

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Psicologia e Educação

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**Análise do Comportamento Defensivo Induzido pela
Microinjeção do Neuropeptídeo Substância P na Matéria
Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos**

Maria Socorro dos Santos Aguiar

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto-USP, como parte
das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências -
Área: Psicobiologia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**Análise do Comportamento Defensivo Induzido pela
Microinjeção do Neuropeptídeo Substância P na Matéria
Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos**

Maria Socorro dos Santos Aguiar

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto-USP, como parte
das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências -
Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão
Ribeirão Preto - SP

1995

Para ***Maria Cristina Damião***, minha maior amiga e alguém que sabe profundamente que o entendimento acerca da mente humana está muito além de um simples “*in vitro assay*”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, pela prova de confiança na minha capacidade profissional ao aceitar orientar-me neste projeto de doutorado. A você, o meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz por ter permitido iniciar minha carreira científica de forma segura e coerente, ao aconselhar-me a fazer minha pós-graduação na Psicobiologia. Só posso dizer que, no mínimo, valeu a pena, *Mestre!*

Ao prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff, pelas discussões e idéias sobre este trabalho no decorrer de sua realização.

A Renata B. Vicentini, por sua dedicação profissional e, principalmente, por seu companheirismo de mãe.

Ao Dalmo, Paulinho, José Roberto, Zé e Sueli, pelos serviços prestados, favores concedidos e por nosso bom relacionamento.

Aos meus amigos Regina Lúcia, Marinete Carrera, Milena Viana e Hélio Zangrossi, pelo grande e inesquecível toque de solidariedade ao bom acabamento deste trabalho.

A minha amiga “Lady Silveira”, por nunca ter-me dito um não todas as vezes em que de sua ajuda eu precisei.

Aos camaradas do Partido Socialista dos Trabalhadores Unificado (PST-U), pelo carinho com o qual me acolheram em sua cidade. Em especial aos meus grandes amigos Paulinho e Raquel, pelos muitos momentos de total felicidade.

Aos colegas do laboratório do Prof. Marcus, pelo compartilhar científico, porém, em especial, muito em especial, aos meus amigos “Puli” e “Dux mi boy” pelo compartilhar da vida.

Enfim, a todos os meus colegas da Psicobiologia: Bárbara, Barnabé, Cris, Gláucia, Luciene, Margarida, Norberto, Rita, Silvia Botelho, Vítor e os outros que aqui não foram citados, pelos bons momentos e pela chance, cada um a sua maneira, de ter aprendido algo com eles ao longo desses anos na “Califórnia Brasileira”.

...”A satisfactory scientific definition of emotion can only be generated with the aid of some neural analysis. The analysis must seek to specify how environmental and psychological events influence underlying brain processes that actively modulate clearly observable behaviors. Thereby, a good definition of emotion may be deemed a proper end-point, rather than the beginning, of our inquiries”.

(J. Panksepp, 1986)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
<hr/>	
1. MEDO E REAÇÃO DE DEFESA	1
2. NEUROANATOMIA DA REAÇÃO DE DEFESA	3
2. 1. O SISTEMA DE INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL	6
2. 2. SISTEMA CEREBRAL AVERSIVO	8
3. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL	11
3. 1. NEUROANATOMIA E CITOARQUITETURA	11
3. 2. INTEGRAÇÃO FUNCIONAL DAS REAÇÕES DE DEFESA	13
4. NEUROPEPTÍDEOS	17
OBJETIVOS	41
<hr/>	
MATERIAIS E MÉTODOS	42
<hr/>	
EXPERIMENTO I	42
1. ANIMAIS	42
2. CIRURGIA	42
3. APARATO	43
4. MICROINJEÇÕES	43
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43
6. DROGAS	44
7. HISTOLOGIA	45
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
EXPERIMENTO II	46
1. ANIMAIS	46
2. CIRURGIA	46
3. MICROINJEÇÕES	46
4. APARATO	47

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
6. DROGAS UTILIZADAS, HISTOLOGIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
1. ANIMAIS, CIRURGIA E MICROINJEÇÕES.....	49
2. APARATO	49
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
4. DROGAS UTILIZADAS E HISTOLOGIA.....	51
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51

EXPERIMENTO III 49

1. ANIMAIS, CIRURGIA E MICROINJEÇÕES.....	45
2. APARATO	45
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	46
4. DROGAS E HISTOLOGIA.....	51
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51

RESULTADOS 52

1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO	52
2. EXPERIMENTO I	52
3. EXPERIMENTO II	42
4. EXPERIMENTO III	57

DISCUSSÃO 61

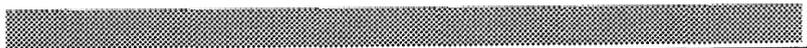
RESUMO 73

ABSTRACT 74

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

APÊNDICE 97

ABREVIATURAS



AM: amígdala

ATV: área tegmental ventral

BD: bulbo dorsal

BV: bulbo ventral

BZDs: benzodiazepínicos

CDL: coluna neuronal dorsolateral

CDM: coluna neuronal dorsomedial

CL: coluna neuronal lateral

CVL: coluna neuronal ventrolateral

GABA: ácido gama aminobutírico

HL/FPM: hipotálamo lateral/feixe prosencefálico medial

HM: hipotálamo medial

ICV: intracerebroventricular

LCE: labirinto em cruz elevado

MCP: matéria cinzenta periaquedutal

MCPD: matéria cinzenta periaquedutal dorsal

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMS: núcleo medial do septo

SCA: sistema cerebral aversivo

SCBZ: semicarbazida

SIC: sistema de inibição comportamental

SN: substância negra

SNC: sistema nervoso central

SP: substância P

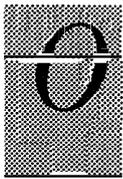
5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

INTRODUÇÃO



1. MEDO E REAÇÃO DE DEFESA



estudo dos processos neurais das reações de defesa no homem, bem como nos mamíferos inferiores, busca compreender de forma objetiva um fenômeno que sempre foi encarado e avaliado de forma fundamentalmente subjetiva, a emoção. Sabe-se hoje que as respostas observadas durante situações que significam perigo ao organismo, como o medo, o estresse e a ansiedade, são reações fisiológicas passíveis de serem medidas e quantificadas, que, em geral, sempre vêm acompanhadas de um componente subjetivo, o qual acostumou-se chamar de componente psicológico ou emocional desses processos.

Pode-se afirmar que os primeiros estudos sobre o comportamento emocional foram iniciados de forma sistemática a partir do trabalho de Charles Darwin (1965) em seu livro *“The expression of emotion in man and animals”*. Nessa obra, baseada em sua teoria da evolução, Darwin analisa o fenômeno da emoção no homem e em outros animais, com base principalmente em estudos clássicos sobre expressões faciais. Ele verificou que em diferentes espécies de mamíferos, como o cão, o gato, o macaco e o homem os mesmos tipos de músculos faciais estão envolvidos nas mesmas expressões que indicam um determinado estado emocional, como por exemplo dor, alegria, tristeza. Através dessas observações Darwin propôs que a estrutura fisiológica, bem como os hábitos de todos os animais, foram gradualmente adquiridos, através de um processo evolutivo, e que no caso das emoções os padrões de expressões, inclusive com o desenvolvimento de músculos faciais para dar suporte às mesmas, não eram mais que consequência dessa evolução. Segundo Darwin, a expressão comportamental, particularmente a expressão facial, era o aspecto fundamental da emoção, e que esta é produto de processos inatos, com um complexo padrão de reação, que evoluiu nas diversas formas de vida devido seu valor funcional de sobrevivência. Além disso, embora altamente modificados pela aprendizagem e maturação do organismo, os padrões básicos encontram-se presentes em uma ampla faixa da escala filogenética, que vai

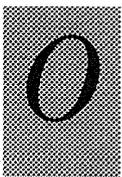
das aves ao homem, mostrando uma marcante consistência tanto entre uma mesma espécie quanto entre espécies diferentes.

Entre as diversas emoções, sem dúvida o medo foi a primeira a merecer a atenção especial de Darwin em sua obra acima citada, onde ele fez aquela que é a mais detalhada descrição de um indivíduo com medo. Resumidamente, podemos dizer que o medo, como todas as outras emoções é um legado evolutivo vital, cujo principal objetivo é dar chance ao organismo de livrar-se de uma situação ameaçadora à sua sobrevivência. Sem medo, pode-se dizer que qualquer animal ficaria impossibilitado de sobreviver por muito tempo em condições ambientais naturais. Como bem observou Marks (1987), o medo não só é útil como muitas vezes chega a ser atrativo para muitas pessoas, vide a imensa quantidade de esportes extremamente perigosos e os milhões de dólares que são gastos em livros e filmes de suspense e terror. O que se percebe é que parece existir uma espécie de nível “ótimo” de medo para o desempenho ser adequado, enquanto que acima dele já passamos a reagir inadequadamente. O medo se dá através de um conjunto de reações, que geralmente ocorrem em sequência, incluindo uma expressão facial característica, um profundo componente subjetivo, acompanhado de mudanças fisiológicas caracterizadas por respostas simpáticas similares àquelas observadas no comportamento agressivo e que envolvem palidez da pele, dilatação das pupilas, piloereção, aumento dos batimentos cardíacos e pressão sanguínea, aumento do fluxo sanguíneo nos músculos, contração da bexiga e do reto. Em uma situação de medo extremo, a sensação sentida é de terror, com respostas que vão de secura na boca e garganta ao desmaio, com náuseas e calafrios (Marks, 1987).

Os estados aversivos e as mudanças fisiológicas que os acompanham e que caracterizam as emoções básicas parecem ser elaborados em circuitos cerebrais que são compartilhados com todos os mamíferos. Assim, tem-se observado que se por um lado a experiência subjetiva e cognitiva de muitas emoções pareçam ser um fenômeno unicamente humano, por outro lado suas alterações fisiológicas e comportamentais sugerem possuir uma herança neural em comum com os outros animais. Com o aumento da complexidade do neocórtex e, sobretudo com o surgimento da palavra e da cultura, no homem, as emoções básicas foram sendo

cada vez mais elaboradas e, da mesma forma, suas expressões. Porém, os elementos básicos dos sistemas motivacionais primários como o medo, a raiva e o pânico permaneceram constantes sob a roupagem diversificada que é tecida pelo constante aprendizado, sendo que a esses sistemas motivacionais primários correspondem organizações neurais, cujas características parecem persistir ao longo da escala evolutiva (Pankseep, 1982, 1990).

2. NEUROANATOMIA DA REAÇÃO DE DEFESA



O conhecimento acerca dos circuitos neurais da reação de defesa teve um grande avanço nas últimas décadas, com o desenvolvimento dos modelos animais de ansiedade. Os circuitos básicos das emoções, os quais são compartilhados por todos os mamíferos parecem ser a origem evolutiva da vida psíquica, os quais estabeleceram valores inatos e prioridades que facilitassem a sobrevivência (Pankseep, 1990). Os primeiros trabalhos a demonstrar que as respostas de defesa dos animais, mediante situações de perigo ou dor, são comandados por algumas estruturas cerebrais que parecem obedecer a uma lógica adaptativa, foram aqueles realizados no início do século, através da metodologia de estimulações elétricas ou ablações cerebrais. Com a técnica de implantes simultâneos de vários eletrodos, Delgado *et al.* (1954) e Hunspergger (1959) demonstraram reações afetivas em gatos estimulados em regiões do prosencéfalo, tais como amígdala, estria terminal e adjacências, bem como em estruturas do tronco cerebral, como a matéria cinzenta do mesencéfalo. Esses resultados apoiavam os trabalhos de Cannon (1927) e Bard (1928), os quais haviam mostrado que a estimulação elétrica de regiões hipotalâmicas de gatos promoviam respostas características, como a defesa afetiva, e que a ablação dessa estrutura levava à abolição de tais respostas.

