeáveis ao Na^+ e K^+ , compostos pelas subunidades GluR1-4, e atuam fortemente em união com os rNMDA (BORGES; DINGLELINE, 1998). A presença das subunidades GluR2 torna-os insensíveis ao Ca^{+2} , deixando-os incapazes de dispararem o processo de potenciação a longo prazo (LTP; TANAKA et al., 2000). Apesar disso, quando ativados promovem a despolarização necessária

para a abertura dos canais NMDA (JAVITT, 2004). Os receptores Cainato são formados pelas subunidades Glu5-7 e KA1-2 (BLEAKMAN; LODGE, 1998).

Nas sinapses excitatórias, receptores e enzimas sinalizadoras regulatórias estão associadas a proteínas intracitoplasmáticas de densidade pós-sináptica (PSD), as quais formam um citoesqueleto emaranhado localizado abaixo da membrana plasmática (BEATTIE et al., 2000). Para os rNMDA uma dessas proteínas ligantes é a PSD95, que conecta o receptor NMDA à enzima óxido nítrico sintase (NOS).

2. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) foi identificado inicialmente como um fator de relaxamento derivado do endotélio (ERDF), o qual era responsável pelo relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pela acetilcolina (FURCHGOT;ZAWADSKY, 1980). Posteriormente, Ignarro et al. (1987); Palmer, Ferrige e Moncada (1987); Palmer et al. (1988), demonstraram que o ERDF possuía características químicas e biológicas indistinguíveis do NO.

O NO é formado pela NOS a partir da L-arginina, que é o substrato de todas as isoformas da NOS, num processo catalítico que resulta na formação estequiométrica de L-citrulina (BREDT; SNYDER, 1994). A NOS possui três isoformas: a endotelial (eNOS), responsável por ações cardiovasculares; a induzida (iNOS), encontrada originalmente em macrófagos e envolvida principalmente com processos imunológicos e a neuronal (nNOS), localizada no SNC (GRIFFITH;STUEHR, 1995). Esta última, é uma enzima constitutiva e sintetizada por uma pequena porcentagem de neurônios. Sua atividade é um processo dependente de cálcio ou magnésio (cátions divalentes), de calmodulina e de co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH – ZHANG; SNYDER, 1995).

Caracterizada inicialmente como uma enzima citosólica, a nNOS pode encontrar-se ligada à membrana plasmática. Isto provavelmente se deve a presença de um domínio PDZ o qual pode-se ligar ao domínio PDZ de uma proteína de membrana, como a PSD-95 presente nos complexos rNMDA (BRENMAN et al., 1996).

A PSD95 é uma proteína associada à membrana que possui três domínios PDZ. O primeiro e o segundo domínio ligam-se à extremidade terminal COOH das subunidades dos rNMDA (TOMITA; NICOLL; BREDT, 2001). Quanto ao terceiro domínio, é onde ocorre a ligação com o domínio PDZ da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na terminação NH_2 (BRENMAN et al., 1996). Acredita-se que funcionalmente o agrupamento PDZ-PSD-95 confira maior eficácia entre o acoplamento do estímulo do rNMDA e a ativação da nNOS, que estaria exposta ao influxo de Ca^{+2} . De fato, Bredt e Snyder (1989) demonstraram que o glutamato, atuando em rNMDA, promove um aumento substancial na atividade NOS em fatias de cérebro.

O primeiro alvo estabelecido para a sinalização do NO é a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), onde o NO liga-se a um agrupamento heme. Esta enzima converte guanosina trifosfato, GTP, em guanosina monofosfato cíclico, GMPc (SNYDER; BREDT, 1991). O aumento de GMPc induzido pelo NO ativa muitas moléculas efetoras, como por exemplo proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), fosfodiesterases e canais iônicos. A maioria dos efeitos do GMPc são mediados pelas PKG (FRIEBE; KOESLING, 2003). O término da ação do GMPc é realizado por enzimas fosfodiesterases (PDE) que catalisam a hidrólise do GMPc em GMP (BEAVO, 1995).

Devido às suas características físico-químicas o NO tem sido considerado um neurotransmissor atípico (GARTHWAITE, 1991). Suas características são distintas dos neurotransmissores clássicos, pois como uma substância altamente lipossolúvel, não pode ser armazenado em vesículas ou liberado delas, sendo gerado a partir das enzimas de síntese

quando requerido (ESPLUGUES, 2002). O NO pode agir como transmissor anterógrado ou retrógrado (HOLSCHER, 1997), estimulando a liberação de vários neurotransmissores como o GABA, glutamato, aminas biogênicas e neuropeptídeos, promovendo assim uma cascata de liberação que estenderia ainda mais os seus alvos de ação (SCHULMAN, 1997).

Por ser um gás, a identificação de estruturas onde o NO estaria presente no SNC foi realizada de forma indireta, através da marcação para sua enzima de síntese. Bredt, Hwang e Snyder (1990), por meio de ensaios de imuno-histoquímica para NOS em encéfalos de ratos, demonstraram sua presença em neurônios do cerebelo, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl), colículos superior e inferior, giro denteado do hipocampo, núcleo do leito da estria terminal, camadas superficiais do córtex cerebral, bulbo olfatório, etc. A enzima NOS apresenta atividade denominada NADPH-diaforase, isto é, catalisa a conversão dependente de NADPH, do sal tetrazol solúvel ao sal visível formazan (DAWSON e cols, 1991; HOPE e cols, 1991). A sua localização por esta reação histoquímica demonstra sua vasta distribuição no encéfalo de ratos, em estruturas do telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo (SCPdl e colículo inferior), ponte e bulbo (VINCENT; KIMURA, 1992, ONSOTT; MAYER ;BEITZ, 1993).

Hoje, já se sabe que o NO é capaz de modificar uma variedade de funções cerebrais, tais como a regulação da excitabilidade e dos disparos, a plasticidade sináptica - potenciação (LTP) e depressão (LTD) de longo prazo, neurotoxicidade e neuroproteção (PRAST; PHILIPPU, 2001). Além disso, na última década, muitos estudos têm abordado a participação dos AAE e do NO na fisiopatologia de diversos distúrbios neuropsiquiátricos (CUNNINGHAM; FERKANY; ENNA, 1994), incluindo distúrbios de ansiedade (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001).

3. Neurotransmissão Glutamatérgica e Nitrérgica na Substância Cinzenta Periaquedutal

3.1- Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura constituída por pequenos neurônios os quais circundam o aqueduto mesencefálico (Sylvius) e que, ao longo dos processos evolutivos, sofreu poucas modificações (CARRIVE, 1993). A SCP não é uma estrutura homogênea, uma vez que vários estudos mostram que reações emocionais distintas são representadas em diferentes regiões, sendo que a especificidade anatômica e funcional pode ser organizada na forma de 4 colunas longitudinais que se estendem ao longo do eixo rostro-caudal: colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (BANDLER; cols., 2000).

A SCP, quando estimulada eletricamente, promove reações defensivas em gatos (FERNANDEZ DE MOLINA; HUNSPERGER, 1959). Como a estimulação elétrica pode estimular tanto corpos neuroniais como fibras de passagem, Bandler (1982) utilizou a técnica de microinjeção de AAE (os quais excitam apenas corpos celulares), demonstrando que a SCP de gatos mediava reações defensivas integradas. Além da mediação de respostas defensivas associadas ao medo e ansiedade, a SCP está envolvida na integração de outras diversas funções, tais como dor e analgesia, controle cardiovascular e respiratório, vocalizações e comportamentos sexuais. (BEHBEHANI, 1995).

A estimulação da porção dorsal da SCP (SCPD) promove respostas aversivas que possuem muitas similaridades aos ataques de pânico em humanos. Em humanos, a estimulação elétrica dessa região produz ansiedade intensa, pânico, terror e sentimentos de morte iminente (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969). Em ratos a estimulação da SCPD também possui propriedades aversivas, uma vez que animais treinados aprendem

rapidamente a interromper a estimulação elétrica dessa estrutura (SCHENBERG; GRAEFF, 1978). A estimulação da SCPD também produz comportamentos incondicionados que são remanescentes de ataques de pânico experimentais e clínicos em humanos (SCHENBERG et al., 2001). Dessa maneira, devido à semelhança entre as reações humanas e animais, a estimulação da SCP em animais tem sido proposta como um modelo experimental de ataques de pânico (DEAKIN; GRAEFF, 1991; LOVICK, 2000).

GRAEFF (1990) propôs que a SCP, juntamente com o hipotálamo medial e a amígdala, constituiria um sistema organizado reciprocamente que representaria o principal substrato neural para a expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos. Este sistema foi denominado de Sistema Cerebral Aversivo (SCA) e é organizado de maneira hierárquica, onde a SCP constituiria o nível mais primitivo, sendo responsável por respostas imediatas e não direcionadas como a fuga ou luta. O córtex cingulado e a amígdala, níveis hierarquicamente superiores, elaborariam respostas mais complexas.

Além da SCPD, hipotálamo e amígdala, há evidências de que também o colículo superior-que processa informações visuais - e o colículo inferior (mantém estreitas conexões anatômicas com a SCP e a amígdala)- que é uma plataforma importante de vias auditivas que se projetam para o tálamo e o córtex temporal - participem do SCA (BRANDÃO et al., 1994). A manipulação elétrica ou farmacológica nessas regiões é capaz de promover reações de fuga ou alterar os níveis de ansiedade em vários modelos animais (BRANDÃO et al., 2003).

3.2- Neurotransmissão Glutamatérgica na SCP

Diversas evidências sugerem que o glutamato desempenha um papel facilitador nas reações de defesa na SCPdl (BANDLER, 1982; DEPAULIS; BANDLER; VERGNES, 1989; ZHANG; BANDLER; CARRIVE, 1990). Trabalhos iniciais mostraram a ocorrência de

reações autonômicas, como aumento de pressão arterial e frequência cardíaca (CARRIVE, 1993) que acompanham reações de luta ou fuga, após administração de glutamato na SCPdl de gatos (BANDLER; CARRIVE, 1988) e ratos (KRIEGER; GRAEFF 1985).

A SCP recebe uma complexa rede de vias aferentes encefálicas, muitas das quais utilizam AAE (BEART et al., 1990). Aferências provenientes da medula espinhal também parecem utilizar o glutamato como neurotransmissor (AZKUE et al., 1997).

A presença de glutamato e enzimas, envolvidas na sua síntese, foram descritos em neurônios e terminais da SCP (CLEMENTS et al., 1987; BARBARESI, 2001). Receptores glutamatérgicos estão presentes ao longo de toda a SCP, porém apresentam distribuição heterogênea apresentando maior densidade na coluna dorsolateral (ALBIN et al., 1990). Além disso, moléculas transportadoras de glutamato também foram localizadas na SCP (BARBARESI, 2001).

A microinjeção de um antagonista de rNMDA, o AP-7, administrado na SCPdl produz efeitos ansiolíticos (GUIMARÃES et al., 1991) no labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste de lambar punido de Vogel (MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2002), sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica na SCPdl poderia ter um papel importante nas reações de defesa eliciadas neste modelo. Além disso, a estimulação de rNMDA na SCPdl promove uma resposta hipertensora, que pode ser potencializada por injeções de glicina, o co-agonista do rNMDA (BERRINO et al., 1993).

Microinjeções na SCPdl de antagonistas específicos de receptores AMPA/Cainato (MATHEUS; GUIMARÃES, 1997) e para os diferentes sítios de ligação existentes no rNMDA (GUIMARÃES et al., 1991; SCHIMITT; GRAEFF; CAROBREZ, 1990; MATHEUS et al., 1994) promoveram efeitos ansiolíticos no LCE. Por outro lado, a injeção de agonistas para o sítio da glicina no rNMDA nesta mesma região induziu efeitos

ansio gênicos (SCHIMITT et al., 1995; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; CAROBREZ, 2003).

Ao contrário dos iGluR, o papel dos mGluR na SCP só começou a ser estudado recentemente, estes receptores também podem exercer controle sobre a pressão arterial (LEYVA et al., 1995), modulação da liberação de serotonina em ratos (MAIONE et al., 1998a) e nocicepção em camundongos (MAIONE et al., 1998b).

Com relação às reações de defesa, Molchanov e Guimarães (1999) mostraram que a microinjeção intra-SCPdl do agonista não seletivo de mGluR, o t-ACPD, promoveu reações de fuga em ratos, acompanhadas de diversas alterações comportamentais como por exemplo, inibição do comportamento de auto-limpeza e levantamentos quando os animais eram colocados numa arena. Em adição, resultados de Molchanov (2003) mostraram que os receptores de mGluR exercem um importante e complexo papel na expressão comportamental das reações defensivas desencadeadas pela SCPdl. Existe uma interação entre os mGluR e iGluR na modulação dessas respostas e a ativação de mGluR na SCPdl promove ativação neuronal local, incluindo células capazes de produzir NO. (para revisão ver MOLCHANOV, 2003).

3.3- Neurotransmissão Nitrérgica na SCP

Além do glutamato, diversas evidências indicam que o NO também possa ser um importante fator que contribui para a regulação da excitabilidade neuronal da SCPdl (LOVICK, 2000). Vincent e Kimura (1992) mostraram que há uma grande concentração de neurônios contendo a NOS na SCPdl e em outras regiões relacionadas com reações defensivas como o hipotálamo medial e amígdala. Além disso, esses neurônios ocupam uma área bem delimitada que define a coluna dorsolateral da SCP (ONSOTT; MAYER; BEITZ, 1993).

No intuito de investigar um possível papel deste neurotransmissor na ansiedade, Guimarães et al. (1994) demonstraram que inibidores da formação do NO produzem efeitos ansiolíticos quando injetados na SCPdl. Este trabalho foi o primeiro a relacionar, diretamente, o NO com a ansiedade, sugerindo, além disso, um possível local de ação. Embora alguns resultados inconsistentes existam na literatura, a maior parte dos estudos com injeção sistêmica de inibidores da NOS confirmaram esses dados, indicando efeito ansiolítico (para revisão, ver DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001).