Os trabalhos de Delgado (Delgado *et al.*, 1954; Delgado, 1955) também mostravam que a estimulação química (acetilcolina) e mecânica (pinçamento na

cauda) dessas estruturas produziam um quadro semelhante à estimulação elétrica das mesmas bem como de outras estruturas, tais como o tálamo e matéria cinzenta do mesencéfalo, sugerindo uma relação funcional entre os mecanismos de nocicepção e medo. Seguindo esses passos, um grande número de investigadores, na década de 60, acumularam resultados que levavam cada vez mais à idéia de que os substratos neurais das respostas emotivas encontravam-se localizadas ao longo de um eixo longitudinal, que vai do prosencéfalo até o tronco cerebral, e que compreendia fundamentalmente o complexo amigdalóide, ao longo da estria terminal, o hipotálamo e a matéria cinzenta mesencefálica. Esses resultados foram fortalecidos pelos trabalhos realizados por Chapman *et al.*(1954) e Nashold *et al.* (1969), com a estimulação elétrica do complexo amigdalóide e da matéria cinzenta mesencefálica, respectivamente, em pacientes neurocirúrgicos. Os mesmos obtiveram relatos de sensações extremamente desagradáveis, com componentes de dor e medo, sensação de perigo iminente, acompanhado de respostas autonômicas, tais como piloereção, suor, aumento da pressão arterial, num quadro bastante semelhante àquele obtido com a estimulação elétrica da matéria cinzenta de gatos e macacos.

É possível que a primeira proposta de um circuito básico para as emoções tenha sido aquela feita por Papez (1937). Baseado nos resultados de trabalhos como os de Cannon (1927) e Bard (1928) e sustentado por dados anatômicos, clínicos e compartamentais, ele sugeriu que o circuito compreendido pelo hipotálamo, giro do cíngulo e hipocampo, com todas as suas interconexões, representavam, teoricamente, as bases anatômicas das emoções. Segundo Papez, as relações mútuas e complexas entre essas estruturas seriam as responsáveis pela modulação dos processos emocionais, via mediação de estruturas corticais. A principal característica desse sistema é que ele mostrava que as emoções, no homem, ocorrem através de dois fenômenos diferenciados: a **expressão emocional**, ou via de ação da emoção, e a **experiência emocional**, isto é, o sentimento subjetivo dessa emoção. Papez, através de seus trabalhos, concluiu que para a expressão emocional é fundamental a ação integrativa do

hipotálamo, enquanto que para a experiência subjetiva o essencial é a participação do córtex.

Com o advento da teoria evolutiva, os investigadores propuseram a existência de um “circuito neural” das emoções como um processo adaptativo, resultados das mudanças que ocorreram no meio ambiente das diferentes espécies. Para lidar com essas mudanças, que podem significar perigo para sua integridade, os animais adquiriram padrões anatômicos e comportamentais de defesa e, como extensão desse processo, circuitos neuronais comandando reações típicas de defesa espécie-específica foram evoluindo em seus cérebros. Nessa perspectiva, a busca pelos mecanismos cerebrais que regulam as reações de defesa se tornou a peça fundamental para o entendimento das bases neurais das emoções (para revisão ver Graeff, 1994).

Dessa forma, os trabalhos com estimulação elétrica e ablações de estruturas do SNC foram, ao longo do tempo, sendo substituídos, ou pelo menos secundarizados, pela utilização de técnicas muito mais refinadas e específicas, através do uso de ferramentas neuroquímicas, imunológicas e farmacológicas. Através de trabalhos utilizando técnicas de marcação neural não só foi possível replicar os resultados obtidos com os trabalhos pioneiros de estimulação elétrica e ablações, como principalmente foi possível se ter um conhecimento bem mais detalhado do construto neuroanatômico da emoção em suas diversas formas.

Siegel *et al.* (Fuchs *et al.*, 1981; Fuchs & Siegel, 1984; Fuchs *et al.*, 1985) realizaram uma das melhores reconstruções neuroanatômicas dos substratos neurais do medo e emoções a ele relacionadas. Eles verificaram, através de marcações radioativas anterógradas de neurônios da zona hipotalâmica anterior, fibras ascendentes para a amígdala e núcleo do leito da estria terminal, bem como fibras descendentes do hipotálamo medial para o complexo mediano parafascicular do tálamo e matéria cinzenta central do mesencéfalo. O mesmo padrão de conexões também foi observado através do transporte retrógrado com hoseradish peroxidase (HRP) administrada na MCP (Pankseep, 1990).

Com base em trabalhos como esses, aliados a evidências de que substâncias endógenas atuam como mediadores e/ou moduladores desses processos de defesa na circuitaria neural, certos autores (Gray, 1982a, 1982b; Graeff, 1981) têm proposto novos modelos de funcionamento dos sistemas emocionais nos mamíferos. Neste trabalho vamos abordar, brevemente, os dois mais relevantes desses modelos, os quais estão servindo de base para as pesquisas e discussões acerca dos mecanismos neurais das emoções.

2. 1. O Sistema de Inibição Comportamental

A utilização de compostos farmacológicos com o intuito de se entender melhor os mecanismos da ansiedade humana, bem como as desordens psiquiátricas, proporcionaram um grande avanço sobre o conhecimento de vias neurais e substâncias endógenas envolvidas nesses processos. Dentre as chamadas drogas ansiolíticas, os benzodiazepínicos (BZDs) são, sem dúvida alguma, a classe desses compostos que maiores contribuições têm dado a essas investigações. Com a descoberta de receptores endógenos para as benzodiazepinas (Braestrup *et al.*, 1977; Braestrup & Nielsen, 1980), houve um avanço considerável no conhecimento das bases moleculares da ação dos chamados tranquilizantes menores, e por conseguinte, sobre os mecanismos neurais da ansiedade e suas desordens.

Baseado em experimentos com animais de laboratório, principalmente ratos, submetidos a diferentes situações de aprendizagem (reforçamento positivo e negativo, punição e extinção) e utilizando compostos ansiolíticos, particularmente os BZDs, Gray (1982a, 1982b, 1987) propôs um modelo para se avaliar o modo de ação desses compostos nos mecanismos da ansiedade, o qual ficou conhecido como Sistema de Inibição Comportamental (SIC). Resumidamente, esse modelo pressupõe que existe um sistema de inibição comportamental, o qual tem como objetivo responder a sinais do meio ambiente que signifiquem punição, frustração ou novidade para o organismo. Esses três tipos de estímulos aversivos ativariam

esse sistema neuroanatômico, o que resultaria na sensação de ansiedade. Como consequência imediata dessa ativação ocorre uma supressão do comportamento no qual o animal está engajado no momento, bem como um aumento da atenção aos estímulos ambientais presentes e um aumento na motivação geral do animal, que o possibilita emitir respostas adequadas a tal situação.

Esse sistema de inibição comportamental funcionaria através de um sistema formado preponderantemente pelo septo e o hipocampo, com o auxílio de outras estruturas relacionadas. O chamado sistema septo-hipocampal teria a tarefa básica de comparar, de forma permanente, os estímulos atuais do meio ambiente com aqueles que são esperados pelo animal. Para tanto, ele atuaria de duas formas: se os estímulos que se apresentam são aqueles esperados pelo animal, o sistema septo-hipocampal está atuando como um “verificador” ou comparador, sendo que o controle do comportamento em geral se dá através de outros mecanismos cerebrais. Porém, no momento em que ocorre uma mudança entre o estímulo presente no meio ambiente e aquele esperado pelo animal (no caso da novidade), ou surge a expectativa de um estímulo aversivo, o sistema septo-hipocampal toma diretamente para si o controle sobre o comportamento, passando a funcionar como um controlador. Assim, ele opera as vias de entrada do sistema, com a ajuda de outras estruturas cerebrais, agindo como uma espécie de computador, observando e detectando estímulos ansiogênicos e ativando os mecanismos de respostas apropriadas a eles.

Através de diversos experimentos, Gray (1982a, 1982b) demonstrou que existe uma grande similaridade entre os efeitos produzidos pela administração de drogas ansiolíticas e aqueles produzidos por lesões no sistema septo-hipocampal. Com base nesses resultados, ele propôs um modo de ação para os tranquilizantes menores, principalmente os BDZs, e um possível mecanismo para a ansiedade. No momento em que o sistema septo-hipocampal está atuando como um controlador, ou seja, quando o animal está em confronto com uma situação ameaçadora, esse sistema estaria mediando, pelo menos em parte, a ansiedade. A administração de drogas ansiolíticas, de forma similar às lesões, irá promover, de forma direta ou indireta, a ação destes compostos nesse sistema reduzindo os efeitos

comportamentais dos estímulos ambientais aversivos, ou seja, reduzindo a ansiedade.

2. 2. Sistema Cerebral Aversivo

O sistema septo-hipocampal, sem dúvida cumpre um papel preponderante na inibição comportamental verificada em situações de perigo ou frustração para uma determinada espécie, no entanto, as reações ativas características de situações aversivas, como a luta, a fuga e o congelamento, não são integradas pelo sistema septo-hipocampal. Diversos trabalhos, incluindo os experimentos clássicos com estimulação elétrica de estruturas cerebrais demonstram que a amígdala (AM) no prosencéfalo, o hipotálamo medial (HM) e a matéria cinzenta periaqueductal dorsal (MCPD) no mesencéfalo, constituem o principal substrato neural responsável pela elaboração dessas respostas e que esse sistema, assim como o sistema septo-hipocampal, está envolvido na ação antiaversiva dos compostos ansiolíticos.

Baseado nessas evidências, Graeff (1981) propôs um sistema anátomo-funcional, ao qual denominou de sistema cerebral aversivo (SCA), formado basicamente por essas estruturas, as quais estariam atuando na geração e elaboração de respostas aversivas. A estimulação elétrica dessas estruturas induz reações defensivas em diversas espécies animais, inclusive o homem (Nashold *et al.*, 1929; Hess & Brügger, 1943; Delgado *et al.*, 1954; Chapman *et al.*, 1954; De Molina & Hunspergger, 1962; Olds & Olds, 1962,1963; Siegel & Brownstein, 1975; Azevedo, 1987). Em macacos, a estimulação elétrica da MCP também produz um quadro característico de aversão, onde os mesmos demonstram contorção ipsilateral da face, tentativa de fuga ou ataque e vocalização (Delgado, 1954,1955; Jürgens & Pratt, 1979). Além do mais, ratos estimulados eletricamente nessa estrutura ou em camadas profundas do colículo superior apresentam, inicialmente, uma resposta de congelamento, seguido de rotações e atividade locomotora intensa, culminando em uma típica reação de fuga, caracterizada por saltos, corridas e galopes.

A amígdala recebe projeções de áreas corticais e subcorticais que trazem informações de todo o sistema sensorial, enquanto fibras eferentes partem do núcleo central para o hipotálamo medial e a matéria cinzenta central, bem como para núcleos regulatórios autonômicos no tronco cerebral (para revisão ver Graeff, 1993). Assim, a amígdala parece retransmitir estímulos inatos ou condicionados do medo para as estruturas caudais do SNC, que são mais diretamente responsáveis por manifestações comportamentais e autonômicas do medo (Hitchcock & Davis, 1987; Davis, 1992). Segundo Fanselow (1991), a amígdala teria a função de avaliar o grau de ameaça dos diferentes estímulos que sinalizam perigo, enviando o resultado de tal avaliação para a MCP. Esta última, por sua vez, seria responsável por selecionar e organizar a resposta de defesa apropriada. A MCP envia projeções descendentes à formação reticular e porções mais baixas do tronco cerebral (Ruda, 1975). O teto mesencefálico, ao longo de seu curso rostrocaudal envia muitas fibras para o tegmento radiando-se em um plano coronal (Nauta, 1958; Hamilton, 1973). Através dessas fibras eferentes a MCP tem acesso à condução tegmental ascendente e descendente e núcleos do tronco cerebral e, portanto, aos sistemas motores e autonômicos que executam as respostas que compõem a reação integrada de defesa. Desse modo, a matéria cinzenta que circunda o terceiro ventrículo e o aqueduto (sistema periventricular) não só coordena a expressão comportamental do medo, mas também parece ser responsável por suas propriedades motivacionais ou aversivas (para revisão ver Graeff, 1994).

A estimulação do HM produz um padrão de defesa similar, entretanto, os saltos são coordenados e não é verificado o aparecimento de congelamento e rotações (Milani & Graeff, 1987). A reação de defesa obtida com a estimulação elétrica da amígdala é bastante similar aquela observada com a estimulação do hipotálamo, sugerindo uma ação integrativa entre essas duas estruturas, porém, é observado que a estimulação elétrica do hipotálamo leva a uma resposta imediata, enquanto que na amígdala ela ocorre de forma gradual (Hilton & Zbrozyna, 1963). Esses autores sugeriram que enquanto o hipotálamo e a MCP são os centros da integração final, ativando as mudanças autonômicas e somáticas da reação de

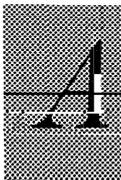
defesa, a AM é responsável pelo controle refinado da intensidade e tempo de duração dessa reação afetiva.

Evidências mais recentes (Melo *et al.*, 1992; Brandão *et al.*, 1993; Brandão *et al.*, 1994) têm demonstrado que o colículo inferior, conhecido principalmente por suas funções no processamentos de informações auditivas, onde atua como uma verdadeira estação relê ao nível do tronco cerebral, parece cumprir, também, um papel preponderante no comando de respostas defensivas. Assim, foi verificado que microinjeções de aminoácidos excitatórios, bem como de antagonistas de receptores GABA_A nessa estrutura, causam uma ativação comportamental acompanhadas de reações autonômicas, que são típicas da reação de defesa. Além, do mais foi verificado que a estimulação elétrica dessa estrutura possui clara propriedade aversiva na medida que os animais aprendem rapidamente emitir uma resposta para livrar-se do estímulo, no teste do “switch-off”.

Do ponto de vista anatômico, vários experimentos têm demonstrado que o SCA possui um padrão altamente complexo de interconexões entre suas diversas estruturas. Além das conexões entre si, esse sistema possui importantes conexões com outras estruturas cerebrais que também participam das bases neurais do comportamento emocional. Assim, o SCA estabelece contatos anátomo-funcionais com o sistema límbico, incluindo o sistema septo-hipocampal, o tálamo intralaminar e o córtex pré-frontal (Nauta, 1958; Chi, 1970; Hamilton, 1973; Beckstead, 1979; Hardy & Leichnetz, 1981). Além do mais o hipotálamo está diretamente envolvido nos mecanismos neurais que controlam as funções hipofisárias, comandando assim os aspectos endócrinos que acompanham o comportamento emocional (Pankseep, 1990).

3. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

3. 1. Neuroanatomia e Citoarquitetura



MCP é uma estrutura proeminente, possuindo um tamanho relativo de cerca de 10% do mesencéfalo do cérebro de mamíferos como o homem, o gato e o rato. Sua posição anatômica, entre o romboencéfalo e o diencéfalo, lhe proporciona uma posição privilegiada para influenciar e participar de vários sistemas sensoriais ascendentes e trajetões sensoriais descendentes. Diferentemente do romboencéfalo e do diencéfalo, o mesencéfalo é uma das partes do cérebro que menos sofreu mudanças evolutivas. No caso da MCP sua forma, por exemplo, parece variar muito pouco de uma espécie para outra, sugerindo que ela esteja envolvida em importantes funções de proteção ou regulação homeostática, que requerem essa aparente estabilidade evolutiva (Beitz, 1982; Mantyh, 1982a, 1982b; Mantyh & Peschanski, 1982 ; Carrive, 1993).

Diversas projeções ascendentes e descendentes convergem na MCP, sugerindo que essa estrutura está interligada à um grande número de redes neuronais que coordenam estratégias distintas para enfrentar diferentes tipos de ameaças, estímulos dolorosos e/ou estressantes. Assim, ela recebe aferências diretas da medula espinhal e núcleo trigeminal, o que implica em um papel funcional nos processos dos estímulos somato-sensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva (Yeziarski, 1988; Mantyh, 1982). A MCP recebe aferências de outras estruturas relacionadas no tronco cerebral, como as camadas profundas do colículo superior, o núcleo mediano da rafe e a formação reticular ascendente (Beitz, 1982; Mantyh, 1982a, 1982b; Mantyh & Peschanski, 1982). Por outro lado, ela também está conectada a uma série de estruturas prosencefálicas, as quais estão relacionadas aos estados emocionais, como o córtex límbico, a amígdala, o núcleo do leito da estria terminal e o hipotálamo (Graeff, 1990; Shipley, 1991). Essas conexões sugerem que a MCP cumpre um papel de pivô na expressão de estados emocionais

(Bandler, 1982; Bandler & Carrive, 1988), sustentando uma mediação entre as funções de estruturas subcorticais e estruturas prosencefálicas. Os primeiros estudos do ponto de vista funcional sobre a MCP apóiam essa hipótese, uma vez que apontam para um papel dessa estrutura na mediação da analgesia (Reynolds, 1969) e do comportamento defensivo (Hunsperger, 1956; De Molina & Hunsperger, 1959).

O fato de que a MCP é claramente uma estrutura heterogênea, tanto do ponto de vista morfológico como do ponto de vista funcional, e o fato de que todas as tentativas de subdivisão da mesma sempre foram baseadas fundamentalmente em critérios citoarquitetônicos (Beitz, 1985; Hamilton, 1973; Paxinos & Watson 1986), um grupo de autores (Bandler *et al.*, 1991) propôs um novo modelo de representação da MCP, baseado em suas características anatômicas e sua representação funcional dos substratos neurais da reação de defesa e as alterações cardiovasculares que a acompanham. Esse modelo foi concebido a partir de uma série de observações comportamentais, fisiológicas e anatômicas. A primeira proposição desse modelo é que a MCP está organizada, primariamente, ao longo de um eixo longitudinal no centro do tronco cerebral e sua especificidade anátomo-funcional expressa na forma de colunas neuronais longitudinais, as quais se estendem por longas distâncias ao longo do eixo rostrocaudal dessa estrutura. Partindo dessa perspectiva, esse grupo de pesquisadores subdividiu a MCP em quatro principais regiões: **dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral.**

A coluna neuronal dorsolateral (CDL) está localizada principalmente no terço rostral e intermediário da MCP. À mesma possui um grupo muito especial de conexões aferentes e eferentes, projetando-se largamente para regiões do sistema límbico e regiões corticais e praticamente sem eferências para estruturas do tronco cerebral. Já a coluna dorsomedial (CDM) está localizada imediatamente acima do aqueduto de Sylvius, limitando-se lateralmente com a CDL. Essa coluna está presente ao longo de toda a extensão rostrocaudal da MCP. Ao contrário da CDL, a CDM possui neurônios que se projetam extensamente para as estruturas mais caudais do tronco cerebral, principalmente o bulbo ventromedial (BVM).

Assim como a CDL, essa coluna possui conexões prosencefálicas, bem como conexões corticais, altamente organizadas.

A coluna neuronal lateral (CL) encontra-se localizada na região imediatamente lateral ao aqueduto. Essa coluna se projeta extensamente para o bulbo ventral (BV), o bulbo ventrolateral (BVL) e bulbo dorsal (BD), principalmente para o núcleo do trato solitário. Ela recebe uma significativa aferência da porção cervical da medula espinhal, do hipotálamo anterior/região pré-óptica medial, núcleo central da amígdala e córtex cingulado anterior. A porção mais caudal da coluna lateral se projeta extensamente até a medula, recebendo uma única aferência somatosensória que surge da porção lombar da medula espinhal. Por sua vez, a coluna ventrolateral (CVL) está localizada na metade caudal da MCP, e suas conexões anatômicas são similares aquelas da coluna lateral em sua porção mais rostral (a figura 01 ilustra as quatro colunas).

3. 2. Integração Funcional das Reações de Defesa

Pelo menos durante os últimos quinze anos, tem sido observado o desenvolvimento de duas grandes linhas de pesquisa sobre as funções da MCP, as quais, apesar de serem conduzidas independentemente, acumulam resultados que pressupõem uma total inter-relação das mesmas. A primeira dessas linhas é a que investiga o papel da MCP na mediação dos processos nociceptivos (Lovick, 1991, 1993) e a outra é acerca do envolvimento dessa estrutura na integração das respostas comportamentais que ocorrem face aos estímulos ameaçadores e/ou estressantes (Bandler & Depaulis, 1991; Bandler *et al.*, 1991).

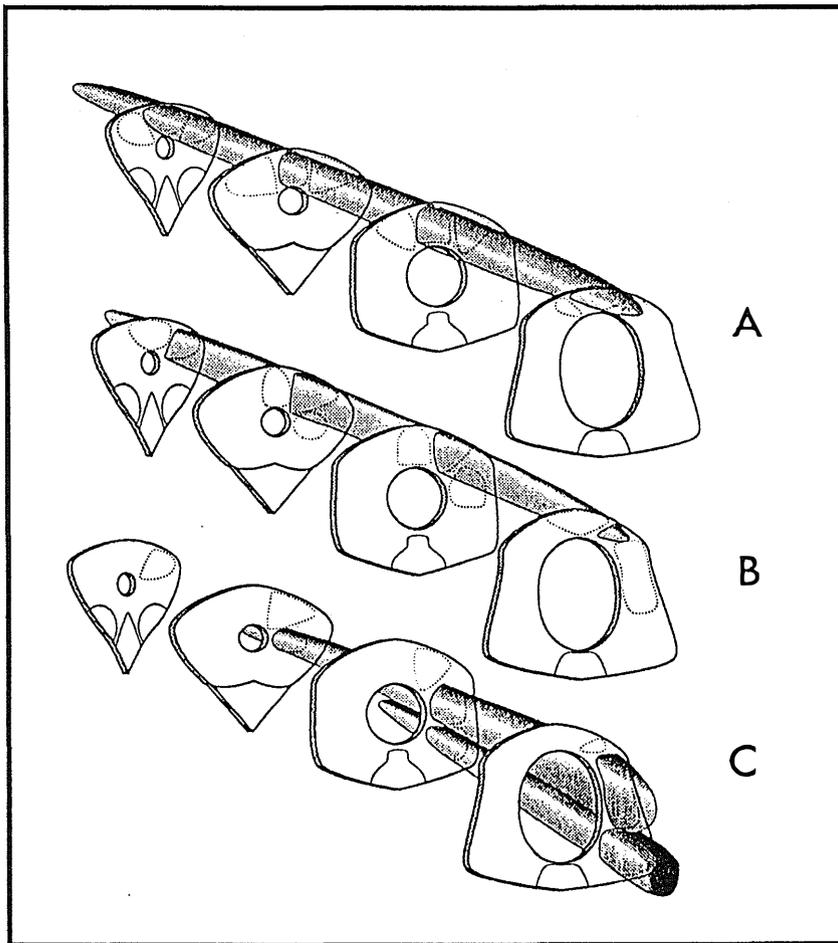


FIG. 1. Representação das quatro colunas neuronais da MCPD, segundo Bandler *et al.* (1991). Reproduzido de Carrive (1993). A- Coluna dorsomedial; B- Coluna dorsolateral; C-Colunas lateral e ventrolateral.

Trabalhos utilizando a técnica de estimulação elétrica cerebral mostram que a estimulação da MCPD é capaz de eliciar comportamentos de defesa em ratos, gatos e macacos (Delgado, 1955; De Molina & Hunsperger, 1959; Schmitt & Karli, 1980). Dados mais recentes sugerem que a estimulação elétrica da MCPD não apenas elicia comportamento de defesa, como também induz analgesia nos limiares elétricos que induzem comportamentos aversivos de congelamento e fuga (Coimbra *et al.*, 1992). De Molina & Hunsperger (1959) demonstraram que lesões na MCPD provocam um prejuízo crônico nos padrões das respostas evocadas por ameaças ambientais ou por estimulação elétrica do HM ou amígdala. Por outro lado, a destruição do HM ou amígdala não afeta a reação de defesa eliciada pela

estimulação elétrica da MCPD. Foi demonstrado que ratos descerebrados, porém com o mesencéfalo intacto, continuam capazes de coordenar comportamentos defensivos (Woods, 1964). Ao contrário, lesões na MCPD de ratos selvagens eliminam o comportamento de defesa a vários estímulos ameaçadores (Blanchard *et al.*, 1981). Trabalhos com paradigmas de aprendizagem mostram que a estimulação elétrica da MCPD e regiões do teto mesencefálico juntamente com o hipotálamo medial levam os animais a aprenderem uma tarefa para esquivar-se da estimulação elétrica nessas estruturas (Delgado *et al.*, 1954; Delgado, 1955; Olds & Olds, 1962, 1963; Nakao, 1968). Outra importante fonte de dados sobre o papel funcional da porção dorsal da MCP nas reações defensivas é aquela oferecida pelos trabalhos de Graeff *et al.* (Schenberg & Graeff, 1978; Graeff, 1990, 1991, 1993; Nogueira & Graeff, 1991) e Brandão *et al.* (Motta & Brandão, 1993; Brandão, 1993; Brandão *et al.*, 1994; Motta *et al.*, 1995). Diversos trabalhos de ambos os grupos de pesquisadores têm demonstrado que a MCPD está envolvido nas respostas típicas de fuga caracterizadas por corridas, saltos e congelamento causados tanto por estimulação elétrica, como por microinjeções de substâncias químicas diretamente nessa região.