Além de drogas que inibem a síntese de NO, inibidores da GC e inibidores de PDE promoveram, respectivamente, efeitos ansiolíticos em ratos e ansiogênicos em camundongos no LCE (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001; VOLKE; WEGENER; VASAR, 2003; KURT et al., 2004), sugerindo que o GMPc possa ser o mediador pelo qual o NO estaria induzindo ansiedade. Além disso, Morato, Ortiga e Ferreira (2004) demonstraram que a inibição da via NO/GC/GMPc na SCPdl potencializa o efeito ansiolítico do etanol no LCE, enquanto que a ativação dessa via induz efeitos opostos.

Outros estudos mostraram que a injeção de doadores de NO na SCPdl produz reações de fuga e ativação de áreas cerebrais ligadas à ansiedade (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES 2000, 2001). Além disso, exposição a eventos aversivos leva a aumento da expressão do RNAm e da proteína da nNOS em regiões relacionadas à elaboração de respostas a ameaças (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES; 2000, 2001).

4. Via rNMDA, NO e GMPc.

Vários trabalhos têm mostrado o envolvimento da via rNMDA-NO-GMPc na participação de processos fisiológicos como controle cardiovascular central, LTP hipocampal e aspectos comportamentais relacionados com ansiedade (GUEVARA-GUSMAN; EMSON;

KENDRICK, 1994; MEFFERT et al., 1994; BOGDANOV; WURTMAN, 1997, GARTHWAITE cols., 1989 ; PODHORNA; BROWN, 2000).

Assim, dados de Chianca et al., (2004) demonstraram a formação de GMPc após ativação de rNMDA em respostas pressóricas fisiológicas mediadas pelo glutamato no núcleo do trato solitário (NTS) em ratos, sendo que este efeito foi antagonizado pelo inibidor específico da guanilato ciclase, ODQ. Além disso, mudanças cardiovasculares induzidas pelo NO nesta mesma região também podem ser mediadas pela via dependente de GMPc e os efeitos cardiovasculares do glutamato podem ser bloqueados através da inibição da NOS ou da atividade da GC (LIN et al., 2000). Da mesma forma, o bloqueio dos receptores de glutamato também atenuam os efeitos cardiovasculares do NO nesta região (LO et al., 1997; LIN; WAN; TSENG, 1999).

Corroborando a hipótese de que há um mecanismo regulatório recíproco entre NO e o glutamato através da ativação dos rNMDA na regulação cardiovascular central no NTS, Lin et al. (2000), demonstraram que a administração exógena de NO foi capaz de induzir a liberação de glutamato, enquanto que a inibição da NOS reduziu o nível basal desse neurotransmissor. Além disso, os mesmos autores demonstraram que a estimulação dos rNMDA também é capaz de promover aumento na produção de NO.

A interação também foi observada em fenômenos eletrofisiológicos. Bon e Garthwaite (2001) observaram que a LTP hipocampal induzida por um doador de NO foi atenuada tanto por um inibidor da NO sintase, quanto por um antagonista NMDA, sugerindo que a via NMDA-NO seria necessária para os efeitos do NO exógeno. Além disso, esses autores (BON; GARTHWAITE, 2003) demonstraram que o NO endógeno não só participa na indução do processo, mas também possui uma importância além dessa fase via GMPc .

Podhorna e Brown (2000) mostraram que a interação entre rNMDA e NO, previamente demonstrado *in vitro* e em funções cardiovasculares, também pode ser observado

no aspecto comportamental. No modelo de vocalização ultrassônica em filhotes de ratos, observou-se que a administração sistêmica de NMDA induziu um aumento de vocalizações (efeito ansiogênico), que foi revertido pela administração de um inibidor da NOS.

Além disso, o pré-tratamento com AP-7 ou com antagonistas dos receptores AMPA/Cainato (NBQX) na SCPdl foi capaz de inibir a reação de fuga induzida por um doador de NO (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004). Isto sugere uma interação entre a neurotransmissão mediada por AAE e NO na SCPdl, modulando reações defensivas.

A maneira pela qual estes dois neurotransmissores interagem nesta região, no entanto, ainda não está clara. Dessa forma, considerando-se o trabalho de Bon e Garthwaite (2001) em relação à LTP hipocampal, a hipótese do presente trabalho foi que as respostas de fuga promovidas pela administração de um doador de NO ou de um agonista de rNMDA dependem da formação de NO endógeno.

Objetivo

O objetivo geral do presente trabalho foi de continuar a investigação da relação NO/glutamato na mediação das reações de defesa na SCPdl. Os objetivos específicos foram:

1- Testar a hipótese de que a formação de NO endógeno esteja implicada nas reações comportamentais promovidas pelo doador de NO injetado na SCPdl;

2- Testar a hipótese de que a formação de NO endógeno esteja implicada nas reações comportamentais promovidas pelo agonista de rNMDA injetado na SCPdl.

Animais:

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 200-250 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP-Ribeirão Preto, os quais foram mantidos aos pares em caixas de acrílico (25 x 18 x 35 cm), tendo livre acesso à água e comida. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório até o momento dos testes, à temperatura de 24 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas, com início às 7:00 h.

Drogas:

- Cloreto de 3-morfolinilsidnoneimina, SIN – 1 (RBI): 150 nmoles/0,5 μ l (doador de NO-R.B.I.). As doses, capazes de produzir reações de fuga, foram retiradas de De Oliveira 2000.
- Nitro-L-arginina-N-metil éster, L-NAME (Sigma): 100 nmoles/0,5 μ l; 100 e 200 nmoles/0,2 μ l (inibidor não seletivo da NOS-R.B.I.). As doses foram baseadas a partir da dose (100 nmoles) capaz de produzir efeitos ansiolíticos quando administrada isoladamente na SCPdl (GUIMARÃES et al., 1994).
- N-metil-D-Aspartato, NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l, agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA-Sigma). Dose baseada na literatura (BITTENCOURT et al., 2004) e em experimentos pilotos (dados não mostrados).
- 1H-[1,2,4] Oxadiazolol [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ)- 0,3 1 e 3 nmoles/0,2 μ l (inibidor da guanilato ciclase - R.B.I.).
- Carboxy-PTIO sal potássio – 1 e 3 nmoles/0,2 μ l (seqüestrador de NO - R.B.I.)

Todas as drogas foram dissolvidas em salina estéril, com exceção do ODQ que foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO – Sigma). Os grupos controles para essa droga receberam DMSO em volume equivalente.

Implantação da cânula-guia.

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % (10 ml/kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopff). Fez-se uma incisão sagital para exposição da calvária e remoção do periósteo, a calota craniana foi perfurada com um orifício (coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4 mm, ângulo-16°, PAXINOS; WATSON, 1997) para introdução da cânula guia (11 mm) dirigida à SCPdl, a qual foi fixada ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios (GUIMARÃES et al., 1991). Foi introduzido na cânula um mandril de aço inoxidável para evitar obstrução. Os animais receberam injeção de pentabiótico e do analgésico, antitérmico e antiinflamatório banamine (flunixin meglumine, 1 ml/Kg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (5-7 dias).



Figura 1: Fotografia de animal com cânula implantada na SCPdl, durante cirurgia estereotáxica.

Microinjeção

A microinjeção foi feita segurando gentilmente o animal para corte e retirada do mandril e introdução pela cânula guia de uma agulha odontológica gengival (12 mm), até atingir a SCPdl 1mm abaixo da extremidade da cânula. A microagulha estava conectada a uma microseringa Hamilton de 10 μ l por meio de um segmento de Polietileno (P10). As

microinjeções foram feitas com ajuda de uma bomba de infusão (KD Scientific, USA) a uma velocidade de 1 μ l/min.



Figura 2: Fotografia de um animal com a agulha de injeção posicionada na cânula-guia.

Testes comportamentais

Arena circular:

A arena circular é constituída por uma parede de acrílico transparente de 60 cm de altura com fundo preto de 60 cm de diâmetro. O comportamento de cada animal foi gravado por uma câmera de vídeo (HNS-15B-Sony), localizada 3,5 metros acima da arena. O teste ocorreu em sala iluminada com uma luz branca de 60 W, colocada a 4 metros do solo e com ruído de fundo constante fornecido por um exaustor de ar. Após cada teste a arena era limpa com uma solução de álcool (70 %). Os filmes foram depois reproduzidos num vídeo (NV-SJ435) conectado a um computador e analisados pelo programa Ethovision (versão 1.9; Noldus), registrando-se a distância percorrida durante o teste.

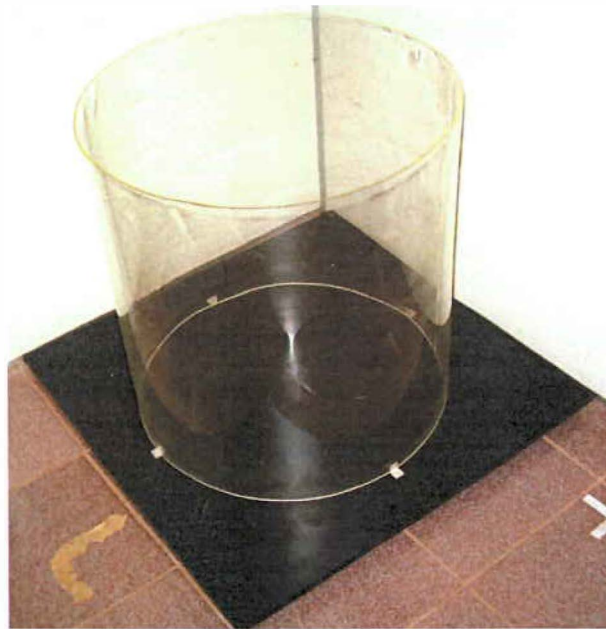


Figura 4: Fotografia da arena circular.

Caixa de observação:

A caixa de observação é constituída de acrílico transparente (29 X 19 X 34 cm) com tampa de malha plástica. O teste ocorreu em sala iluminada com uma luz branca de 60 W, colocada a 4 metros do solo, e com ruído de fundo constante fornecido por um exaustor de ar. O comportamento dos animais foi gravado por 2 minutos a partir do início da infusão das soluções por uma câmera de vídeo (VL-L170-Sharp) localizada lateralmente à caixa, a uma distância aproximada de 50 cm. Os filmes foram depois reproduzidos por um vídeo-cassete (NV-SJ435), registrando-se o número de pulos e cruzamentos da linha média da caixa. O critério utilizado para considerar um pulo era de que o animal retirasse as quatro patas do chão simultaneamente. Para considerar um cruzamento era necessário que o animal atravessasse a linha média com as quatro patas, conforme descrito por Molchanov (2004). Após cada teste a caixa era limpa com álcool (70 %).



Figura 3: Fotografia de um animal na caixa de observação.

Labirinto em cruz elevado

O aparelho experimental utilizado foi um labirinto de madeira, formado por dois braços fechados e dois braços abertos, de 50 cm de comprimento por 10cm de largura cada um, unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Os braços fechados possuem paredes de madeira de 40 cm de altura que os circundam, e os braços abertos possuem uma borda lateral de acrílico de 1cm para evitar uma possível queda dos animais. O teste ocorreu em sala iluminada com uma luz branca de 60 W, colocada a 4 metros do solo, e com ruído de fundo constante fornecido por um exaustor de ar. O comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo (HNS-15B-Sony) localizada 3 metros acima do labirinto. No intervalo entre os testes o labirinto era limpo com uma solução de álcool (70 %). Os filmes foram depois reproduzidos num vídeo-cassete (NV-SJ435) conectado a um computador e analisados pelo programa Ethovision (versão 1.9; Noldus), registrando-se o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados.

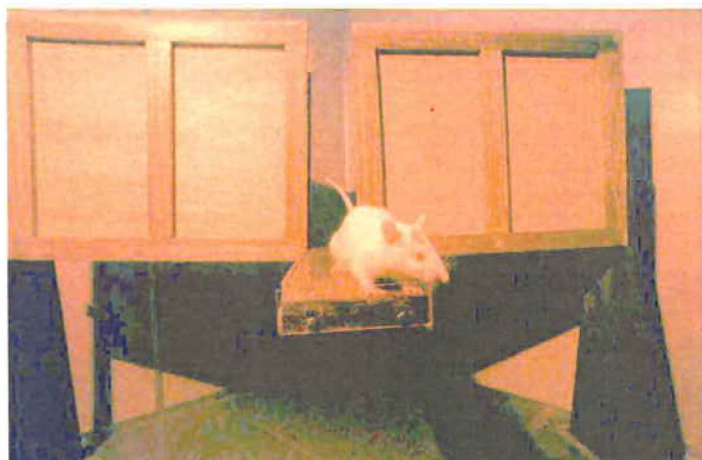


Figura 5: Fotografia de um animal sendo testado no LCE.

Histologia

Ao término dos testes era feita a verificação do local da microinjeção. Os animais foram anestesiados com Uretana 25 % (5 ml/Kg) e sofreram perfusão intracardíaca com salina 0,9 % e formol 10 %. Os cérebros foram removidos, estocados em formol 10 % por 3 a 7 dias, e cortados, ao nível do sítio de injeção, em secções de 50 μ m de espessura em um criostato de congelamento (Leica 1800). Os cortes eram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e eram analisados para a verificação do local de injeção com o auxílio de um microscópio (Olympus BX50), segundo os diagramas do Atlas Paxinos e Watson, 1997.

Protocolos Experimentais e Procedimento:

Experimento I: Efeito do L-NAME na reação de fuga induzida pelo SIN-1 na SCPdl.

Grupos:

- salina (0,5 μ l) + salina (0,5 μ l)
- L-NAME (100 nmoles/0,5 μ l) + salina (0,5 μ l)
- salina (0,5 μ l) + SIN-1 (150 nmoles/0,5 μ l)
- L-NAME (100 nmoles/0,5 μ l) + SIN-1 (150 nmoles/0,5 μ l)

Experimento II: Efeito do ODQ injetado na SCPdl na ansiedade medida no LCE..

Grupos:

- DMSO (0,2 μ l)
- ODQ (0,3 nmol/0,2 μ l)
- ODQ (1 nmol/0,2 μ l)
- ODQ (3 nmoles/0,2 μ l)

Experimento III: Efeito do L-NAME na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl.