Utilizando a técnica de microinjeções de aminoácido excitatórios, os quais excitam somente corpos celulares, Bandler (1982) foi o primeiro a demonstrar que os neurônios da MCP de ratos e não apenas fibras de passagem nessa região, estão mediando a integração das reações de defesa. Trabalhos posteriores vieram confirmar esses resultados (Krieger & Graeff, 1985; Hilton & Redfern, 1986). Posteriormente, Bandler *et al.* (Bandler & Depaulis, 1991; Bandler *et al.*, 1985; Depaulis, 1989, 1991; Depaulis & vergnes, 1986; Depaulis *et al.*, 1992) realizaram uma série de experimentos com gatos e ratos, utilizando a técnica de microinjeções com aminoácidos excitatórios e o uso de testes sensoriais e verificaram que as CL e CVL da MCP possuem grupos distintos de neurônios que integram diferentes componentes das reações de defesa. Assim, foi observado que a CL está relacionada com a ativação somática e autonômica, características da resposta do organismo a um estímulo cutâneo superficial (como o calor radiante). A CVL parece estar relacionada com a inibição autonômica e somática que parece

corresponder a uma resposta do organismo a um estímulo profundamente nocivo (como injeção de formalina nos músculos do pescoço) ou de um período de recuperação do organismo em resposta a uma situação estressante, e que é caracterizado por uma inibição simpática, com relaxamento muscular e imobilidade física.

Existem evidências apontando a amígdala como o ponto de convergência dos vários estímulos aversivos. Já foi demonstrado, por exemplo, que lesões nessa estrutura diminui a apresentação de respostas defensivas típicas, como o congelamento e a analgesia, tanto na presença de um estímulo ameaçador inato quanto na presença de um estímulo aprendido. Por outro lado, a MCP é considerada a grande coordenadora das várias atividades defensivas, verificando-se que a amígdala emite projeções de seu núcleo central para essa estrutura. O que parece ocorrer é um sistema funcional entre amígdala e MCP, onde ocorre uma convergência de “inputs” sensoriais que produzem comportamentos relacionados ao medo. Essas respostas podem ser separadas na MCP, sendo um exemplo disso o fato de que a administração de naloxona nessa estrutura, em sua parte ventral, reduz a analgesia induzida pelo medo, porém, não altera o congelamento. Isso pode significar que na MCP ventral a analgesia é iniciada pela liberação de opióides endógenos, enquanto que o congelamento, e provavelmente outras respostas defensivas espécie-específicas ocorrem via outros mecanismos (para revisão ver Fanselow, 1991).

Baseado nessas evidências, Fanselow (1991) propôs um modelo para explicar essa interação entre AM-MCP na reação de defesa, o qual sugere que a amígdala é a estrutura responsável pela recepção de vários estímulos aversivos, sendo ela que manda sinais para a MCP sobre o grau de perigo que o animal está experienciando. A MCP, por sua vez, se encontra em uma posição privilegiada, com seu sistema analgésico descendente e sua mediação das respostas autonômicas e somáticas, para coordenar os vários componentes das respostas defensivas, conforme o grau de perigo que coloca em risco a sobrevivência do organismo. Dessa forma, a MCP seria a estrutura central da geração e seleção das respostas defensivas.

4. NEUROPEPTÍDEOS

o ponto de vista neurofarmacológico, é grande o número de trabalhos mostrando que as funções do SCA estão sob influência de mecanismos mediados pelo sistema de aminoácidos, bem como pelas aminas biogênicas (para revisão ver Graeff, 1990; Brandão *et al.*, 1994; Handley, 1995).

Tem sido sugerido que os neuropeptídeos com atividade opióide também participam da modulação de comportamentos defensivos. Sabe-se que o eixo que compreende o complexo amigdalóide, o hipotálamo e a matéria cinzenta mesencefálica, os quais regulam as respostas defensivas, contêm uma alta densidade de neurônios encefalinérgicos, bem como receptores opióides (Shaikh & Siegel, 1988; Shaikh *et al.*, 1991). Jacquet & Lajtha (1973, 1974) e Jacquet (1981) demonstraram que altas doses de morfina microinjetadas diretamente na MCPD de ratos induzem um tipo de reação denominada “comportamento motor explosivo”, enquanto que pequenas doses desse opióide microinjetadas na MCPD ou no HM provocam uma diminuição dos efeitos aversivos induzidos pela estimulação elétrica dessas estruturas. Jenck *et al.* (1983, 1986), utilizando o teste do “switch-off” verificaram efeitos similares. Resultados mais recentes têm demonstrado que microinjeções de morfina diretamente na MCPD de ratos causam efeitos que variam em função das doses utilizadas, onde baixas doses elevam o limiar da estimulação elétrica capaz de induzir congelamento e fuga em uma arena circular. Essas mesmas doses são capazes de aumentar a exploração relativa dos braços abertos em um labirinto em cruz elevado. Tanto o efeito antiaversivo da estimulação elétrica quanto os efeitos ansiolíticos nos braços abertos do labirinto foram antagonizados por microinjeções de naloxona, diretamente na MCPD. No entanto, doses mais altas de morfina na MCPD causam um comportamento motor explosivo, bem como se mostram ansiogênicas no labirinto em cruz elevado. Esses efeitos de doses mais altas não são antagonizados pela naloxona, por não serem mediados por receptores do tipo μ ,

mas sim por receptores do tipo κ , uma vez que foram antagonizados por um bloqueador específico de receptores do tipo κ , o nor-binaltorfimina (Motta & Brandão, 1993; Motta *et al.*, 1995).

Já é sabido que a supressão do comportamento defensivo afetivo é mediado através de receptores opióides do tipo μ e do tipo δ , ao nível da MCP, em gatos. Com isso, tem sido sugerido que os peptídeos opióides, seriam a origem dos “inputs” em sítios da MCP nos quais o comportamento defensivo é eliciado. Com relação às possíveis fontes de origens de aferentes opióides a sítios da MCP existem diversas evidências de que podem ser neurônios da porção central do complexo amigdalóide. Assim, já foi verificado que esse núcleo é capaz de abolir a defesa afetiva quando estimulado eletricamente. Ao mesmo tempo possui altas concentrações de neurônios que reagem imunologicamente às encefalinas, além de conter determinados grupos de neurônios que projetam seus axônios diretamente até a MCP. No entanto, existe uma alternativa de que a defesa afetiva tem origem em interneurônios dentro da MCP que são ativados por fibras não opióides da amígdala central.

Um outro grupo de neuropeptídeos com atividade não opióide, composto pela neurotensina, substância P e colecistocinina, têm sido, em grau variado, implicado na mediação química do comportamento defensivo. Por isso, os neuropeptídeos, de maneira geral, e a substância P, em particular, serão focalizados neste trabalho.

Existem evidências de que os neuropeptídeos surgiram de uma diferenciação entre a comunicação neuronal comum e a hormonal, realizando funções neuro-secretórias, ou seja, neurohormonais. Essas substâncias, primeiramente conhecidas por suas funções no sistema periférico foram detectadas no cérebro através da utilização de técnicas imunológicas. Até o presente momento, mais de vinte tipo de peptídeos hormonais já foram identificados no SNC passando a ser considerados neuropeptídeos, candidatos a neurotransmissores e neuromoduladores. Os neuropeptídeos são diversificados e representam, em sua maioria, aqueles peptídeos que foram previamente identificados como hormônios locais (sistêmicos) na periferia, principalmente no

trato gastrointestinal (Iversen, 1987). Ao que tudo indica, eles possuem uma ampla variedade de funções, em um mesmo organismo, podendo atuar como hormônio e como neuromodulador (Eipper *et al.*, 1986; Acher, 1981; Mains *et al.*, 1983). Todos os trabalhos demonstram que essas substâncias encontram-se localizadas apenas em elementos neuronais, onde estão altamente concentrados em terminais nervosos e, em menor concentração, em outras partes do neurônio (Iversen, 1987).

Além de seu papel neurofisiológico relevante, os neuropeptídeos estão cada vez mais sendo implicados nos processos psicofisiológicos. Diversos trabalhos têm demonstrado que essas substâncias, quando administradas periférica ou centralmente, são capazes de influenciar um grande número de comportamentos tais como o alimentar, o decorrente da ativação do sistema de nocicepção, os mecanismos de regeneração celular, e os processos de aprendizagem e memória (Nemeroff *et al.*, 1984; Huston *et al.*, 1993).

O primeiro grupo de neuropeptídeos que teve suas funções comportamentais investigadas foi o grupo de peptídeo com atividade hormonal. Com o desenvolvimento dos estudos sobre suas funções, uma grande soma de experimentos demonstraram que os hormônios do eixo pituitário-hipotalâmico estão implicados em vários processos comportamentais. As primeiras evidências sobre esse fato se deram por meio de observações sobre as modificações no comportamento de ratos que sofreram a retirada da adeno-hipófise ou da glândula pituitária inteira, ou que sofriam de diabetes insípida, a qual produz uma deficiência na síntese de vasopressina. Foi observado que ocorria um prejuízo na aprendizagem de uma tarefa de esquiva ativa, na caixa de vai-e-vem, o qual podia ser prontamente restabelecido através do tratamento com o hormônio adrenocorticotropina (ACTH) ou vasopressina, bem como com os fragmentos desses peptídeos. Esses estudos levaram a conclusão de que o complexo pituitário-hipotalâmico parece ser a origem dos neuropeptídeos, gerados a partir dos hormônios desse complexo, os quais por sua vez podem ser considerados as moléculas precursoras desses fragmentos (De Wied *et al.*, 1974; Willey *et al.*, 1974). Diversos estudos têm demonstrado que esses neuropeptídeos hormonais têm uma participação fundamental em fenômenos comportamentais complexos, como a

motivação, a aprendizagem e memória, além de afetarem os processos de tolerância e dependência dos análogos narcóticos e influenciarem o processo sono-vigília (para revisão sobre a participação dos neuropeptídeos hormonais no comportamento ver De Wied, 1977).

Além dos peptídeos hormonais, evidências demonstram que peptídeos com outros tipos de atividades, como os opióides, as taquicininas etc., também participam como neuromediadores e/ou neuromoduladores em diversas funções comportamentais no SNC dos mamíferos. Como os hormônios, esses neuropeptídeos parecem estar relacionados com os processos de aprendizagem e memória, os processos nociceptivos e nos processos de regeneração celular e síndromes das demências senis (para revisão ver Nemeroff *et al.* 1984; Huston *et al.*, 1993).

Existe ainda uma grande dificuldade para se classificar os neuropeptídeos como neurotransmissores, neuromoduladores ou hormônios locais, sendo que as evidências apontam para uma participação dessas substâncias nas três funções. Os resultados favorecem a hipótese de que essas substâncias atuam principalmente como moduladoras da sensibilidade de grandes populações de neurônios, por um longo período de tempo, ao invés de um mecanismo do tipo tudo-ou-nada das sinapses convencionais, podendo atuar como neuromodulador e/ou neurotransmissor em um mesmo tecido (Lundberg & Hökfelt, 1983; Iversen, 1984). Essas características no modo de ação dos neuropeptídeos, por meio de sinais quimicamente codificados e endereçados, garante um enriquecimento no repertório de transferência de informação no sistema nervoso, em adição as sinapses convencionais realizadas em vias anatomicamente definidas (Iversen, 1987).

Uma outra característica dos neuropeptídeos, e que justifica seu modo de ação peculiar, é que eles podem coexistir amplamente um com o outro, além de coexistirem com diversos neurotransmissores clássicos, em um único neurônio. Não se sabe ao certo se essa coexistência ocorre em uma mesma vesícula ou em vesículas separadas. Porém, tem sido observado que a variável mais importante nesse processo é a composição dos receptores pós sinápticos, pois são eles que vão

definir a função de cada substância existente nas vesículas pré-sinápticas. Evidências demonstram que essas substâncias só coexistem em uma determinada subpopulação de neurônios que possuem características neuroquímicas particulares, porém, o significado funcional dessa coexistência ainda não está totalmente esclarecido. Alguns modelos experimentais mostram que os neuropeptídeos amplificam os efeitos causados pelo neurotransmissor clássico, o que sugere um processo adaptativo (plasticidade) do SNC. Tem sido observado que quando ocorre uma interação química entre os neuropeptídeos e uma amina biogênica, há um considerável aumento nos diversos sinais químicos que um neurônio pode utilizar para comunicar-se com células vizinhas ou mais distantes. Eles parecem facilitar a ação dos neurotransmissores clássicos nas células pós sinápticas, parecendo responder a um componente da resposta que é caracterizado por um início lento e de longa duração, com uma ação de caráter modulador. Evidências sugerem que essas substâncias só coexistem em uma determinada população de neurônios com características neuroquímicas particulares. É demonstrado também que para um neuropeptídeo ser liberado é necessário uma estimulação muito maior que a exigida pelos outros neurotransmissores (Lundberg & Hökfelt, 1983; Iversen, 1984; Eipper *et al.* 1986).

Esse fenômeno da coexistência de diferentes neuropeptídeos, ou de neuropeptídeos com neurotransmissores clássicos, em um mesmo tecido, se deve, provavelmente a sua forma específica de transferência de informação, a qual, sem dúvida, requer a utilização de múltiplos sinais químicos. Assim, as substâncias químicas que são liberadas individualmente, mas que fazem parte de uma coexistência, podem, por si só, não serem capazes de alterar a atividade de um determinado neurônio alvo, ou seja, somente aquelas células capazes de responder a mais de um componente da “mistura” estará apto a responder. Dessa forma, a coexistência, ou o uso de diversos sinais químicos, parece significar uma espécie de codificação química altamente elaborada, significando um maior nível de complexidade na organização funcional da circuitaria neural, a fim de responder a funções de caráter complexo. Suas consequências podem ser ainda mais complexas se os componentes daquilo que os autores costuma chamar de “coquetel sináptico”

variarem com o tempo, o que parece ocorrer com os neuropeptídeos. Se isso ocorre, então ocorre uma troca química bem mais elaborada nas sinapses, mesmo que a membrana pós-sináptica não possua receptores para cada uma das substâncias ativas no terminal em comum (Swanson, 1983; Iversen, 1987). Segundo alguns autores, a coexistência leva a necessidade de se investigar se o balanço existente entre os múltiplos mensageiros é perturbada durante as várias doenças nervosas, e como os diversos tipos de drogas podem afetar a complexa interação entre os compostos liberados nas sinapses (Lundberg & Hökfelt, 1983).

Algumas regiões do SNC são particularmente ricas em terminais nervosos contendo neuropeptídeos. Dentre elas estão as áreas límbicas do prosencéfalo, amígdala, estria terminal, septo e hipotálamo, além da área pré-óptica. Por outro lado, determinadas regiões, como o cerebelo, são praticamente desprovidas de neuropeptídeos. Outra região rica em neuropeptídeos é a substância nigra, em sua parte reticulada. A localização de muitas dessas substâncias em diferentes subpopulações de pequenos neurônios no sistema sensorio primário, sugerem que os neuropeptídeos podem cumprir um papel de neurotransmissor nos mecanismos da nocicepção. Como já foi discutido, é bastante comum a presença de mais de um neuropeptídeo em uma subpopulação de neurônios, muitas vezes em coexistência com neurotransmissores clássicos. Assim, é possível encontrar a coexistência de SP e a calcitonina em neurônios sensorios, ou SP coexistindo com noradrenalina e acetilcolina nos nervos autonômicos periféricos, o que sugere uma função para os neuropeptídeos nos mecanismos viscerais periféricos. Em alguns lugares, como no hipotálamo e plexo mesentérico existem por volta de seis peptídeos. No entanto, a distribuição dessas substâncias, até o momento, não têm oferecido pistas consistentes sobre seu valor funcional. Trabalhos *in vitro*, com a utilização de tecidos cerebrais ou sinaptossomas, têm mostrado a liberação dessas substâncias por meio de uma alta concentração de íons de potássio, ou por substâncias despolarizantes. Tem sido amplamente verificado que alguns neuropeptídeos são liberados por estimulação de vias neurais em trabalhos *in vivo*. Em ambos os casos essa liberação requer a presença de cálcio, o que sugere que essas substâncias são normalmente liberados de neurônios através de um mecanismo dependente de

cálcio, o que significaria um papel de neurotransmissores para as mesmas (Brownstein *et al.*, 1976; Cuello & Kazanawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978; Nicoll *et al.*, 1980; Iversen, 1987).

4. 1. Substância P

No ano de 1931, von Euler & Gaddum relataram a descoberta de uma substância presente em extratos de cérebro e intestino de equinos. Essa substância apresentava um efeito hipotensor em coelhos, bem como induzia contrações de jejuno isolado, semelhantes àsquelas induzidas por acetilcolina. Essas contrações, no entanto, não eram bloqueadas por antagonistas colinérgicos. Os autores denominaram a fração ativa desse extrato de substância P (SP), sendo ela conhecida por esse nome até hoje. Quase quarenta anos depois, Chang & Leeman (1970) isolaram um extrato do hipotálamo de boi que possuía as mesmas características químicas e biológicas da SP, o que levou esses autores a classificá-la como um undecapeptídeo, com a seguinte sequência de aminoácidos: H-ARG-PRO-LIS-PRO-GLN-GLN-PHE-PHE-GLY-LEU-MET-NH₂. Após a síntese da SP foi possível o desenvolvimento de métodos mais precisos para estudos neuroquímicos, fisiológicos e farmacológicos desse neuropeptídeo.

O papel de candidato a neurotransmissor e/ou neuromodulador foi dado à SP com base principalmente no fato desse neuropeptídeo preencher os critérios básicos que servem para caracterizar um neurotransmissor, uma vez que ela se encontra amplamente, porém seletivamente, distribuída no sistema nervoso central e periférico dos mamíferos, encontra-se em fibras de passagem e terminais nervosos, é liberada por despolarização dependente de cálcio, podendo alterar a atividade de neurônios vizinhos (Shults, *et al.*, 1984). Como neurotransmissor, é postulado que a SP esteja atuando em três sistemas básicos: nas aferências nociceptivas primárias, no trato estriato-nigral e no trato habenulo-peduncular (Nicoll *et al.*, 1980). É interessante notar que a biosíntese da SP não está ainda bastante esclarecida e que sua forma de degradação não está satisfatoriamente descrita nos sítos de transmissão mais relevantes, havendo uma grande necessidade

de se estender o conhecimento acerca das peptidases responsáveis por encerrar a ação desse neuropeptídeo (Shults *et al.*, 1984; Iversen, 1987)).

4. 1. 1. Neuroquímica

A substância P (SP) pertence a uma família específica de peptídeos, conhecida pelo nome de taquicinina. As taquicininas são caracterizadas por sua diversidade funcional, possuindo em comum a sequência C-terminal, Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (Erspamer, 1981; Maggio, 1988; Nicoll *et al.*, 1990). A substância P foi o primeiro neuropeptídeo a ser caracterizado como uma taquicinina, tendo sido considerada durante muito tempo a única existente no SNC dos mamíferos. Porém, duas outras taquicininas, a neurocinina α e a neurocinina β foram isoladas e sequenciadas do cérebro de mamíferos (Emsen *et al.*, 1987).

É sabido que a SP é sintetizada a partir de fragmentos precursores, as pré-pró-taquicininas, no soma das células, através de um processo de quebra enzimática, sendo então transportada pelo axoplasma até as terminações nervosas. A SP fica armazenada em vesículas e sua liberação se dá por despolarização, por meio de um processo dependente de cálcio. Na fenda sináptica ela é degradada por endopeptidases que encontram-se livres no espaço extracelular ou ligadas à membrana. De modo geral, seu efeito é facilitador, deflagrando, tanto a nível periférico quanto central, potenciais pós-sinápticos excitatórios (Lembeck *et al.*, 1953; Jessel, 1978; Schenker & Leeman, 1980; Cuello, 1987; Chang, 1988; Endo *et al.*, 1989a, 1989b).

A primeira evidência farmacológica sobre a existência de receptores para taquicininas, particularmente para a SP, foi discutida por Erspamer *et al.* (1978), sendo a partir de seus trabalhos que Lee *et al.* (1982) propuseram a existência de dois tipos de receptores para a SP, o SP-P e o SP-E. A partir de trabalhos com fragmentos de SP, foram propostos novas classificações de receptores para a SP, sendo que Piercey *et al.* (1985) demonstraram que, levando em consideração a atividade da porção N-terminal, era possível uma classificação alternativa para

receptores desse neuropeptídeo. Com isso, propuseram dois tipos de receptores que se diferenciavam em sua sensibilidade a esse fragmento N-terminal, os receptores do tipo SP₁, insensíveis ao fragmento N-terminal, e os receptores do tipo SP₂, sensíveis a esses fragmentos. Atualmente, os receptores das taquicininas foram reclassificados em quatro subtipos, NK-1, NK-2, NK-3 e NK-4, baseados principalmente no fato de seus ligantes endógenos serem SP, NPK, NKB ou NKA, respectivamente (Iversen, 1989). É provável que todos esses subtipos de receptores existam no SNC, embora somente o receptor NK-1 e NK-3 têm tido seus sítios mapeados de forma mais detalhada (Huston *et al.*, 1993).

4. 1. 2. Distribuição

Através de métodos radioimunológicos e imunohistoquímicos, foi possível observar que a SP está amplamente distribuída em todas as espécies de mamíferos (Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl, Hökfelt & Nilsson, 1978; Pernow, 1983; Brownstein *et al.*, 1976). No prosencéfalo uma ampla rede de fibras pode ser encontrada nas camadas I e II do córtex, com projeções do núcleo interpeduncular posterior até o córtex frontal, através do feixe prosencefálico medial. Na amígdala existem algumas projeções para a estria terminal e hipotálamo lateral. No hipocampo existem fibras aferentes contendo SP, as quais parecem originar-se, ou pelo menos ter uma trajetória no septo e núcleo tegmental dorso-lateral.

No telencéfalo, um grande número de corpos celulares imunorreativos à SP pode ser encontrado no septo, caudado-putâmen, amígdala e na parte ventral do globo pálido. Já no diencéfalo, células reativas à SP são encontradas preferencialmente na área pré-óptica medial, no núcleo supraquiasmático, no núcleo medial da habênula, na zona incerta e no hipotálamo. Existe também, um agrupamento celular reativo à SP na substância cinzenta central, ventral ao terceiro ventrículo, que se estende até o mesencéfalo.

A maior concentração de terminais nervosos contendo SP, no SNC, é encontrado no mesencéfalo, particularmente na parte reticulada da substância negra (SN). Nessa estrutura, os terminais contendo SP fazem contatos sinápticos com dendritos e corpos celulares dopaminérgicos, os quais originam-se no corpo estriado, chegando até a substância negra através da *ansa lenticularis*. São encontrados terminais contendo SP na área tegmental ventral e no núcleo interpeduncular. Existem também neurônios contendo SP na matéria cinzenta periaquedutal e no núcleo dorsal da rafe, bem como fibras no *locus coeruleus*, núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, núcleo espinhal do nervo trigêmeo e no núcleo do nervo vago.

Na medula espinhal a SP pode ser encontrada em neurônios da coluna dorsal e em fibras da substância cinzenta. Essas fibras têm origens diversas: neurônios sensoriais primários, interneurônios da substância gelatinosa e neurônios descendentes de núcleos supramedulares. Os neurônios ganglionares dos nervos cranianos e da medula que contém SP têm como origem de seus ramos periféricos, a pele, as papilas gustativas, vasos sanguíneos (onde ela tem um papel dilatador sobre veias e artérias), glândulas endócrinas, sudoríparas e salivares, mucosa nasal, traquéia, brônquios, polpa dentária, rins e bexiga. Além disso, ela pode ser encontrada no trato gastrointestinal, sistema visual periférico, trato respiratório, além dos nervos vago, ciático, esplâncnico e frênico. É importante salientar que a SP encontra-se circulante no plasma sanguíneo (30-600 pMol/l no homem; 425 pMol/l no rato), provavelmente ligada a proteínas maiores, as quais impedem sua degradação. É sabido que no homem o nível circulante de SP varia em um ritmo ultradiano (11/2 h) durante o sono (Pernow, 1983).