Grupos:

- salina (0,2 μ l) + salina (0,2 μ l)
- L-NAME (100 nmoles/0,2 μ l) + salina (0,2 μ l)
- L-NAME (200 nmoles/0,2 μ l) + salina (0,2 μ l)
- salina (0,2 μ l) + NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l)
- L-NAME (100 nmoles/0,2 μ l) + NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l)
- L-NAME (200 nmoles/0,2 μ l) + NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l)

Experimento IV: Efeito do Carboxy-PTIO na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl

Grupos:

- salina (0,2 μ l) + salina (0,2 μ l)
- Carboxy-PTIO (1 nmol/0,2 μ l) + salina (0,2 μ l)
- Carboxy-PTIO (3 nmoles/0,2 μ l) + salina (0,2 μ l)
- salina (0,2 μ l) + NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l)
- Carboxy-PTIO (1 nmol/0,2 μ l) + NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l)

- Carboxy-PTIO (3 nmoles/0,2 µl) + NMDA (0,1 nmol/0,2 µl)

Experimento V: Efeito do ODQ na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl

Grupos:

- DMSO (0,2 µl) + salina (0,2 µl)
- ODQ (1 nmol/0,2 µl) + salina (0,2 µl)
- ODQ (3 nmoles/0,2 µl) + salina (0,2 µl)
- DMSO (0,2 µl) + NMDA (0,1 nmol/0,2 µl)
- ODQ (1 nmol/0,2 µl) + NMDA (0,1 nmol/0,2 µl)
- ODQ (3 nmoles/0,2 µl) + NMDA (0,1 nmol/0,2 µl)

Procedimento:

No experimento I, os animais receberam duas microinjeções com intervalo de 10 minutos entre elas, no volume de 0,5 µl. Após receberem a segunda microinjeção, os animais foram colocados na arena por 10 minutos conforme descrito por Moreira; Molchanov; Guimarães (2004).

No experimento II, os animais receberam uma microinjeção no volume de 0,2 µl. Após 10 minutos, foram colocados no centro do labirinto, em direção à um dos braços fechados e tiveram o comportamento observado por 5 minutos, conforme descrito por Guimarães et al. (1991).

As respostas comportamentais promovidas pela injeção de NMDA iniciam-se durante a infusão da droga. Desta forma, optou-se por utilizar a metodologia empregada por Molchanov (2004), nos experimentos III a V. Os animais pertencentes aos grupos experimentais para essa droga receberam a primeira infusão soltos numa caixa. Após a introdução da microagulha para a segunda microinjeção, foram colocados na caixa de observação para registro do comportamento, na qual se procedeu a infusão da segunda solução. Após permanecerem por 2 minutos na caixa de observação, os animais foram colocados na arena circular durante 5 minutos.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com o programa de estatística SPSS para Windows (Versão 6.0). As variáveis aferidas durante a observação na caixa (número de pulos e número de cruzamentos), e no labirinto (número de entradas nos braços fechados e % de entradas e tempo no aberto/total) foram primeiramente analisadas pelo teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov, para verificar se possuíam uma distribuição normal. As variáveis que possuíam distribuição normal foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida de Duncan. As que não possuíam foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Os dados dessa última análise foram representados como mediana \pm intervalo interquartil (I.R.), enquanto os primeiros o foram por média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

Os resultados do teste da arena circular foram analisados por Análise Multivariada de Variância (MANOVA) para medidas repetidas, utilizando o tempo como fator repetido e o tratamento como fator independente. Em caso de interação significativa os tratamentos a cada tempo foram comparados por ANOVA seguida do teste de Duncan. Os dados foram representados como média \pm E.P.M. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados

Uma figura representativa do sítio de injeção e a localização dos mesmos em diagramas retirados do atlas de Paxinos e Watson (1997), podem ser vistos nas figuras 6 e 7 abaixo.

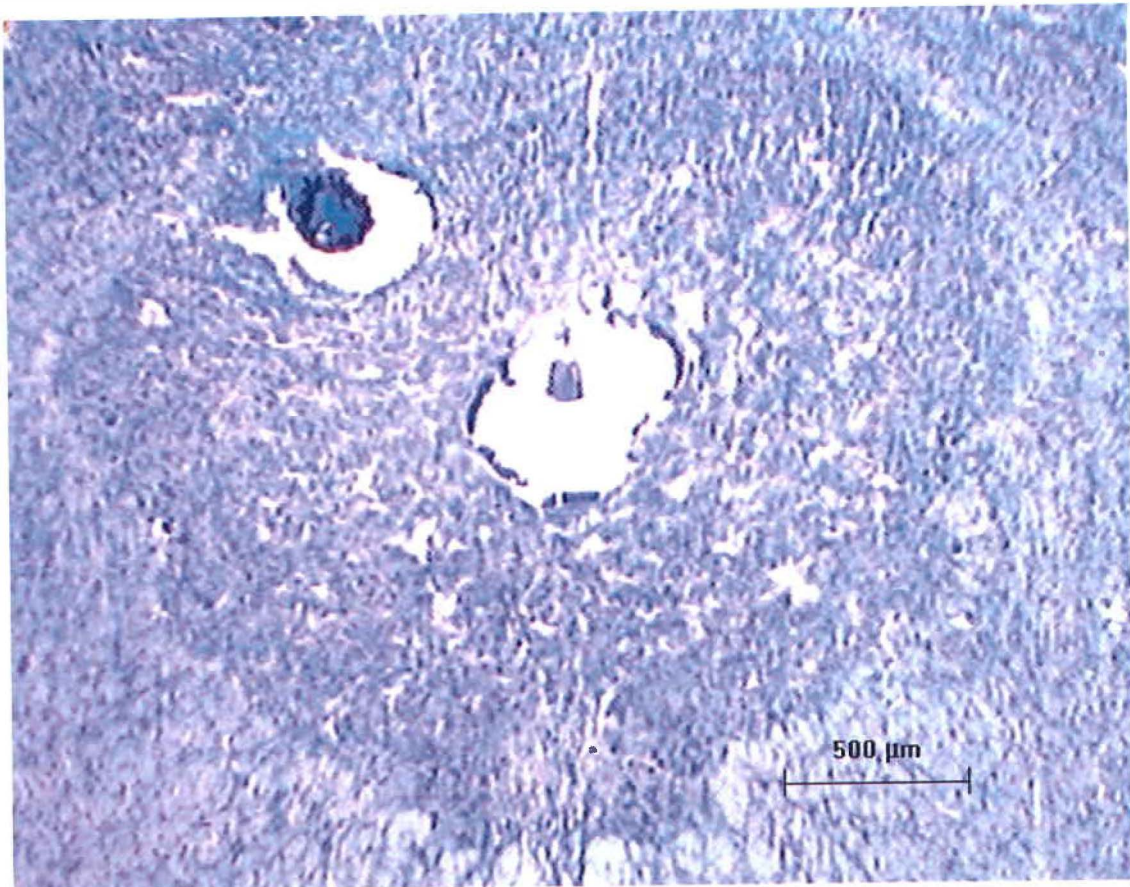


Figura 6: Fotografia de lâmina histológica com secção coronal representativa dos sítios de injeção na SCPdl. Técnica de coloração de Nissl.

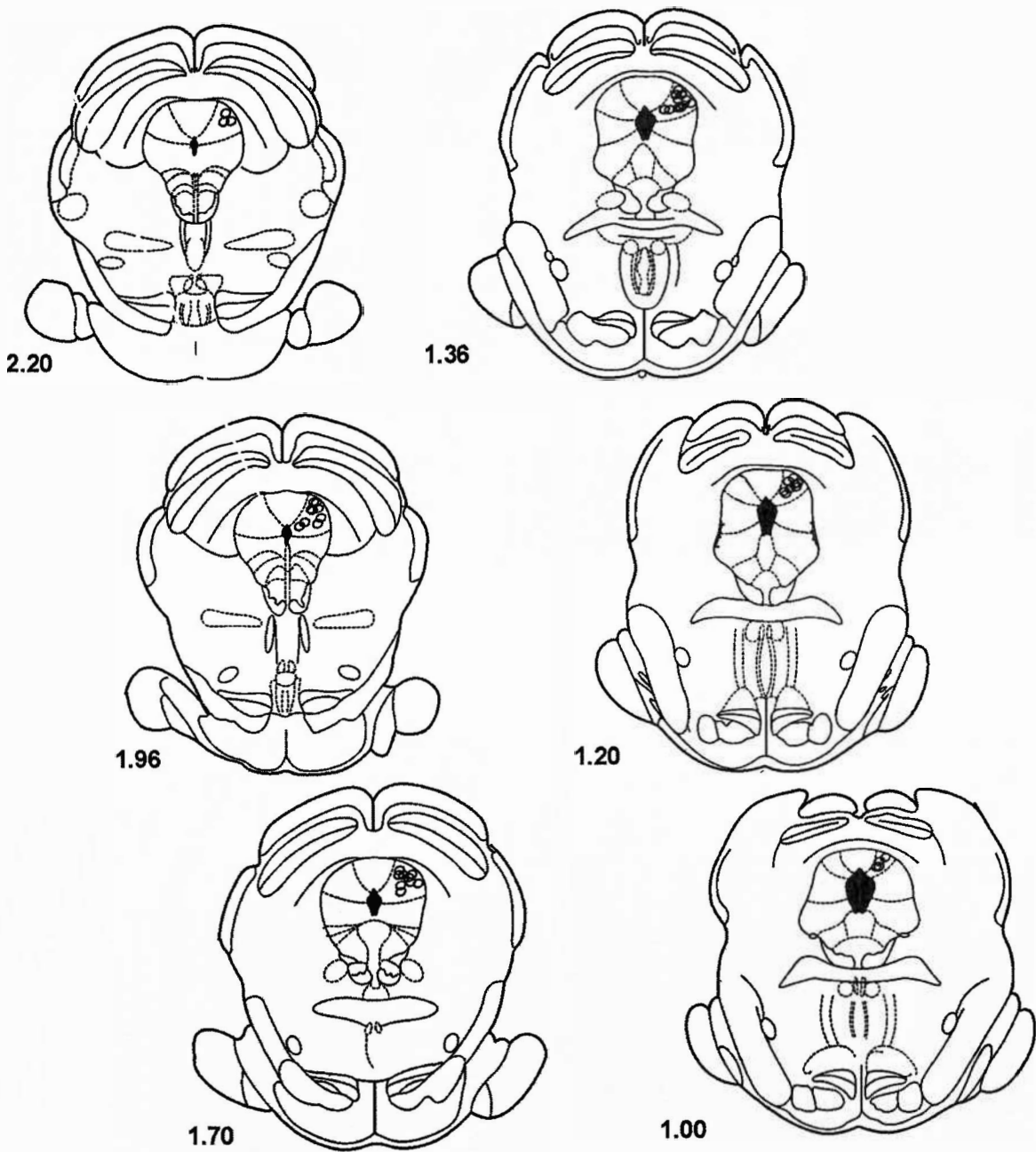


Figura 7: Localização de sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997), mostrando os sítios de injeções atingidos (O) pelas microinjeções na SCPdl.

Experimento I

Efeito do L-NAME na reação de fuga induzida pelo SIN-1 na SCPdl

A injeção de SIN-1 (150 nmoles/0,5 μ l) na SCPdl promoveu reação de fuga cuja duração foi de aproximadamente de 8 a 10 minutos, a qual inicia-se em torno de 2 minutos após a injeção. Esta reação caracteriza-se por um aumento significativo no número de pulos e galopes em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ Kruskal-Wallis seguido de Mann – Whitney; **Figura 8**). O pré-tratamento com L-NAME não modificou a expressão destes comportamentos defensivos (**Figura 8**).

Considerando-se a distância percorrida pelos animais, a injeção de SIN-1 não promoveu um aumento significativo em relação ao grupo controle (**Figura 9**). No grupo pré-tratado com L-NAME houve um aumento significativo na distância total percorrida ($F_{3,23} = 2,45$; $p = 0,09$; Duncan $p < 0,05$). Houve um efeito significativo do tempo ($F_{9,15} = 15,65$; $p < 0,001$) mas não ocorreu interação droga X tempo ($F_{27,41} = 1,42$; n.s.). (**Figura 9**).

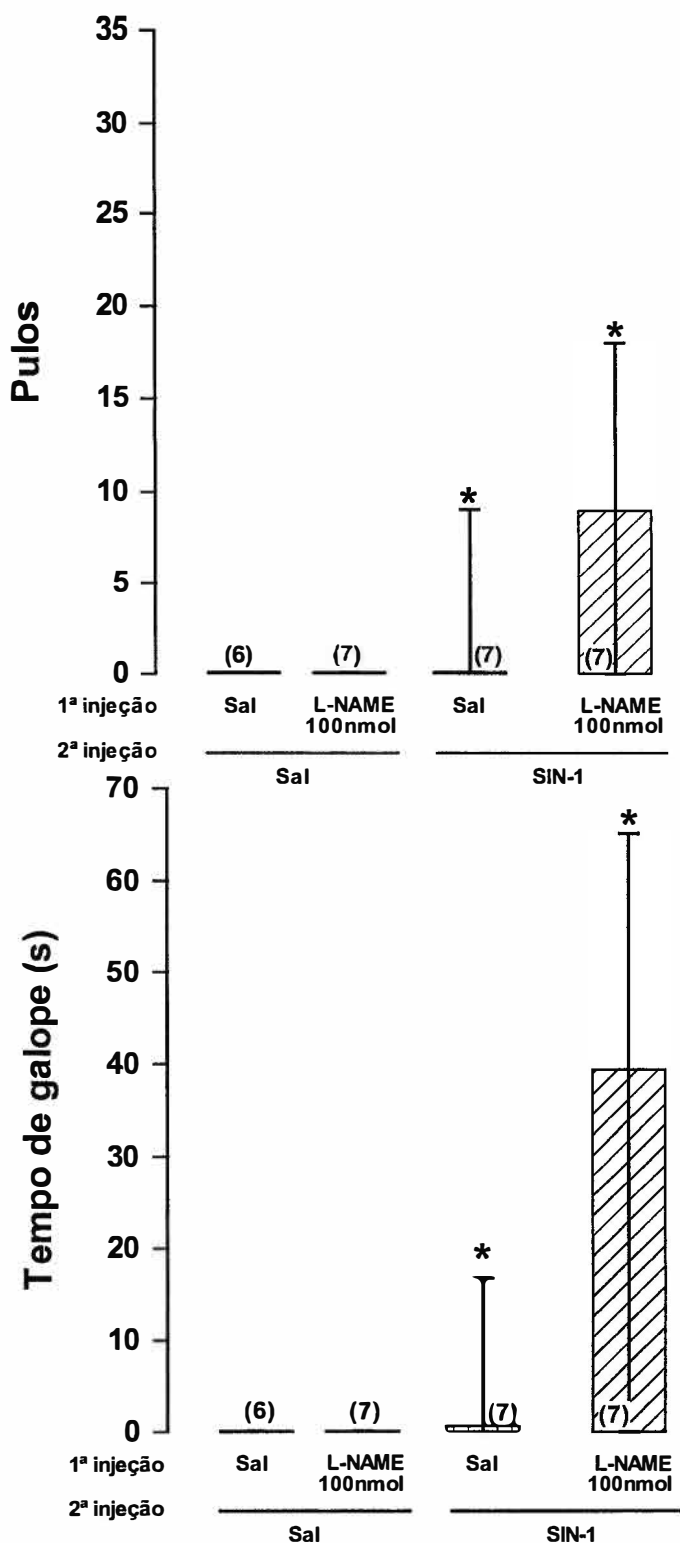


Figura 8: Efeito do L-NAME 100 nmoles/0,5 µl na reação de fuga promovida pela injeção de SIN-1 (150 nmoles/0,5 µl) na SCPdl de ratos observados na arena durante 10 minutos após as injeções. As colunas representam a mediana ± I.R. do número de saltos e tempo de galope (*p<0,05 em relação ao grupo salina, Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney). Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

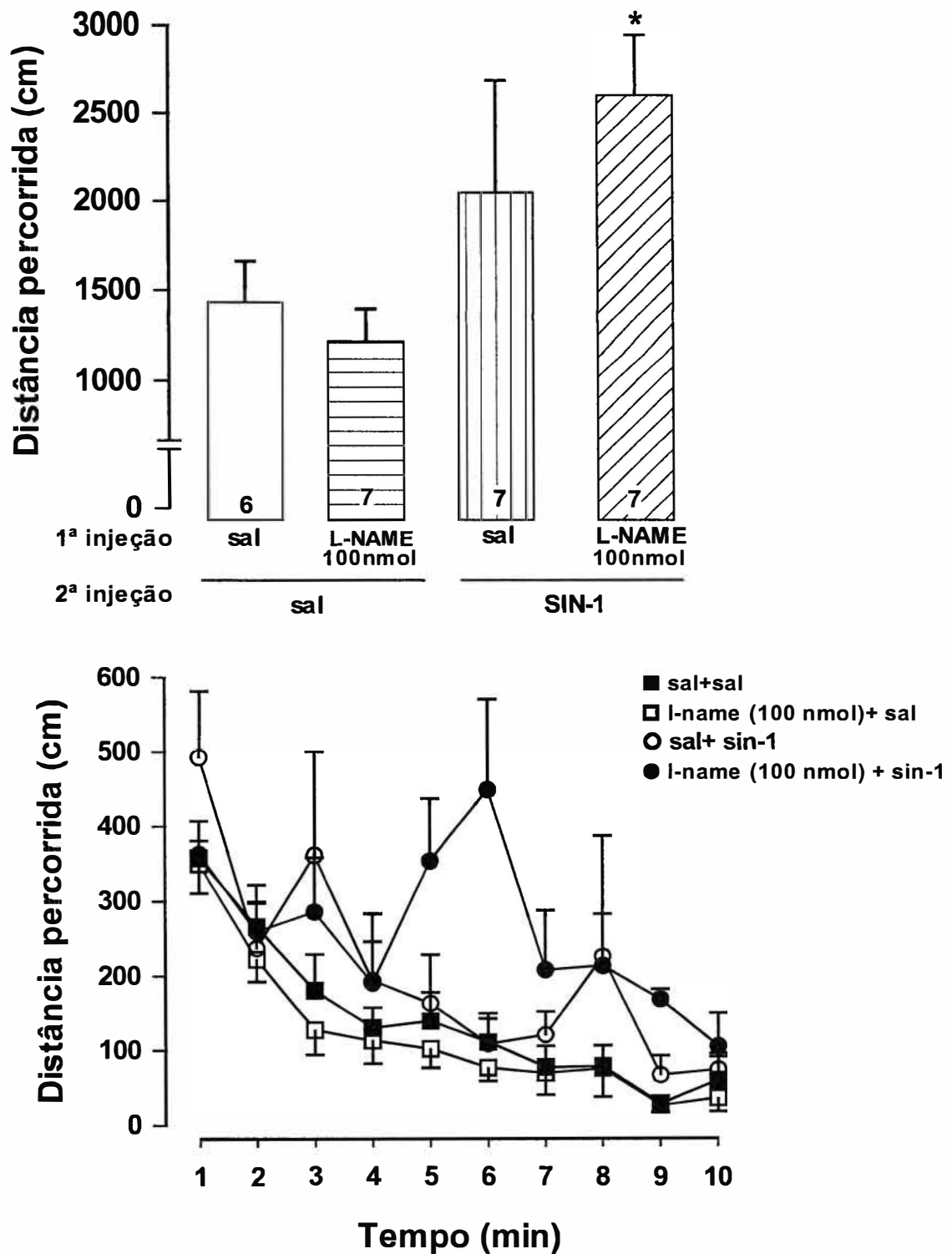


Figura 9: Efeito do L-NAME 100 nmoles/0,5 μ l na reação de fuga promovida pela injeção de SIN-1 (150 nmoles/0,5 μ l) na SCPdl de ratos observados na arena durante 10 minutos após as injeções. As barras verticais e os pontos representam a média \pm E.P. M. da distância total e a cada minuto. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, MANOVA seguida de Duncan) Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

Experimento II

Efeito do ODQ injetado na SCPdl na ansiedade medida pelo LCE

A microinjeção de 1 nmol/0,2 μ l na SCPdl promoveu aumento na percentagem de tempo gasto nos braços abertos (BA) do LCE ($F_{3,27} = 2,45$; $p = 0,08$; Duncan, $p < 0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significativas para as doses de 0,3 e 3 nmoles/0,2 μ l nos parâmetros avaliados, nem para a dose de 1 nmol de ODQ quando as injeções foram realizadas fora da SCPdl (**Figura 10**).

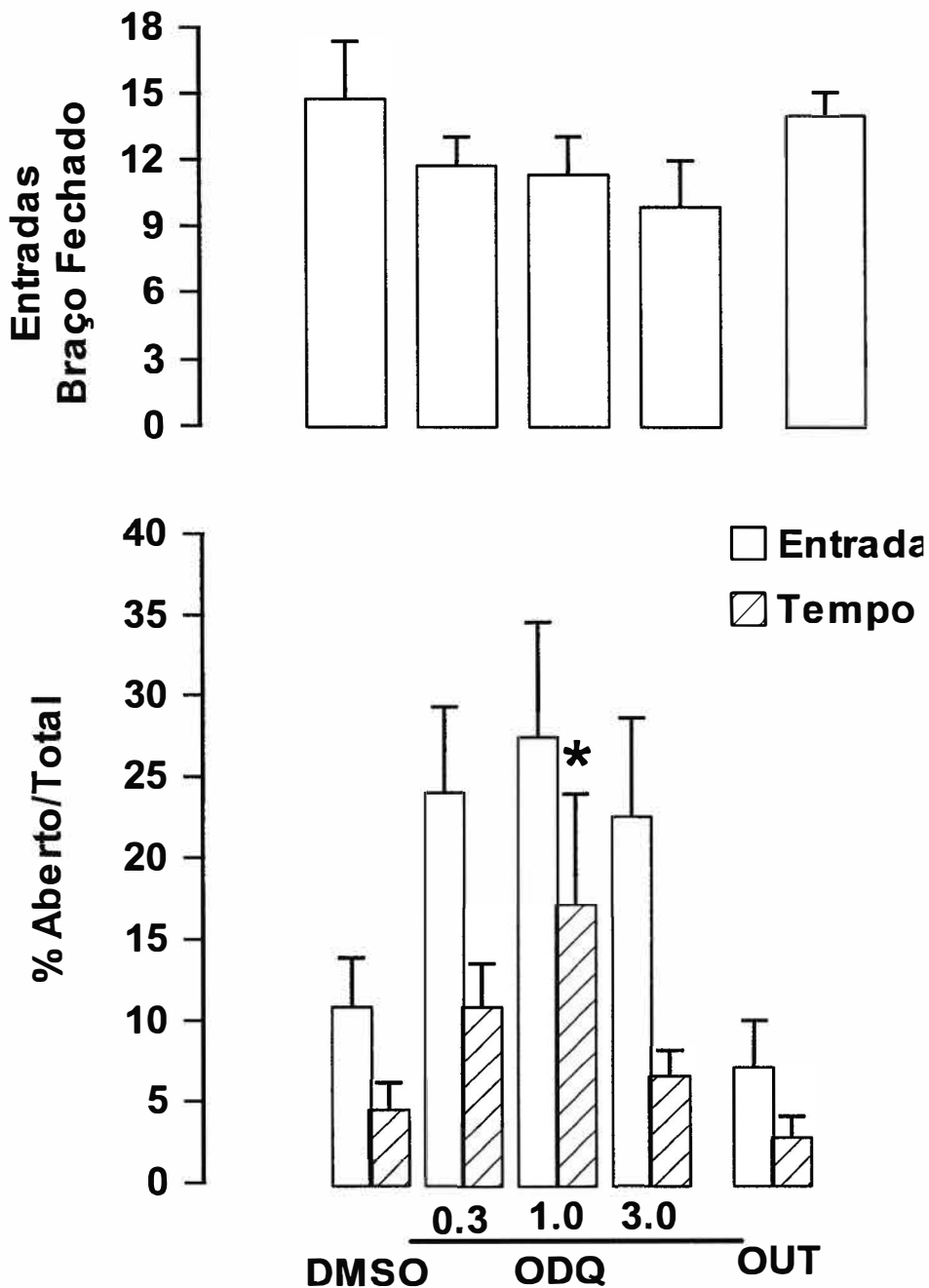


Figura 10: Efeito do ODQ 0,3; 1 e 3 nmoles/0,2 μ l injetado na SCPdl de ratos submetidos ao teste do labirinto. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechado foi registrado durante 5 minutos. As colunas representam as médias \pm E.P.M. do número de entradas no braço fechado e a porcentagem de entradas e tempo no braço aberto sobre o tempo total. ($p < 0,05$ em relação ao grupo DMSO, ANOVA seguida de Duncan). (N = 6-10). Animais que receberam a injeção de 1 nmol de ODQ fora da SCPdl foram analisados como grupo OUT.

Experimento III

Efeito do L-NAME na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl

A injeção de NMDA 0,1 nmol/0,2 μ l na SCPdl promoveu reação de fuga cuja duração foi de aproximadamente 2 minutos, a qual inicia-se durante a injeção na caixa de observação. Esta reação caracteriza-se por um aumento significativo no número de pulos e cruzamentos na caixa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; **Figura 11**). A injeção de L-NAME nas doses de 100 e 200 nmoles/0,2 μ l não foi capaz de modificar estes comportamentos apresentados após a administração de NMDA (**Figura 11**).

No teste da arena, realizado dois minutos após a injeção de NMDA, não houve diferença significativa na distância percorrida pelos animais ($F_{3,15} = 1,16$; n.s.), ocorrendo apenas um efeito ao longo do tempo ($F_{4,12} = 6,55$; $p < 0,001$). **Figura 12**

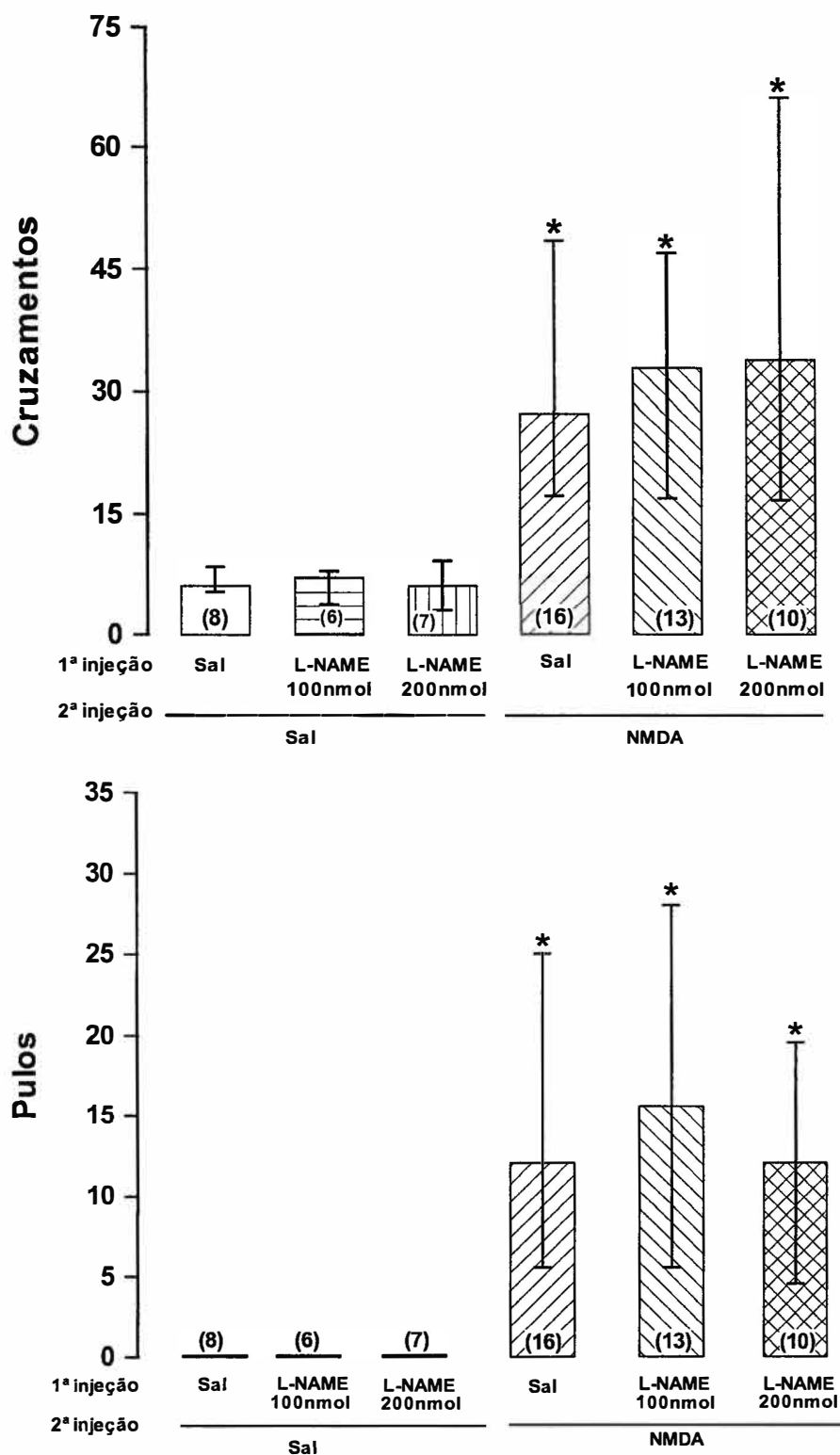


Figura 11: Efeito do L-NAME 100 e 200 nmoles/0,2 µl na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA(0,1 nmol/0,2 µl) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam mediana ± I.R do número de cruzamentos e pulos (* p <0,05 em relação ao grupo salina, Kruskal–Wallis seguido de Mann-Whitney). Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