4.1.3. Fisiologia

A ampla distribuição de SP no sistema nervoso é, por si só, um forte indício da participação desse neuropeptídeo em diversos sistemas funcionais. Uma das participações mais conhecidas da SP em processos fisiológicos básicos ocorre nos mecanismos mediadores da dor, sendo que a primeira grande evidência de um papel da SP como neurotransmissor ocorreu exatamente através de estudos sobre a

nociceção, em fibras sensoriais, particularmente as fibras C, que convergem a informação dolorosa. Através desses estudos, foi proposto que a SP seria o neurotransmissor das vias sensoriais, estando localizada nos neurônios sensoriais primários e sendo liberada através da estimulação de fibras nervosas A-delta e C, estimulando os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, que reagem a estímulos dolorosos (Nicoll *et al.*, 1980).

Existem duas grandes evidências do envolvimento da SP como um neurotransmissor primário nos mecanismos da dor, uma é oferecida pelos trabalhos anatômicos realizados por grupos como os de Hökfelt *et al.* (1975, 1977), Ljungdahl *et al.* (1978) e Cuello & Kanazawa (1978), os quais evidenciam uma grande concentração de fibras reativas à SP na substância gelatinosa da medula espinhal, a qual é dramaticamente diminuída com a secção da raiz dorsal. Esses resultados, somados a presença de fibras reativas à SP na pele reforçam a possibilidade desse neuropeptídeo estar mediando os processos de nociceção. Outra é aquela obtida com técnicas imunohistoquímicas nas aferências da polpa dentária, as quais no homem parecem cumprir um papel exclusivo na mediação da sensação dolorosa, onde foi verificada fibras contendo SP, que desaparecem após secção do nervo alveolar inferior (Anderson *et al.*, 1970; Olgart *et al.*, 1977a, 1977b).

Existem diversos trabalhos que sugerem uma ação modulatória entre a SP e o sistema de opióides endógenos nos mecanismos de nociceção. Jessel & Iversen (1977) demonstraram que a liberação de SP induzida por potássio de fatias do núcleo trigeminal foi reduzido por peptídeos opióides, bem como opióides sintéticos, e que esse bloqueio foi prevenido por naloxona. Mudge *et al.* (1979) também mostraram que a encefalina pode inibir a liberação da SP de neurônios em culturas e como nesse caso neurônios sensoriais eram os únicos tipos de células presentes, a encefalina provavelmente estaria agindo diretamente nesses neurônios. Duggan *et al.* (1976), demonstraram, através da técnica de iontoforese, que a encefalina e opióides sintéticos, como a morfina, na substância gelatinosa, bloqueia a ativação de neurônios das lâminas IV e V, exclusivamente com estímulos nocivos, e esse efeito também é revertido pela naloxona.

Embora o sítio preciso de ação dos opióides nos neurônios sensoriais não tenha sido determinado de forma satisfatória nesses trabalhos, os mesmos serviram, acima de tudo, para estabelecer uma relação funcional entre os opióides e os neurônios que contêm SP. Dois prováveis mecanismos de ação pelos quais os opióides estariam inibindo a transmissão da dor seria ou pelo aumento da condutância, de forma que o potencial de ação não despolarizaria efetivamente a membrana do terminal nervoso, ou inibindo o influxo de cálcio necessário para a liberação do neurotransmissor (Nicoll *et al.*, 1980). Mudge *et al.* (1979) sugerem que a encefalina inibe a SP por esse último mecanismo.

Um outro conhecido efeito da SP é sobre sua modulação do comportamento motor. Alterações nos padrões do comportamento motor foram descritas após injeções centrais e periféricas, em ratos e camundongos. Injeções de SP na área tegmental ventral (ATV) e SN, em ratos, induzem um aumento nos comportamentos de locomoção, limpeza e levantar sobre as patas traseiras (Kelley & Iversen, 1978; Kelley *et al.*, 1979, 1985). Esses mesmos padrões de respostas são observados em camundongos, após injeções intracerebroventricular (ICV) (Naranjo & Del Rio, 1984; Hall *et al.*, 1987). Doses na faixa de 0,3 a 1,25 μg (ICV) induzem um forte aumento na locomoção, enquanto que doses mais altas (ICV) produzem imobilidade, rigidez e rotações (Rondeau *et al.*, 1978).

O que tem sido observado é que essas alterações no comportamento motor, causadas por injeções da SP, são dependentes do ritmo circadiano. Treptow *et al.* (1983) obtiveram um aumento na locomoção durante a fase de repouso e uma redução deste comportamento durante a fase de atividade, em ratos, após injeção central (12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e periférica (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de SP. Por outro lado, em camundongos, foi observado uma redução dos comportamentos de locomoção, de levantar e limpeza trinta minutos após injeção sistêmica de SP (Hall & Stewart, 1983; Hall *et al.*, 1985), e redução da locomoção e aumento da limpeza após injeção de SP no ventrículo lateral (Katz, 1979). Essa ação da SP sobre o comportamento motor tem sido relacionada com o sistema dopaminérgico mesotelencefálico, sendo que esse sistema é reconhecidamente um alvo para a ação da SP. As evidências sobre essa provável relação têm sido verificadas através

de análises comportamentais e neuroquímicas. Já foi verificado, por exemplo, que a injeção unilateral de SP na substância negra reticulada induz rotações contralaterais ao hemisfério injetado, bem como um aumento na taxa de renovação dopaminérgica no núcleo caudado-putâmen ipsilateral, em ratos (Olpe & Koella, 1977; James & Starr, 1979). Além do mais, quando injetada na ATV de ratos (onde existe uma verdadeira sobreposição entre a distribuição de terminais nervosos contendo SP e corpos celulares dopaminérgicos), a SP aumenta, por cerca de duas horas, a atividade motora espontânea em ratos (Kelley *et al.*, 1979). Nesse trabalho, a interação entre dopamina e SP foi evidenciada pela potenciação do efeito da anfetamina e pelo bloqueio dessa atividade motora pelo haloperidol ou por lesões neurotóxicas, com 6-OHDA, da ATV.

Trabalhos mais recentes têm mostrado que os efeitos da SP sobre o sistema dopaminérgico podem ser observados através da utilização de seus fragmentos moleculares. Assim, através da técnica de microdiálise foi analisado o conteúdo de dopamina extracelular do núcleo acúmbens e neostriato, após microinjeções da molécula completa de SP e de seus fragmentos N-terminal (SP1-7) e C-terminal (DIME C-7). Os resultados mostraram que a dose de 37 nmol/kg de SP causou um aumento moderado nos níveis de dopamina extracelular do estriado que perdurou por cerca de cinco horas, enquanto que não houve nenhuma alteração por parte dos dois fragmentos, nessa mesma dose. No entanto, a dose de 185 nmol/ de SP e de 37 nmol/kg de seu fragmento C-terminal, no núcleo acúmbens, causou um aumento exacerbado nos níveis extracelulares de dopamina nessa estrutura, que persistiu por volta de duas horas (Huston *et al.*, 1993).

Sem dúvida nenhuma, um dos efeitos da SP que mais tem sido investigado é quanto sua participação nos mecanismos de aprendizagem e memória, bem como nos processos de reforço (Huston & Oitzl, 1989; Hasenöhrl *et al.*, 1992). Diversos trabalhos têm demonstrado que microinjeções de SP, imediatamente após o treino pode facilitar ou prejudicar a aprendizagem de uma tarefa de esQUIVA inibitória, dependendo da estrutura cerebral na qual ela for injetada. Assim, foi demonstrado que a injeção de SP na SN e na AM de ratos prejudica a retenção de um teste de esQUIVA inibitória, observando-se um quadro de amnésia retrógrada (Huston &

Stäubli, 1978, 1979), enquanto que na região do hipotálamo lateral/feixe prosencefálico medial (HL/FPM), bem como no núcleo medial do septo (NMS), esses mesmos autores (Stäubli & Huston, 1979, 1980) verificaram uma facilitação da aprendizagem para a mesma tarefa, além do teste de preferência por lugar em um modelo do labirinto em T modificado. É interessante notar que esses efeitos foram similar aqueles observados através da estimulação elétrica, imediatamente após o treino, dessas mesmas estruturas (Huston *et al.*, 1977; Destrade & Jaffard, 1978).

A administração periférica desse neuropeptídeo também influencia os processos de aprendizagem e memória, quando administrada após o treino, em ratos e camundongos. É possível observar esse efeito em diversas tarefas comportamentais que incluem, por exemplo, a aprendizagem de diferentes respostas de esquiva inibitória (Schlesinger *et al.*, 1983; Tomaz & Huston, 1986; Pelleymounter *et al.*, 1988; Tomaz *et al.*, 1990), habituação (Aguiar & Tomaz, 1990; Gerhardt *et al.*, 1993), discriminação positivamente reforçada (Schlesinger, 1986), e a aprendizagem em um labirinto aquático (Hasenöhrl *et al.*, 1990). Paralelo a esses efeitos nos processos de aprendizagem e memória existem fortes evidências de que a SP também está envolvida nos processos de reforço. O fato de que a SP pode possuir tanto efeitos facilitadores (Stäubli & Huston, 1985), quanto efeitos prejudiciais (Huston & Stäubli, 1979; Stein & Belluzzi, 1979) sobre a aprendizagem e memória, levaram à hipótese de que os efeitos da SP nesses processos estão subordinados às propriedades aversivas ou recompensadoras de determinadas regiões cerebrais, isto é, a SP pode causar efeitos reforçadores positivos (facilitadores da aprendizagem) ou punitivos (prejudiciais à aprendizagem), dependendo do sítio cerebral na qual ela exercer sua atividade. Essa hipótese está de acordo com a teoria do reforço central, defendida por Huston *et al.* (1977), a qual sugere que reforçadores com valor positivo, após o treino de uma determinada tarefa, facilitam a aquisição e consolidação da mesma, enquanto que estímulos com propriedades aversivas ao organismo tendem a prejudicar essa aprendizagem e sua consolidação.

Semelhante a seus efeitos sobre o comportamento motor, a participação da SP nos mecanismos da aprendizagem parece depender, também, de sua estrutura molecular. Assim, já foi demonstrado que o fragmento N-terminal (SP1-7) de SP apresenta os mesmos efeitos facilitadores, bem como efeitos reforçadores positivos, da molécula completa de SP, tanto através da administração sistêmica quanto da administração central, em diversas tarefas comportamentais (Huston *et al.*, 1983).

Existem resultados na literatura demonstrando que a SP também possui propriedades neurotróficas, ou neuroprotetoras (Jonsson & Hallman, 1982; Ywasaki *et al.*, 1989). Esses resultados têm levado à investigação de uma possível participação da SP em doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson ou a doença de Alzheimer. Utilizando a lesão unilateral com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) do sistema mesoestriatal, Mattioli (1992a) e Mattioli *et al.* (1992b) demonstraram que o tratamento diário com SP (37 nmol /kg), foi capaz não só de prevenir os déficits funcionais comumente induzidos por esse tipo de lesão (assimetria no comportamento de rotação), como também aumentou a rapidez na recuperação do comportamento de tigmotaxia. Foi verificado que esse efeito facilitador da SP parecia estar relacionado ao grau de depleção de dopamina estriatal, ou seja, apenas os animais com uma depleção parcial desse neurotransmissor tiveram uma facilitação dos efeitos da SP na recuperação da lesão, enquanto os animais que tiveram uma depleção de cerca de 98% de dopamina estriatal não sofreram tal influência. Isso sugere que os efeitos preventivos ou recuperativos da SP se dão através de uma interação entre esse neuropeptídeo e dopamina. É possível que a SP tenha atuado através de neurônios dopaminérgicos residuais, ou através de sistemas pós sinápticos, a fim de compensar a perda da inervação dopaminérgica.

Experimentos *in vitro* têm sugerido que a SP aumenta o crescimento de fibras neurais em culturas de gânglios da raiz dorsal da medula espinhal de pintos (Narumi & Fujita, 1978). Ela também promove o crescimento de neurônios simpáticos, bem como acelera o crescimento e aumenta a espessura de feixes neurais de raízes espinhais em ratos (Koslova *et al.*, 1987). Existem evidências de que essa relação entre SP e plasticidade neural também ocorre a nível central.