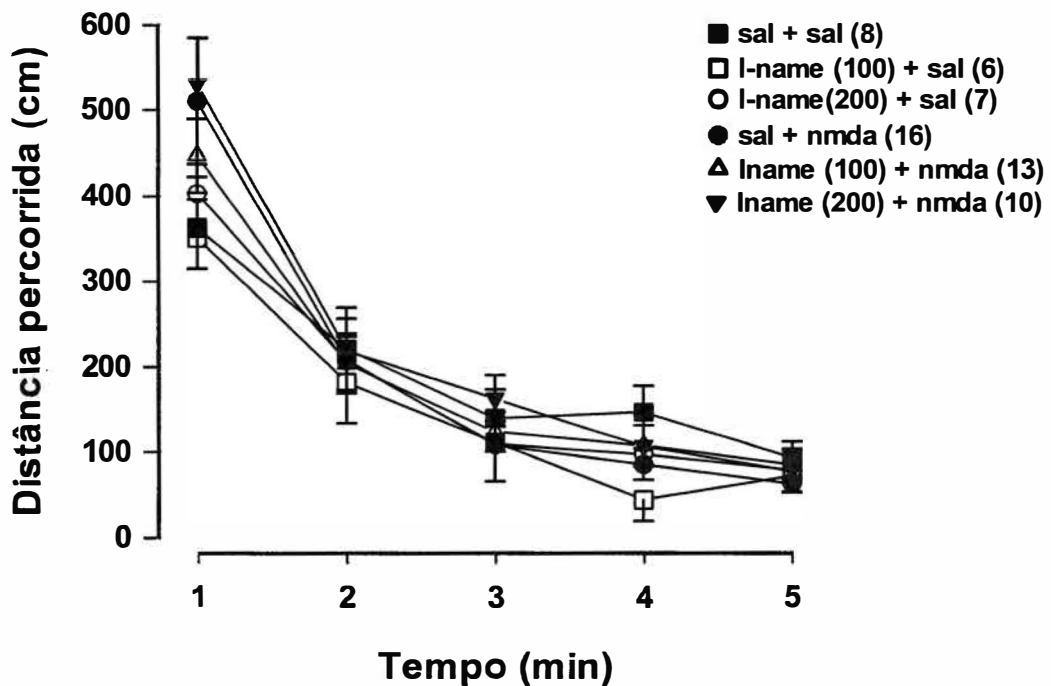
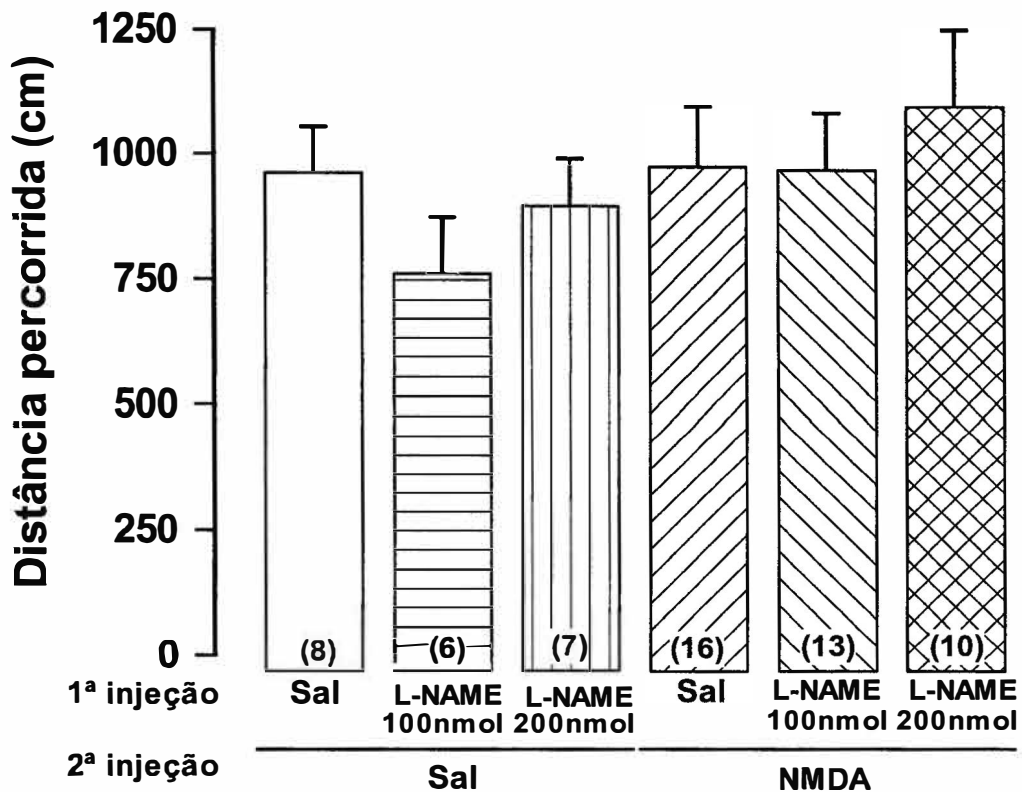


Figura 12: Distância percorrida total e minuto a minuto (cm) de ratos submetidos ao teste da arena por 5 minutos dois minutos após a injeção na caixa de observação. As barras verticais e os pontos representam a média \pm E.P. M. da distância total e a cada minuto. Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

Experimento IV

Efeito do Carboxy-PTIO na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl

A injeção de NMDA 0,1 nmol/0,2 µl na SCPdl promoveu fuga nos animais, caracterizada por um aumento significativo no número de pulos e cruzamentos na caixa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; **Figura 13**). A injeção de Carboxy-PTIO nas doses de 1 e 3 nmoles/0,2 µl não foi capaz de modificar estes comportamentos apresentados após a administração de NMDA (**Figura 13**).

No teste da arena, realizado dois minutos após a injeção de NMDA, não se detectou diferenças significativas na distância total percorrida entre os grupos ($F_{5,40} = 1,33$; n.s). Houve apenas um efeito significativo ao longo do tempo ($F_{4,37} = 92,33$; $p < 0,001$). **Figura 14**

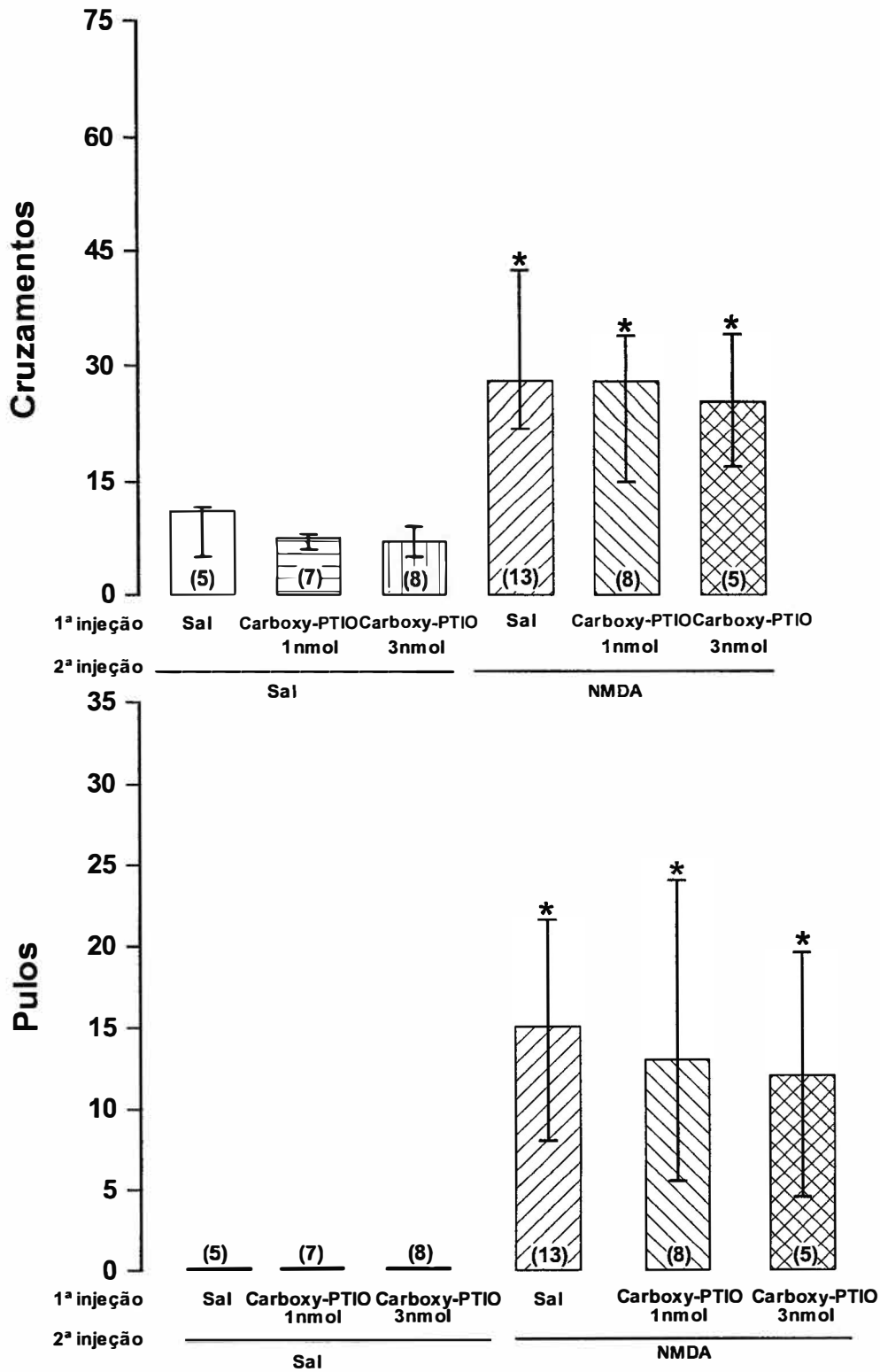


Figura 13: Efeito do Carboxy-PTIO 1 e 3 nmoles/0,2 µl na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (0,1 nmol/0,2 µl) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam a mediana ± I.R. do número de cruzamentos e pulos (* p < 0.05 em relação ao grupo salina; Kruskal–Wallis seguido de Mann–Whitney). Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

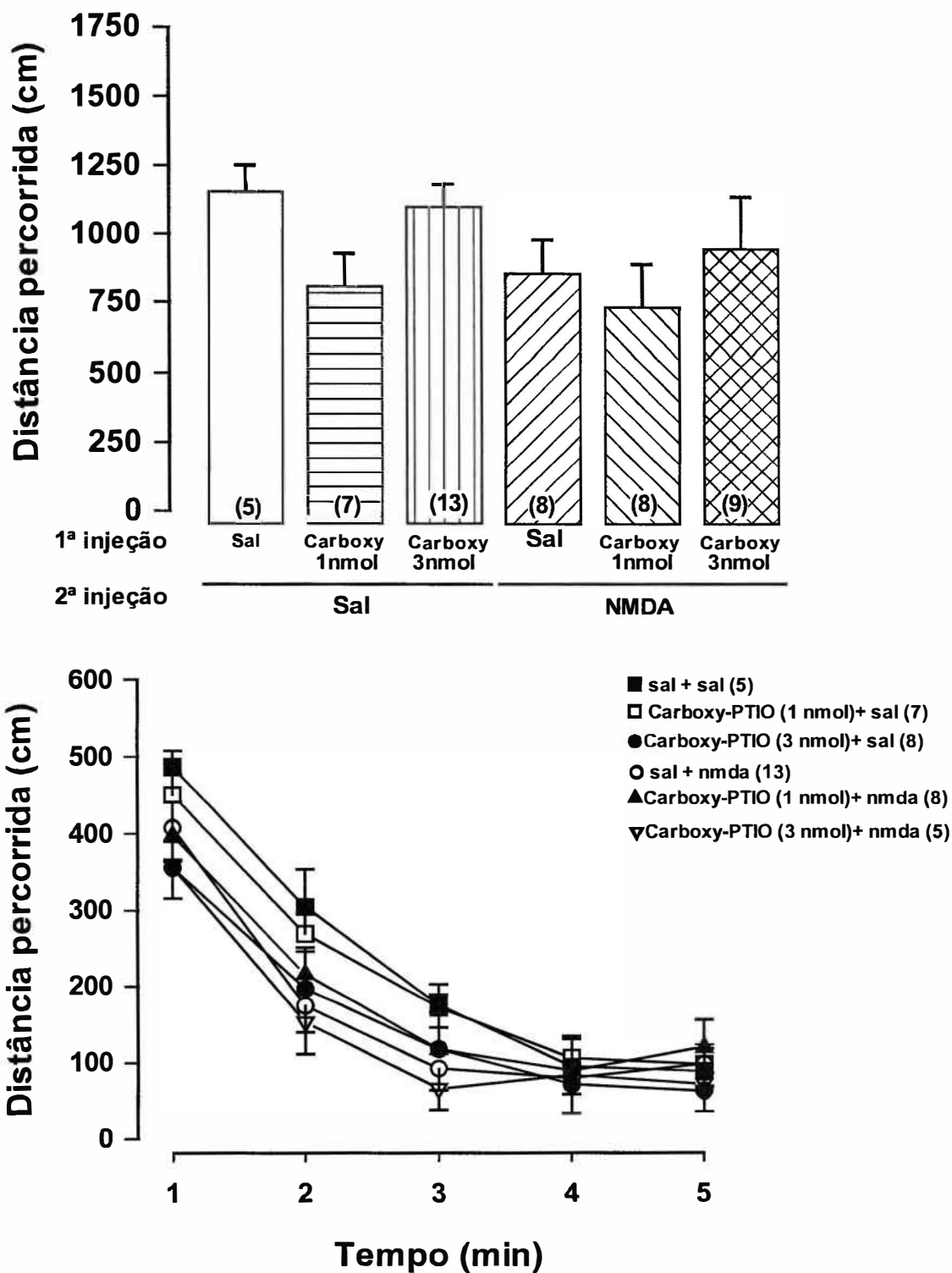


Figura 14: Distância percorrida total e minuto a minuto (cm) de ratos submetidos ao teste da arena por 5 minutos dois minutos após a injeção na caixa de observação. As barras verticais e os pontos representam a média \pm E.P. M. da distância total e a cada minuto. Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

Experimento V

Efeito do ODQ na reação de fuga induzida pelo NMDA na SCPdl

A injeção de NMDA 0,1 nmol/0,2 μ l na SCPdl promoveu fuga nos animais, caracterizada por um aumento significativo no número de pulos e cruzamentos na caixa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; **Figura 15**). A injeção de ODQ nas doses de 1 e 3 nmoles/0,2 μ l não foi capaz de modificar estes comportamentos apresentados após a administração de NMDA (**Figura 15**).

No teste da arena, realizado dois minutos após a injeção de NMDA, não se detectou diferenças significativas entre os grupos ($F_{5,31} = 0,8878$; $p = 0,5011$), ocorrendo apenas um efeito ao longo do tempo ($F_{4,28} = 6,008$; $p < 0,001$, **Figura 16**).

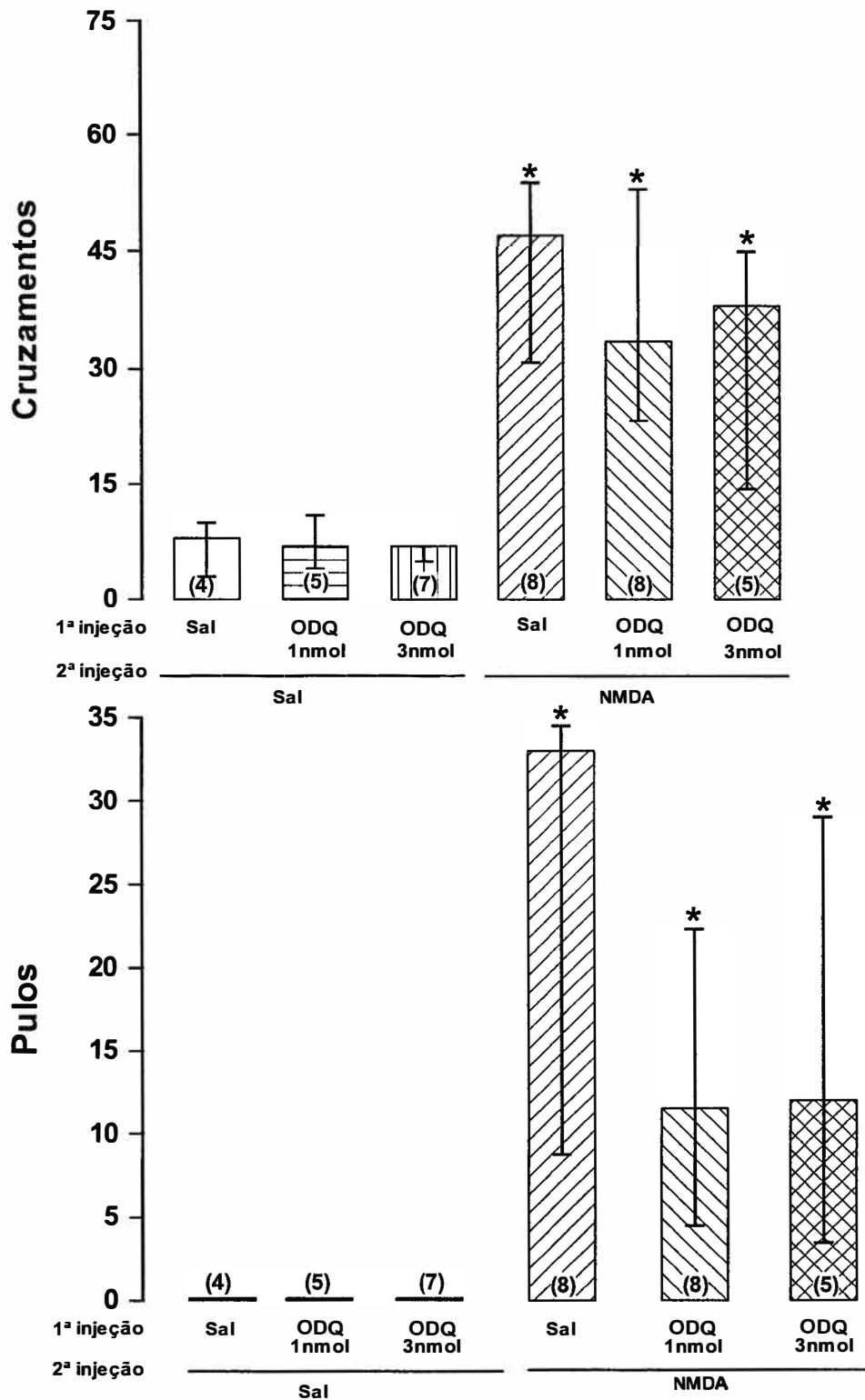


Figura 15: Efeito do ODQ 1 e 3 nmoles/0,2 μ l na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (0,1 nmol/0,2 μ l) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam a mediana \pm I.R. (* $p < 0.05$ em relação ao grupo salina, Kruskal–Wallis seguido de Mann-Whitney) Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

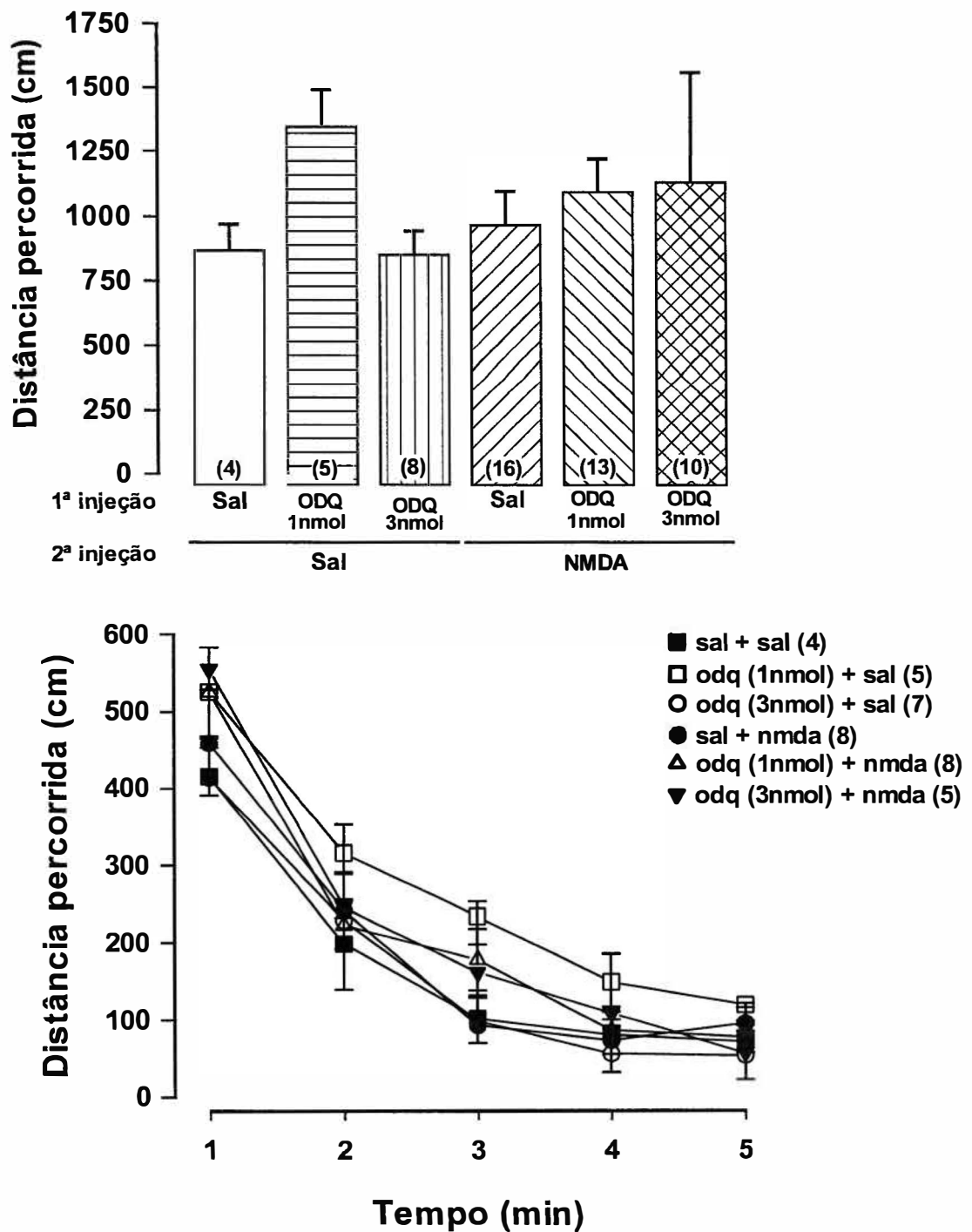


Figura 16: Distância percorrida total e minuto a minuto (cm) de ratos submetidos ao teste da arena por 5 minutos dois minutos após a injeção na caixa de observação. As barras verticais e os pontos representam a média \pm E.P. M. da distância total e a cada minuto. Os números entre parêntesis representam o n de cada grupo.

Discussão

Da mesma forma que os resultados obtidos anteriormente (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001; MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004; MOREIRA; GUIMARÃES, 2004), a microinjeção intra-SCPdl do doador de NO, SIN-1, resultou em reação de fuga, caracterizada por galopes e pulos, iniciando-se geralmente dois minutos após a injeção e com duração de aproximadamente oito minutos. As reações defensivas promovidas pelo SIN-1 caracterizam-se por serem mais duradouras do que as desencadeadas por outros doadores como o DEA/NO (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001), possivelmente por esses compostos possuírem diferentes cinéticas para a liberação de NO (SOUTHAM; GARTHWAITE, 1991). Além disso, o SIN-1 promove uma liberação lenta de NO que envolve a formação de compostos intermediários (FEELISH; OSTROWSKY; NOACK, 1989).

Por ser uma reação mais duradoura, a reação de fuga do SIN-1 tem como vantagem a avaliação de parâmetros característicos como galopes e pulos, os quais são propostos como reflexo de respostas aversivas, uma vez que esse tipo de comportamento também pode ser induzido após um estímulo aversivo natural como a exposição a um predador (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; 1989). Recentemente, esses parâmetros têm sido propostos como índices de comportamento de pânico em ratos (VARGAS; SCHENBERG, 2001).

A administração de NO pode ativar o processo de LTP hipocampal, mas para isso depende do envolvimento do NO endógeno (BON; GARTHWAITE, 2003). Além disso, a formação ou inibição de NO pode interferir na liberação de outros mediadores que influenciam as respostas da SCP (LOVICK, 2000). Dessa maneira, hipotetizou-se que a participação do NO endógeno seria importante para as respostas defensivas desencadeadas exogenamente pelo NO na SCPdl.

Ao contrário da hipótese inicial, o pré-tratamento com o inibidor da NOS, L-NAME, não atenuou a resposta de fuga induzida pelo SIN-1. Isso mostra que, na SCPdl, o SIN-1 pode induzir efeitos independentes da formação de NO, por mecanismos que ainda não estão bem esclarecidos. Dados eletrofisiológicos demonstraram que o SIN-1 pode induzir tanto respostas excitatórias como inibitórias em neurônios da SCP (LOVICK; KEY, 1996). Nesse sentido, foi sugerido que os efeitos do NO são dependentes de sua concentração e da composição local do tecido (CONTESTABILE, 2000). Além disso, o NO pode modular a liberação não só de glutamato, como também de outros neurotransmissores, como a serotonina e GABA, os quais exercem efeitos inibitórios na SCPdl (LOVICK, 2000).

Foi demonstrado que o NO pode mediar o efeito inibitório da serotonina sobre a resposta pressora induzida por estimulação elétrica local (LOVICK, 1996). Além disso, Hämäläinen e Lovick (1997), demonstraram que o NO pode interagir com serotonina no controle da nocicepção mediado pela SCPdl. Nesta estrutura, a nNOS está presente numa subpopulação de neurônios GABAérgicos, o que pode explicar algumas respostas inibitórias mediadas pelo NO (LOVICK; PAUL, 1999). Lovick (2000) sugere que o nível de atividade destes neurônios poderia constituir um fator crítico na determinação da ação do NO.

Estes resultados, obtidos em estudos eletrofisiológicos ou de microdiálise, talvez possam explicar alguns resultados comportamentais contraditórios observados na literatura. Por exemplo, a administração i.c.v. de inibidores da nNOS ou de um seqüestrador de NO antagonizou os efeitos ansiolíticos induzidos pelo óxido nitroso em camundongos submetidos ao LCE (LI et al., 2003). Enquanto que a administração do doador de NO, SIN-1, aumentou o tempo no compartimento claro na caixa de claro-escuro e potencializou o efeito do óxido nitroso (N₂O) quando este era administrado concomitantemente (LI; QUOCK, 2002). MASSOD et al. (2003), observaram que a administração sistêmica de uma dose elevada de L-NAME ou do inibidor específico da nNOS, 7-NI, reverteu o efeito ansiogênico de ratos

expostos ao LCE após serem submetidos ao estresse de restrição, enquanto que uma dose menor de L-NAME induziu um efeito ansiogênico.