Assim, Johnsson & Hallman (1982), demonstraram que a SP atua na facilitação do desenvolvimento de neurônios noradrenérgicos, após lesões dos mesmos por 6-OHDA, em ratos. Por outro lado, Nakai & Kasamatsu (1984) através de estudos histoquímicos observaram que injeções intraventriculares de SP aumentam a inervação catecolaminérgica do córtex occipital de ratos, em sítios próximos de regiões lesadas por 6-OHDA. Porém, esse mesmo efeito não foi verificado quando a injeção foi diretamente no sítio lesado pela droga, o que sugere que a ação da SP tenha ocorrido através da ativação direta dos corpos celulares catecolaminérgicos do *locus coeruleus*. Esse efeito regenerador da SP também já foi observado em outras espécies não mamíferas. Lüneburg & Flohr (1988) demonstraram que a SP é capaz de facilitar a recuperação funcional de sapos (*Rana temporaria*) com lesão unilateral do labirinto. Assim, os ratos tratados com SP apresentaram uma compensação vestibular mais rápida, dose-dependente, do que aqueles tratados apenas com o veículo da SP.

É sugerido que os efeitos da SP nos processos de recuperação funcional após degeneração neuronal seja semelhante aqueles das neurotrofinas, que são proteínas responsáveis por funções reguladoras no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso e na recuperação de tecidos lesados. Essas neurotrofinas e, hipoteticamente a SP, agiriam como o fator de crescimento neural (NGF), controlando o desenvolvimento de neurônios, a regeneração funcional dos mesmos e sendo responsável pela síntese e expressão de moléculas celulares. Esses efeitos da SP têm levado à hipótese sobre uma possível relação entre seus efeitos moduladores da memória e seus efeitos reforçadores com o prejuízo na capacidade associativa observado nas doenças neurodegenerativas. Isso implicaria um papel para a SP em mais uma doença de caráter neurodegenerativo, nesse caso o Mal de Alzheimer, que no homem degenera o núcleo basal de Meynert (homólogo ao núcleo basal magno celular no rato). Esse envolvimento da SP no Mal de Alzheimer é fortalecido pelo fato de que uma das mais importantes estruturas anormais que se encontram em forma de placas degenerativas nos cérebros de pacientes com essa doença é a proteína β -amilóide, a qual pode causar efeitos amnésicos semelhantes aos de SP em determinadas regiões do cérebro e cujos

efeitos têm sido localizados em uma sequência de onze aminoácidos (25-35), os quais possuem uma estrutura bastante similar àquela das neurokininas, como a SP. Além do mais, já foi verificado que antagonistas da SP mimificam os efeitos da proteína β -amilóide, enquanto que agonistas revertem tais efeitos. E mais, a administração periférica de SP e seu fragmento N-terminal bloqueiam os efeitos amnésicos dessa proteína, administrada por via ICV. Com isso, é interessante investigar os efeitos da SP nos processos mnemônicos prejudicados nessa doença neurodegenerativa (para revisão sobre o assunto ver Huston *et al.*, 1993).

Como podemos observar, a SP está envolvida em diversas funções no SNC dos mamíferos, as quais são consideradas de grande complexidade, bem como de fundamental importância nos processos evolutivos pelos quais passaram as diferentes espécies, como é o caso da plasticidade neuronal e a regeneração de funções. Além disso, relatos na literatura têm demonstrado, de forma cada vez mais convincente, que esse neuropeptídeo também cumpre um papel importante nos processos neurobiológicos das reações de defesa, cujos mecanismos básicos já foram amplamente abordados por nós nas seções anteriores deste trabalho. Assim, além do amplo corpo de evidências sobre o papel primário que a SP cumpre nos processos de nocicepção que, como já foi discutido, é um componente relevante nos mecanismos defensivos, relatos na literatura sugerem um papel modulador para esse neuropeptídeo nas respostas consideradas de caráter preponderantemente aversivo, como a defesa afetiva e a luta defensiva.

Já foi demonstrado que injeções ICV de SP, em camundongos, eleva significativamente as respostas motoras, especialmente a autolimpeza, o levantar sobre as patas traseiras, o coçar e a locomoção (Hall *et al.*, 1987). Em ratos, foi verificado que injeções ICV tanto de SP, quanto de seu agonista sintético, o DIMETIL-C7, além de causarem um padrão de respostas motoras semelhantes àsquelas observadas em camundongos, são capazes de induzir uma aversão condicionada ao lugar, em um paradigma de condicionamento ao lugar (Elliot & Iversen, 1987; Elliot, 1988). Porém, mais recentemente, têm surgido evidências de que a SP pode estar diretamente envolvida na reação de defesa ao nível das estruturas do SCA. Assim, Siegel e colaboradores, baseados em uma série de

experimentos, que envolvem análise comportamental e neuroquímica, têm demonstrado que a SP é um dos componentes farmacológicos envolvidos na mediação de respostas de defesa afetiva e respostas de ataque predatório. Os resultados desses autores sugerem que a SP é um dos neurotransmissores responsáveis pela eliciação da raiva defensiva, em gatos, através de mecanismos excitatórios na amígdala, em conexão com uma via direta até o hipotálamo medial (Shaikh *et al.*, 1993).

5. TESTES PARA MEDIDAS DO COMPORTAMENTO DEFENSIVO

Podemos considerar como os primeiros modelos experimentais para estudar os processos neurais das respostas afetivas, os trabalhos clássicos com estimulação elétrica ou ablações de estruturas cerebrais, do início do século (Cannon, 1927; Bard, 1928; Ranson *et al.*, 1935; Hess & Brüger, 1943; Hunspergger, 1956; De Molina & Hunsperger, 1959, 1962; Abrahams *et al.*, 1960; Wasman & Flynn (1962). Essas metodologias que em muitos aspectos lembravam as técnicas utilizadas nos primeiros estudos sobre localização de funções cerebrais um século antes, foram, pode-se dizer, o alicerce para a padronização dos modelos animais refinados e melhor validados, como os que conhecemos na atualidade.

Décadas depois, os modelos para se estudar os substratos neurais das emoções foram cada vez mais se desenvolvendo e se especializando, oferecendo maiores subsídios para uma melhor compreensão desses processos. Com as especializações em diversas áreas do conhecimento e o constante refinamento das técnicas foram sendo desvendados não só as estruturas que estão por trás dos mecanismos de defesa, como também as substâncias endógenas responsáveis pela sua mediação, o que implicou em um avanço do conhecimento acerca da anatomia e farmacologia desses processos.

Neste trabalho foram utilizados três testes que são comumente usados para medidas do comportamento defensivo, a arena, o teste do condicionamento ao lugar e o teste do labirinto em cruz elevado. A seguir, discutiremos brevemente algumas das características de cada um desses testes.

5. 1. Campo Aberto

No presente trabalho foi utilizado uma arena que, em sua essência, lembra aquele que ficou conhecido como o modelo do campo aberto. O campo aberto foi concebido por Calvin Hall (Hall, 1934; Hall, 1936) o qual utilizou a quantidade de defecação e urina do animal como índice de emocionalidade. A partir daí aumentou consideravelmente o número de variáveis dependentes analisadas nesse modelo.

A metodologia do campo aberto consiste basicamente em medir os comportamentos eliciados por um animal colocado em um certo espaço aberto, que represente novidade para ele e do qual não consegue escapar, por existir paredes ao redor desse espaço. Esse modelo permite avaliar tanto medidas de exploração (locomoção, levantamento, farejamento) como medidas puramente aversivas (defecação, micção, saltos, congelamento), relacionando a atividade motora a construtos teóricos sobre exploração e medo (Archer, 1973; Willner, 1991). O campo aberto pode variar amplamente no tamanho, na forma, bem como nos parâmetros das respostas a serem avaliados. Assim, esse teste pode ser utilizado tanto para medir o comportamento do animal mediante uma simples situação de novidade, como pode servir para se avaliar efeitos de drogas, de lesões, estimulação elétrica do SNC, habituação, bem como a aprendizagem em resposta ao meio ambiente experimental.

A forma mais comumente utilizada do campo aberto tem sido a arena circular, sendo que a forma quadrada e retangular são, também, amplamente utilizadas. Não só a forma do campo aberto pode variar, mas também o material, a cor e o nível de iluminação. Não existem evidências de que a variação nesses parâmetros influenciem o comportamento. No entanto, já foi observado que o tamanho do campo aberto pode influenciar a atividade motora (Walsh & Cummins, 1976). Porém, o fator iluminação costuma estar sempre presente, sendo uma das variáveis que também pode influenciar significativamente o comportamento do sujeito experimental. Geralmente é utilizado uma lâmpada, de luminosidade variando de acordo com o objetivo do experimento, sendo que em

experimentos que têm como objetivo criar uma situação de caráter aversivo a luminosidade costuma ser mais forte, enquanto que em situações em que há a necessidade de manter o animal em um nível de estresse mais baixo, é utilizado pouca iluminação, geralmente apenas a da sala experimental como um todo. Existem relatos de que um alto nível de luminosidade diminui a atividade motora em diversos parâmetros, como a ambulação, o levantar e a tigmotaxia (Walsh & Cummins, 1976).

5. 2. Condicionamento ao Lugar

O estudo sobre as propriedades reforçadoras de determinadas substâncias químicas tiveram início, pode-se dizer, com o advento da teoria do condicionamento operante. Através dessa metodologia foi possível avaliar as propriedades motivacionais dessas drogas através da frequência e magnitude de determinadas respostas emitidas pelo animal de forma contingente à administração do composto, sendo elas bastante variadas e podendo incluir desde pressionar uma barra até caminhar em um labirinto e ingerir soluções adocicadas (Mucha *et al.*, 1982). O uso da metodologia do condicionamento operante, com o passar do tempo, mostrou grandes limitações para o estudo das propriedades reforçadoras de determinadas drogas. Uma delas é a grande quantidade de exposição do animal à droga, o que implica em diversas microinjeções, levando à lesões no tecido cerebral. Essa repetição também induz tolerância e dependência física do animal, principalmente no caso dos narcóticos, uma das classes de fármacos mais utilizadas nesses procedimentos. Outra importante limitação desse modelo é a complexidade dos procedimentos do treino operante, dificultando desde a análise comportamental até os correlatos bioquímicos e neurofisiológicos. Porém, a maior dificuldade em se utilizar esses modelos é que juntamente com o condicionamento operante misturam-se várias características do condicionamento clássico e do processo de habituação, não garantindo um correlato biológico seguro do comportamento que caracteriza o reforço operante e a aprendizagem. Com isso, buscou-se metodologias alternativas que permitissem uma análise mais clara e

eficiente das propriedades motivacionais de determinados fármacos. O modelo de condicionamento ao lugar foi uma das alternativas surgidas para tentar resolver esse problema. O primeiro modelo de condicionamento ao lugar, citado na literatura é, provavelmente, aquele concebido e utilizado por Garcia *et al.* (1957), os quais conseguiram uma resposta de aversão ao lugar, em ratos, onde os mesmos experienciaram os efeitos de uma radiação ionizante.

Consistindo, geralmente, de dois compartimentos diferenciados entre si e interligados por um corredor central a metodologia desse modelo consiste basicamente em parear dicas distintas desse aparato, inicialmente neutras, com determinado estímulo incondicionado. O que é esperado de tal procedimento é que no caso de drogas com propriedades reforçadoras positivas o animal passe a dispensar uma maior parte do tempo do teste naquele ambiente onde ele experienciou o efeito da droga, enquanto que, em se tratando de substâncias com propriedades aversivas, espera-se o oposto, isto é, que o animal passe muito menos tempo naquele ambiente pareado com essa droga. Uma grande quantidade de trabalhos têm utilizado esse modelo para a avaliação de uma diversidade de compostos farmacológicos, como os opióides, psicoestimulantes e peptídeos não opióides. Comparado com outros modelos, o condicionamento ao lugar possui grandes vantagens, como sua simplicidade de procedimento e sua grande sensibilidade, tendo se revelado um método bastante efetivo para se estudar a neurobiologia da motivação produzida pela administração de drogas psicotrópicas (Mucha *et al.*, 1982).