Não obstante, a maioria dos estudos com administração sistêmica de inibidores da NOS sugere um papel ansiogênico para o NO (para revisão, ver DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001). Recentemente mostramos que a administração intra-SCPdl do sequestrador de NO, Carboxy-PTIO, produz efeitos ansiolíticos no LCE (AGUIAR; DE LUCCA; GUIMARÃES., 2004). Esses dados corroboram resultados anteriores referentes à administração de inibidores da NOS, sugerindo que o NO endógeno na SCPdl possa estar regulando as respostas defensivas induzidas neste modelo de ansiedade (GUIMARÃES e cols 1994; DE OLIVEIRA;GUIMARÃES, 1999). Além disso, a exposição ao LCE ativou neurônios NADPH-positivos na SCPdl (BEIJAMINI;GUIMARÃES, 2003) e aumentou os níveis de citrulina (medida indireta de formação de NO) e os níveis de GMPc na SCPdl (CHIAVEGATTO; SCAVONE; CANTERAS, 1998)

A via GC-sensível ao NO/GMPc tem sido proposta como o principal alvo para os efeitos do NO no SNC (GARTHWAITE,1991; SCHMIDT; LOHMANN; WALTER 1993). Análogos do GMPc como o 8-bromo-GMPc, induzem reação de fuga de maneira semelhante aos doadores de NO na SCPdl (DE OLIVEIRA et al., 2001), sugerindo que os efeitos do NO sejam decorrentes do aumento nos níveis de GMPc. Além disso, a administração intra-SCPdl de um inibidor da GC, o azul de metileno, promoveu efeito ansiolítico no LCE (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001). Essa droga, porém, é um inibidor não seletivo da GC, podendo exercer efeitos que não sejam decorrentes da inibição dessa enzima. A fim de sustentar a hipótese de que os efeitos do NO na SCPdl sejam decorrentes da alteração nos níveis de GMPc, realizamos uma curva dose-resposta no LCE para o inibidor específico da guanilato ciclase, ODQ, administrado intra-SCPdl.

A microinjeção intra-SCPdl de ODQ, promoveu aumento na percentagem de tempo gasto nos braços abertos (BA) do LCE na dose de 1 nmol/0,2 µl. Esse efeito é similar ao observado com drogas com propriedades ansiolíticas como o diazepam, enquanto drogas ansiogênicas, como os agonistas inversos de receptores benzodiazepínicos, diminuem estes índices, num intervalo de doses que não altera a atividade locomotora geral (PELLOW; FILE, 1986). Além disso, foi demonstrado que a inibição de PDE tipo 5 (PDE5), responsável pela degradação do GMPc, promove efeitos ansiogênicos em camundongos (VOLKE; WEGENER; VASAR, 2003) e que inibidores da GCs administrados intra-SCPdl aumentam os efeitos ansiolíticos do etanol (MORATO; ORTIGA; FERREIRA, 2004).

Assim, embora alguns resultados contraditórios obtidos após administração sistêmica de inibidores da NOS, o conjunto dos dados revistos acima indicam que o NO formado endogenamente na SCPdl facilita a ansiedade experimental medida no LCE por meio da ativação da formação do GMPc.

Vários trabalhos têm demonstrado a interação entre o glutamato e o NO. Doadores de NO podem aumentar a liberação de glutamato em estruturas cerebrais como o estriado (GUEVARA-GUSMAN; EMSON; KENDRICK, 1994), hipotálamo (PRAST et al., 1996) e medula oblongata (LAWRENCE; JARROTT, 1993). Além disso, a liberação de glutamato induzida pela administração de agonistas NMDA no córtex e estriado é bloqueada por inibidores da NOS (MONTAGUE et al., 1994; BOGDANOV; WURTMAN, 1997). Inibição similar também foi encontrada no córtex de camundongos Knock-out para NOS (KANO et al., 1998). A ativação de rNMDA promoveu ativação da GCs e conseqüentemente elevou os níveis de GMPc na mediação das respostas fisiológicas no núcleo do trato solitário em ratos (CHIANCA et al., 2004).

Moreira, Molchanov e Guimarães (2004), mostraram que a administração intra-SCPdl de AP7, antagonista de receptores NMDA, ou de NBQX, um antagonista de receptores

AMPA/Cainato, em ratos foi capaz de inibir a reação de fuga promovida pelo SIN-1, sugerindo que o NO também possa estar interagindo com a neurotransmissão glutamatérgica para a indução de respostas defensivas na SCPdl. Esses dados sugerem que nas reações defensivas os efeitos do NO exogenamente administrado dependem da ativação dos iGluR porém, ainda não está claro se o oposto é verdadeiro, ou seja, se reações de fuga produzidas por administração exógena de NMDA depende da formação do NO.

Na tentativa de verificar esta hipótese, confirmamos que a injeção intra-SCPdl de NMDA (0,1 nmol) promove resposta de fuga caracterizada por pulos e aumento no número de cruzamentos na caixa, sendo semelhante àquela observada pela injeção do próprio glutamato (KRIEGER; GRAEFF, 1985). Esse resultado corrobora os achados de Bittencourt et al. (2004), que demonstraram que as respostas defensivas promovidas pela SCPdl necessitam de uma dose significativamente menor de NMDA em relação à a porção lateral da SCP.

No presente trabalho, o pré-tratamento com drogas que inibem a neurotransmissão nitrérgica, como o L-NAME (inibidor da NOS), Carboxy-PTIO (seqüestrador de NO) ou ODQ (inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase), não modificaram a resposta de fuga promovida pela administração de NMDA. Ao contrário de outros fenômenos como na LTP hipocampal (BON; GARTHWAITE, 2001), os nossos resultados sugerem a ativação da via NO/GMPc endógena não é fundamental para as respostas de fuga promovidas pela administração exógena de NMDA.

No entanto, considerando os efeitos ansiolíticos obtidos com diversos tratamentos farmacológicos que inibem a formação e/ou os efeitos do NO endógeno, como o L-NAME (GUIMARÃES et al., 1994), azul de metileno (DE OLIVEIRA; GUIMARÃES, 1999), ODQ e carboxy-PTIO (AGUIAR; DE LUCCA; GUIMARÃES, 2004), é possível propor que, embora não essencial, o NO exerça um papel modulador sobre reações de defesa mediadas pela

SCPdl. Esse efeito poderia envolver uma retro-alimentação positiva com a neurotransmissão glutamatérgica, facilitando a liberação de glutamato endógeno. A observação de que reações de fuga produzidas por doadores de NO são completamente abolidas por pré-tratamento com antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato corrobora essa proposição (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004).

Outra possibilidade, no entanto, seria a participação de mecanismos que não envolvam interação entre NMDA/NO/GC. Vias alternativas para a formação do NO/GMPc têm sido propostas. Pepicelli et al. (2004), observaram que a via NOS/GC no córtex pré-frontal de ratos é controlada por um tônus GABAérgico endógeno através dos receptores GABA_A. Por meio de antagonistas seletivos foi demonstrado que a maioria do NO/GMPc é formado pela ativação de receptores AMPA e não por ativação de rNMDA durante a liberação de glutamato endógeno em cerebelo de ratos (FEDELE et al., 1996).

Além da via dependente de GMPc, o NO também pode modular a função neuronal por meio de uma via independente. O mecanismo independente de GMPc consiste em uma reação direta com proteínas que levam à nitrozilação e reação do NO com superóxido resultando na formação de peroxinitrito e subsequente nitrosilação e oxidação de proteínas (PRAST; PHILIPPU, 2001). Resultados obtidos por Oh et al., (1999) em cultura de células granulares do cerebelo sugerem que baixas concentrações de NO teriam a função na manutenção da ativação de receptores NMDA por meio de uma via independente de GMPc.

A LTP da região CA1 do hipocampo de camundongos knock-out da kinase dependente de GMPc, apresentou-se normal e foi sensível à inibidores da NOS. Porém, ela foi insensível ao ODQ, sugerindo que o NO estaria induzindo LTP por meio de uma via independente de GMPc por meio de um mecanismo compensatório para a transdução normal dependente de GMPc (KLEPPISCH, 1999).

Em conclusão, nossos resultados mostraram que a ativação da via NO/GC/GMPc endógena não é fundamental para as respostas defensivas induzidas na SCPdl pela administração de um agonista NMDA ou de um doador de NO. No conjunto eles sugerem que a formação endógena de NO não é um mediador final nas reações de defesa, mas sim exerça um papel modulatório sobre as mesmas, possivelmente facilitando a ação do glutamato.

Referências Bibliográficas

- AGUIAR D.C., DE LUCCA A.C., GUIMARÃES F.S. Role of nitric oxide on chemically-induced defensive reactions in the dorsolateral periaqueductal grey. **Eur Neuropsychopharmacol** 2004;14 (3): S305.
- 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.
- AMARA S.G., FONTANA A.C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int** 41, 313:318, 2002.
- AZKUE J.J., KNÖPFEL T., KHUN R., MATEOS J.M., GRANDES P. Distribution of the metabotropic glutamate receptor subtype mGlu5 in rat midbrain periaqueductal grey and relationship with ascending spinofugal afferents. **Neurosci Lett** 228: 1-4, 1997.
- BANDLER R. Induction of rage following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cat. **Neurosci Lett** 30: 183-188, 1982.
- BANDLER R., CARRIVE P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Res** 439: 95-106, 1988.
- BANDLER R., KEAY K.A., FLOYD N., PRICE J. Central circuits mediating patterned autonomic activity vs. passive emotional coping. **Brain Res Bull** 53: 95-104, 2000.
- BARBARESI P. Glutamate transporter EAAC1 in the cat periaqueductal gray matter. **Neurosci Lett** 314: 9-12, 2001.
- BEART P.M., SUMMERS R.J., STEPHENSON J.A., COOK C.J., CHRISTIE M.J. Excitatory amino acid projections to the periaqueductal gray in the rat: a retrograde transport study utilizing D[³H]aspartate and [³H] GABA. **Neuroscience** 34: 163-176, 1990.
- BEATTIE E.C., CARROLL R.C., YU X., MORISHITA W., YASUDA H., VON ZASTROW M., MALENKA R.C. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. **Nat Neurosci** 3: 1291-1300, 2000.
- BEAVO J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev** 75: 725-748, 1995.

- BEIJAMINI V., GUIMARÃES F.S. Ativação de neurônios NADPH-Diaforase positivos após exposição ao Labirinto em Cruz Elevado. XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, 2003.
- BEHBEHANI M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol** 46: 575-605, 1995.
- BERRINO L., VITAGLIANO S., MAIONE S., ROSSI F. Modulation by glycine on vascular effect of NMDA: *in vivo* experimental research. **Amino Acids** 4:127-132, 1993.
- BITTENCOURT A.S., CAROBREZ A.P., ZAMPROGNO L.P., TUFIK S., SCHENBERG L.C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of n-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience** 125: 71-89, 2004.
- BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol** 39:43–68, 1988.
- BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J. Antipredator defensive behaviours in a visible burrow system. **J Comp Psychol** 103:70–82, 1989.
- BLEAKMAN D., LODGE D. Neuropharmacology of AMPA e kainite receptors. **Neuropharmacology** 37: 1187-1204, 1998.
- BOGDANOV M.B., WURTMAN R.J. Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. **Neurosci Lett** 221: 197-201, 1997.
- BON C.L.M., GARTHWAITE J. Exogenous nitric oxide causes potentiation of hippocampal synaptic transmission during low-frequency stimulation via the endogenous nitric-oxide-cGMP pathway. **Eur J Neurosci** 14:585-594, 2001.
- BON C.L.M., GARTHWAITE J. On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. **J Neurosci** 23(5): 1941-1948, 2003.
- BORGES K., DINGLEDINE R. AMPA receptors: Molecular and functional diversity. **Prog Brain Res** 116: 153-170, 1998.

- BRANDÃO M.L., CARDOSO S.H., MELO L.L., MOTTA V., COIMBRA N.C. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neurosci Biobehav Rev** 18: 339-346, 1994.
- BRANDÃO M.L., VIANNA D.M., MASSON S., SANTOS J. Neural Organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Rev Bras Psiquiatr** 25 (Supl II): 36-41, 2003.
- BREDT D.S., HWANG P.M., SNYDER S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. **Nature** 347, 768-770, 1990.
- BREDT D.S., SNYDER S.H. Nitric Oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci USA** 86:9030-9036, 1989.
- BREDT D.F., SNYDER S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu Rev Biochem** 63:175-195, 1994.
- BRENMAN J.E., CHRISTOPHERSON K.S., CRAVEN D.R., MCGEE A.W., BREDT D.S. Cloning and characterization of postsynaptic density 95, a nitric oxide synthase interacting protein. **J Neurosci** 16: 7407-7415, 1996.
- CAROBREZ A.P., TEIXEIRA K.V., GRAEFF F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neurosci Biobehav Rev** 25: 697-709, 2001.
- CAROBREZ A.P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety **Rev Bras Psiquiatr** 25 (II): 52-58, 2003.
- CARRIVE P. The periaqueductal grey matter and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behav Brain Res** 58: 27-47, 1993.
- CHAVEZ-NORIEGA L.E., SCHAFFHAUSER H., CAMPBELL U.C. Metabotropic glutamate receptors: potential drugs for the treatment of schizophrenia. **Curr Drug Target CNS Neurol Disord** 1 261-281, 2002.
- CHIANCA D.A.Jr., LIN L.H., DRAGON D.N., TALMAN W.T. NMDA receptors in nucleus tractus solitarii are linked to soluble guanylate cyclase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286: H1521-H1527, 2004.

- CHIAVEGATTO S, SCAVONE C, CANTERAS N. Nitric oxide synthase in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. **Neuroreport** 4:571-576, 1998.
- CLEMENTS J.R., MADL J.E., JOHSON R.L., LARSON A.A., BEITZ A.J. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. **Exp Brain Res** 67: 594-602,1987.
- CONTESTABILE A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Res Rev** 32, 476-509, 2000.
- CUNNINGHAM M.D., FERKANY J.W., ENNA S.J. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Life Sci** 54: 135-148, 1994.
- CURTIS D.R., PHILLIS J.W., WATKINS J.C. Chemical excitation of spinal neurones. **Nature** 183: 611-612, 1959.
- DAWSON T.M., BREDET D.S., FOUTUHI M., HWANG P.M., SNYDER S.H. Nitric oxide and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:7797-7801, 1991.
- DEAKIN J.F.W., GRAEFF F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol** 5: 305-315, 1991.
- DE OLIVEIRA R.W., GUIMARÃES F.S. Anxyolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Braz J Med Biol Res** 32: 1529-1532,1999.
- DE OLIVEIRA R.W., DEL BEL E.A., GUIMARÃES F.S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res Bull** 51: 457-464, 2000.
- 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 dorsal periaqueductal gray. **Neurosci Biobeh Rev** 25: 679-685, 2001.
- DEPAULIS A., BANDLER R.,VERGNES M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. **Brain Res** 486: 121-132, 1989.

- ESPLUGUES J. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol** 135: 1079-1095, 2002.
- FEDELE E., JIN Y., VARNIER G., RATIERI M. Desensitization of AMPA receptors and AMPA-NMDA receptor interaction: an in vivo cGMP microdialysis study in rat cerebellum. **Br J Pharmacol** 117, 1133-1138, 1996.
- FEELISH M., OSTROWSKY J., NOACK E. On the mechanisms of NO release from sydnonimines. **J Cardiovasc Pharmacol** 14 (11):S13-S22, 1989.
- FERNANDEZ DE MOLINA A., HUNSPERGER R.W. Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in cat. **J Physiol** 160: 200-213, 1959.
- FRIEBE A., KOESLING D. Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. **Circ Res** 93:96-105, 2003.
- FURCHGOT R.F., ZAWADSKY J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288: 373-376, 1980.
- GARTHWAITE J., GARTHWAITE G., PALMER R.M.J., MONCADA S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur J Pharmacol** 172: 413-416, 1989.
- GARTHWAITE J. Glutamate, nitric oxide and cell-signaling in the nervous system. **Trends Neurosci** 14: 60-67, 1991.
- GRAEFF F.G. Brain defenses system and anxiety. In: BURROWS G.D., ROTH M., NOYERS Jrs. eds. **Handbook of anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 307-354, 1990.
- GRIFTITH O.W., STUEHR D.J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, 57: 707-736, 1995.
- GUEVARA-GUSMAN R, EMSON P.C., KENDRICK K.M. Modulation of *in vivo* striatal release by nitric oxide and cyclic GMP. **J Neurochem** 62: 807-810, 1994.
- GUIMARÃES, F.S., CAROBREZ, A.P., DE AGUIAR, J.C. E GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology** 103: 91-94, 1991.

- GUIMARÃES F.S., DE AGUIAR J.C., DEL BEL E.A., BALLEJO G. Anxiolytic effect of nitric oxide inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**. 5:1929-1932, 1994.
- HAYASHI T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **Jpn J Physiol** 3:46-64,1952.
- HÄMÄLÄINEN M.M., LOVICK T. Involvement of nitric oxide and serotonin in modulation of antinociception and pressor responses evoked by stimulation in the dorsolateral region of the periaqueductal grey matter in the rat. **Neuroscience** 80: 821-827, 1997.
- HOLLMANN M., O'SHEA-GREENFIELD A., ROGERS S.W., HEINEMANN S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. **Nature** 342: 643-648, 1989.
- HOLMANN M., HEINEMANN S. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev Neurosci** 17: 31-108, 1994.
- HÖLSCHER C., Nitric Oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends Neurosci** 20: 298-303, 1997.
- HOPE B.T., MICHAEL G.J., KNIGGE K.M., VINCENT S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 2811-2814, 1991.
- IGNARRO L.J., BUGA G.M., WOOD K.S., BYRNS R.E., CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 84: 9265-9269, 1987.
- JAVITT D.C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. **Mol Psychiatry** 9: 984-997, 2004.
- KANO T., SHIMIZU-SASAMATA M., HUANG P.L., MOSKOWITZ M.A., LOE.H. Effects of nitric oxide synthase gene knock out on neurotransmitter release *in vivo*. **Neuroscience** 86: 695-699, 1998.
- KLEPPISCH T., PFEIFER A., KLATT P., RUTH P., MONTKOWSKI A., FASSLER R., HOFMAN F. Long – term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinase is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide. **J Neurosci** 19: 48-55, 1999.

- KRIEGER J.E., GRAEFF F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Braz J Med Biol Res** 18: 61-67, 1985.
- KURT M., BILGE S.S., AKSOZ E., KUKULA O., CELIK S., KESIM Y. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice. **Pol J Pharmacol** 56(3):353 - 357, 2004.
- LAWRENCE A., JARROTT Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid in the rat dorsomedial medulla oblongata. **Neurosci Lett** 151: 126-129, 1993.
- LEYVA J., MAIONE S., PALLOTTA M., BERRINO L., ROSSI F. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors mediate opposite effects on periaqueductal gray matter. **Eur J Pharmacol** 285: 123-126, 1995.
- LI S., QUOCK R.M. Comparison of chlordiazepoxide and N2O-induced behaviors in the light-dark exploration test. **Eur J Pharmacol** 447:75-78, 2002.
- LI S., OHGAMI Y., DAI Y., QUOCK R.M. Antagonism of nitrous oxide-induced anxiolytic-like behavior in the mouse light/dark exploration procedure by pharmacologic disruption of endogenous nitric oxide function. **Psychopharmacology** 166: 366-372, 2003.
- LIN L.H., WAN F.J., TSENG C.J. Modulation of cardiovascular effects produced by nitric oxide and ionotropic glutamate receptor interaction in the nucleus tractus solitari of rats. **Neuropharmacology** 38: 935-941, 1999.
- LIN H.C., KANG B.H., WAN F.J., HUANG S.T., TSENG C.J. Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitari of rats. **Eur J Pharmacol** 407: 83-89, 2000.
- LO W.C., LIN H.C., GER L.P., TUNG C.S., TSENG C.J. Cardiovascular effects of nitric oxide and N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus tractus solitari. **Hypertension** 30: 1499-1503, 1997.
- LOVICK T.A. Role of nitric oxide in medullary raphe-evoked inhibition of neuronal activity in the periaqueductal gray matter. **Neuroscience** 75(4): 1203-1209, 1996.
- LOVICK T.A., KEY B.J. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. **Exp Brain Res** 108: 382-388, 1996.

- LOVICK T.A., PAUL N.L. Co-localization of GABA with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurones in the dorsolateral periaqueductal grey matter of the rat. **Neurosci Lett** 272: 167-170, 1999.
- LOVICK T.A. Panic disorder – A malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal grey matter ? **Neuroscientist** 6: 48-59, 2000.
- MAIONE S., PALAZZO E., DE NOVELLIS V., STELLA L., LEYVA J. ROSSI F. Metabotropic glutamate receptors modulate serotonin release in the rat periaqueductal grey matter. **Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacology** 358: 411-417, 1998a.
- MAIONE S., MARABESE I., LEYVA J., PALAZZO E., DE NOVELLIS V., ROSSI F. Characterisation of mGluRs which modulate nociception in the PAG of the mouse. **Neuropharmacology** 37:1475-1483, 1998b.
- MASOOD A., BANERJEE B., VIJAYAN V.K., RAY A. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. **Eur J Pharmacol** 458: 135-139, 2003.
- 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 grey. **Psychopharmacology** 113: 565-569, 1994.
- MATHEUS M.G., GUIMARÃES F.S. Antagonism of non-NMDA in the dorsal periaqueductal grey induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. **Psychopharmacology** 132: 14-18, 1997.
- MEFFERT M.K., HALEY J.E., SCHUMAN E.M., SCHULMAN H., MADISON D.V. Inhibition of hippocampal heme oxygenase, nitric oxide synthase, and long-term potentiation by metalloporphyrins. **Neuron** 13(5):1225 – 1233, 1994.
- MCLENNAN H., HUFFMAN R.D., MARSHALL K.C. Patterns of excitation of thalamic neurones by amino-acids and by acetylcholine. **Nature** 219, 387-388, 1968.
- MOLCHANOV M.L., GUIMARÃES F.S. Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Braz J Med Biol Res** 32(12): 1533-1537, 1999.
- MOLCHANOV M.L., GUIMARÃES F.S. Anxiolytic – like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology** 160: 30-38, 2002.

- MOLCHANOV M.L. **Receptores metabotrópicos de glutamato na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral: papel nas reações comportamentais de defesa.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, 2003.
- MONTAGUE P.R., GANCAICO C.D., WINN M.J., MARCHASE R.B., FRIEDLANDER M.J. Role of production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. **Science** 263:973-976, 1994.
- MORATO G.S., ORTIGA R.M., FERREIRA V.M.M. Involvement of nitric oxide-dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the effects of ethanol in rats submitted to the elevated plus-maze test. **Behav Brain Res** 153: 341-349, 2004.
- MOREIRA F.A., MOLCHANOV M.L., GUIMARÃES F.S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology** 171: 199-203, 2004 .
- MOREIRA F.A., GUIMARÃES F.S. Benzodiazepine receptor and serotonin 2A receptor modulate the aversive – like effects of nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal grey of rats. **Psychopharmacology** 176: 362-368, 2004..
- NAKANISHI S., Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science** 258: 597-603, 1992.
- NASHOLD B.S., WILSON W.P., SLAUGHTER D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J Neurosurg** 30:14-24, 1969.
- NEWSHOLME P., LIMA M.M.R., PROCOPIO J., PITHON-CURTI T.C., DOI S.Q., BAZOTTE R.B., CURI R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Med Biol Res** 36: 153-163, 2003.
- NISHI M., HINDS H., LU H-P, KAWATA M., HAYASHI Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA- type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. **J Neurosci** 21:1-6, 2001.
- NOWAK L., BREGESTOVSKI P., ASCHER P., HERBET A., PROCHIANTZ A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature** 307: 462-465, 1984.

- OH S., YUN B.S., RYOO I.J., MCCASLIN P.P., YOO I.D. Nitric oxide synthase inhibitor decreases NMDA-induced elevations of extracellular glutamate and intracellular Ca²⁺ levels via a cGMP-independent mechanism in cerebellar granule neurons. **Arch Pharm Res** 22 (1): 48-54, 1999.
- ONSOTT D., MAYER B., BEITZ A.J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal grey of the rat: analysis using laser confocal microscopy. **Brain Res** 610: 317-324, 1993.
- OZAWA S., KAMIYA H., TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol** 54: 581-618, 1998.
- PALMER R.M., FERRIGE A.G., MONCADA S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327: 524-526, 1987.
- PALMER R.M., REES D.D., ASHTON D.S., MONCADA S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun** 153: 1251-1256, 1988.
- PAXINOS G., WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3 ed. New York, Academic Press, 1997.
- PELLOW S., FILE S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav** 24: 525-529, 1986.
- PEPICELLI O., BRESCIA A., GHERZI E., RAITERI M., FEDELE E. GABA_A, but not NMDA, receptors modulate in vivo NO-mediated cGMP synthesis in the rat cerebral cortex. **Neuropharmacology** 46: 480-489, 2004.
- PODHORNA J., BROWN R.E. Interactions between N-methyl-D-aspartate and nitric oxide in the modulation of ultrasonic vocalizations of infant rats. **Eur J Pharmacol** 408: 265-271, 2000.
- PRAST H., LAMBERTI C., FISHER H., TRAN M.H., PHILIPPU A. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol** 354: 731-735, 1996.

- PRAST H., PHILIPPU A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiology**, 64: 51-68, 2001.
- SCHENBERG L.C., GRAEFF F.G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav** 9: 287-295, 1978.
- SCHENBERG L.C., BITTENCOURT A.S., SUDRÉ E.C.M., VARGAS L.C. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev** 25: 647-659, 2001.
- SCHIMITT M.L., GRAEFF F.G., CAROBREZ A.P. Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. **Braz J Med Biol Res** 23(8): 677-679, 1990.
- SCHIMITT 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.
- SCHULMAN H. Nitric oxide: a spatial seconde messenger **Mol Psychiatry** 2:296-299, 1997.
- SLADDECZEK F., PIN J-P., RECASENS M., BOCKAERT J., WEISS S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. **Nature** 317: 717-719, 1985.
- SNYDER S.H., BREDD D.S. Nitric Oxide as a neuronal messenger **Trends Pharmacol Sci** 12, 125-128, 1991.
- SOUTHAM E., GARTHWAITE J. Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic cGMP levels in rat cerebellar slices. **Neurosci Lett** 130:107-111, 1991.
- SPOOREN W., BALLARD T., GASPARINI F., AMALRIC M., MUTEL V., SCHREIBER R. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. **Behav Pharmacol** 14, 257-277, 2003.
- TANAKA H., GROOMS S.Y., BENNETT M.V., ZUKIN R.S. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. **Brain Res** 886: 190-207, 2000.
- TOMITA S., NICOLL R.A., BREDD D.S. PDZ Protein Interactions Regulating Glutamate Receptor Function and Plasticity. **J Cell Biol** 153: F19-F23, 2001.

- VARGAS L.C., SCHENBERG L.C. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology** 155: 260-268, 2001.
- VINCENT S.R., KIMURA H. Histochemical map of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**. 46: 755-784, 1992.
- VOLKE V., WEGENER G., VASAR E. Augmentation of the NO-CGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. **J Physiol Pharmacol** 54(4): 653-660, 2003.
- WATKINS J.C. L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. **Bioch Soc Trans** 28 (4):297-310, 2000.
- WENTHOLD R.J., ROCHE K.W. The organization and regulation of non-NMDA receptors in neurons. **Prog Brain Res** 116: 133-152, 1998.
- YAKAMURA T., SHIMOJI K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog Neurobiol** 59: 279-298, 1999.
- YOUNG V.R., AJAMI A.M. Glutamate: an amino acid of particular distinction. **J Nutr** 130:892S-900S, 2000.
- ZHANG S.P., BANDLER R., CARRIVE P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subpretectal midbrain periaqueductal gray of the cat. **Brain Res** 520, 73-82, 1990.
- ZHANG J., SNYDER S.H. Nitric oxide in the nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 35: 213-233, 1995.