5. 3. Labirinto em Cruz Elevado

A busca pelo desenvolvimento de novos compostos ansiolíticos que não possuam os efeitos secundários indesejáveis, quando administrados clinicamente, têm levado à necessidade de elaboração de novos modelos animais que consigam testar de forma mais prática e eficiente a atividade ansiolítica dos mesmos. Os testes utilizados para avaliação dos efeitos de compostos ansiolíticos, a uma década atrás, utilizavam, geralmente, estímulos de natureza aversiva como o choque, o

medo condicionado, além da privação de água e comida (Pellow *et al.*, 1985). No entanto, esses modelos (esquiva condicionada, resposta emocional condicionada e os testes de conflito) têm se mostrado muito mais úteis e eficientes no desenvolvimento e “screening” de novos compostos ansiolíticos do que para caracterizar os mecanismos cerebrais do medo e da ansiedade (Pankseep, 1990). Como tentativa de superar essa limitação a atenção voltou-se para modelos animais que empregam comportamentos espontâneos (modelos etológicos) ao invés de respostas aprendidas como parâmetros de avaliação. Sem dúvida nenhuma, dentre esses modelos o que mais ganhou destaque, passando a ser um dos testes mais amplamente utilizados, foi o *labirinto em cruz elevado* (LCE).

O LCE é um aparato desenvolvido a partir de um modelo desenvolvido por Montgomery (Montgomery, 1955; Montgomery & Monkman, 1955), o qual demonstrou que a exposição a um braço aberto de um labirinto elevado era capaz de provocar uma situação de conflito, em um rato, entre a motivação para explorar um ambiente novo e o medo gerado pelo espaço aberto e a altura. Ele verificou que essa situação conflituosa não estava presente quando ao animal era permitido explorar um braço fechado desse labirinto. Assim, utilizando o que foi chamado de labirinto em Y elevado, Montgomery (1955) mostrou que todos os animais tinham uma clara preferência por explorar os braços fechados desse aparato. A conclusão a que chegou foi que a exposição a um estímulo novo (no caso, os braços do labirinto) pode incitar tanto a atividade exploratória quanto a resposta de medo no rato, gerando assim uma situação conflituosa no animal, de aproximação e esquiva dos braços abertos do aparato.

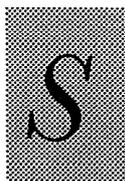
Com base nesse trabalho, Handley e Milani (1984) desenvolveram um aparato com o objetivo de detectar efeitos de drogas ansiolíticas. Construído em madeira, esse aparato consistia de dois braços fechados e dois braços abertos, em forma de cruz e estando, em seu conjunto, elevado do solo. As autoras o denominaram de **labirinto em cruz elevado** e consideraram como medida de ansiedade a extensão na qual os compostos ansiolíticos afetariam, seletivamente, a taxa de entradas nos braços abertos do labirinto. Os resultados obtidos por essas autoras foram semelhantes aqueles observados por Montgomery (1955), ou seja, os

animais apresentaram uma clara e significativa preferência pela exploração dos braços fechados. As autoras verificaram que os anisolíticos aumentam a proporção de entradas nos braços abertos, bem como a soma de tempo dispensada nos mesmos, em um período de 5 minutos. Por sua vez, os psicoestimulantes, os neurolépticos e os antidepressivos não aumentam nem a entrada nem o tempo nesses braços, enquanto que os ansiogênicos mostram efeitos “misturados”, porém com uma tendência a reduzir a exploração nos braços abertos. Além disso, os níveis de corticosterona sanguínea, os quais são tradicionalmente utilizados na avaliação de repostas ao estresse, mostraram-se significativamente elevados nos animais confinados nos braços abertos, com uma grande soma de defecação e congelamento (Pellow *et al.*, 1985; Pellow & File, 1986).

Para tentar padronizar os melhores parâmetros a serem avaliados com utilização do LCE, passou-se a utilizar, de forma constante, a análise fatorial dos diversos parâmetros detectados nesse teste. Assim Lister (1987), utilizando camundongos, identificou três grandes fatores independentes: o fator 1, relacionado a medidas de ansiedade; o fator 2, refletindo a atividade exploratória; e o fator 3, caracterizando a atividade motora. As duas principais medidas de ansiedade foram a % do número de entradas nos braços abertos e a % do tempo dispensado nesses braços, com peso no fator 1. Curiosamente, ele observou que o parâmetro de entrada total nos braços abertos, geralmente avaliado como medida de atividade motora, teve um peso maior nos fatores 1 (ansiedade) e 3 (atividade motora). O fato de que essa medida teve um peso em dois fatores levou o autor a concluir que esse parâmetro não representa uma medida clara para se avaliar a atividade motora no teste do LCE. Assim, tem sido observado uma utilização cada vez maior do parâmetro frequência de entradas nos braços fechados, o qual na análise fatorial sempre aparece com um peso exclusivo no fator três, o permite uma avaliação sobre a atividade motora geral do animal e sua possível interferência nos efeitos observados com a utilização de determinados compostos.

OBJETIVOS





abe-se que a SP está envolvida nos processos de plasticidade cerebral e recuperação funcional. Também é conhecida a sua participação nos mecanismos de memória. De importância

neste aspecto está o fato de que, dependendo do sítio no qual ela for administrada pode causar uma facilitação da aprendizagem ou um prejuízo da mesma, com um quadro de amnésia retrógrada. Curiosamente, estes últimos efeitos parecem ocorrer em sítios cerebrais que fazem parte do SCA, como é o caso do complexo amigdalóide. Ao lado disso, um dos mais bem fundamentados papéis da SP é aquele que ela cumpre nos processos de nocicepção, cujos mecanismos primários estão relacionados aos estados motivacionais do medo, porém, pouco se sabe, até o momento, sobre as bases fisiológicas ou a interface desta inter-relação.

A partir destas evidências sobre o papel da SP em processos vitais, de claro valor adaptativo ao organismo, aliadas a recentes descobertas que mostram sua participação na expressão do comportamento emocional, este trabalho tem como objetivo contribuir para a investigação do papel da substância P na neurobiologia do comportamento defensivo integrado na MCPD. A ativação comportamental causada pela microinjeção do neuropeptídeo na MCPD de ratos, foi feita pelo registro de diferentes itens comportamentais em uma arena, e as respostas aversivas no contexto motivacional foram avaliadas no teste de aversão condicionada ao lugar e em um modelo animal de ansiedade amplamente utilizado em laboratórios de Psicobiologia, o teste do labirinto em cruz elevado.

**MATERIAIS
E MÉTODOS**



EXPERIMENTO I

Efeitos comportamentais produzidos por microinjeções de Semicarbazida e Substância P na MCPD de ratos na arena

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, ingênuos, pesando 230-250 g por ocasião da cirurgia, provenientes do biotério central da USP. Os animais foram alojados aos pares, em gaiolas de acrílico, com comida e água *ad libitum*, em um biotério com temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

2. Cirurgia

Cada animal era anestesiado com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) e levado a um aparelho estereotáxico (DAVID-KOPFF) onde teve sua cabeça fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de lidocaína 2% (0,2 ml) era aplicada por via intradérmica. Após a incisão, o tecido subcutâneo era removido, bem como o periósteo (através do auxílio de bisturi, pinça e algodão). Com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lâmbida, dois orifícios eram feitos, por meio de uma broca elétrica, para introdução de pequenos parafusos de aço inoxidável, os quais serviam para ancorar a prótese ao crânio do animal.

Em seguida, um outro orifício era feito para a implantação de uma cânula, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (25X6mm, 23G1, Becton Dickinson, Brasil) e medindo 15 mm de comprimento, através da qual eram administradas as substâncias químicas utilizadas nos experimentos. Essa cânula era direcionada unilateralmente à MCPD, seguindo as seguintes coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (1986), tendo o lâmbda como referência: 0.5 mm anterior, 0.4 mm lateral e 4.0 mm dorso-ventral. Em seguida, a cânula era fixada

com cimento de acrílico e ancorada ao crânio pelos dois parafusos, sendo protegida de entupimentos por um fio de aço (mandril). No início de cada cirurgia o animal recebia uma injeção intramuscular de pentabiótico 60.000 U. I.

3. Aparato

Foi utilizada uma arena circular, confeccionada em acrílico transparente e medindo 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura. O assoalho, em fórmica branca, era dividido em 12 partes iguais, para o registro da ativação comportamental causada por microinjeções na MCPD (FIG.2).

4. Microinjeções

Para a administração das substâncias químicas foram utilizadas agulhas odontológicas (0.3 mm de diâmetro interno, IBRAS-CBO) medindo 16 mm de comprimento. A microinjeção era executada por meio de uma seringa *Hamilton* (modelo 701, USA), de 5,0 μl , a qual era conectada a agulha através de um tubo de polietileno PE-10, que continha água destilada e uma bolha de ar que serviam para monitorar a microinjeção. As drogas foram microinjetadas em um volume de 0,2 μl por um período de 30 segundos, sendo que a agulha permanecia no local por mais 20 segundos, para permitir uma completa difusão da droga. Cada animal recebia apenas uma microinjeção.

5. Procedimento Experimental

Uma semana após a cirurgia os animais foram levados à arena, e colocados durante cinco minutos para habituação ao ambiente. No dia seguinte, cada um deles foi microinjetado com salina, semicarbazida ou substância P e logo em seguida colocado na arena, sendo seu comportamento registrado durante 30 minutos. Foram registradas as seguintes respostas: número de cruzamentos (resposta de cruzar com as quatro patas, de uma para outra das 12 seções do assoalho), levantamentos (resposta de erguer-se sobre as duas patas traseiras, mantendo as duas patas dianteiras elevadas no meio da arena ou contra as

paredes de acrílico), episódios de limpeza (foi considerado que o animal estava realizando um episódio de autolimpeza quando o mesmo dispensava pelo menos 10 segundos nessa atividade).

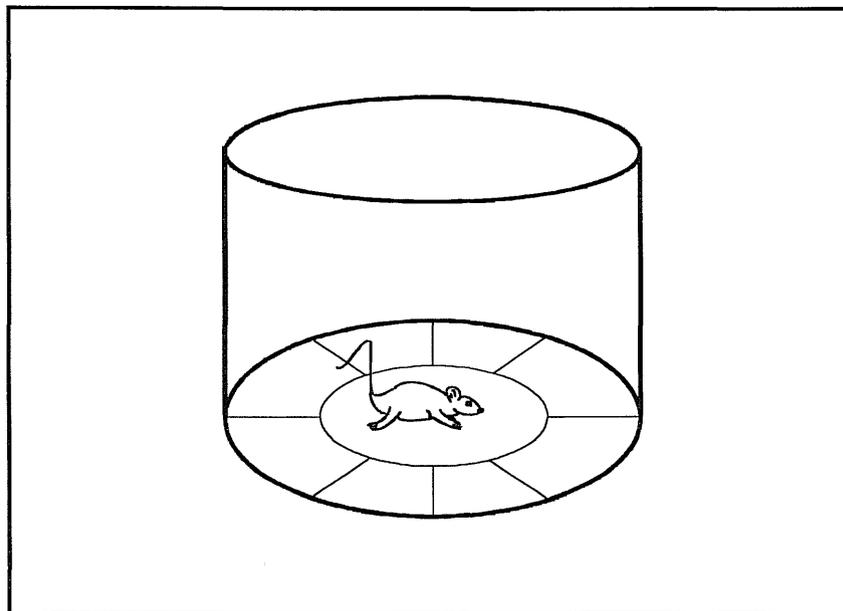


FIG. 2. Arena circular utilizada para verificação das reações comportamentais induzidas por microinjeções de semicarbazida e substância P na MCPD.

6. Drogas

Foram utilizadas a **semicarbazida** (Sigma, USA) e a **substância P** (Sigma, USA). Ambas foram diluídas em solução fisiológica (salina 0,9%), sendo que esse veículo foi utilizado como controle. O objetivo de se utilizar a semicarbazida (SCBZ), um bloqueador da síntese GABAérgica, foi fazer uma comparação entre os efeitos produzidos por essa droga, os quais são sabidamente aversivos em regiões do sistema cerebral aversivo (DiScala & Sandner, 1987), com aqueles produzidos pela administração de Substância P (SP).

Foram utilizados 5 grupos de animais, contendo entre oito e 10 animais cada um, os quais foram injetados, respectivamente, com salina, SCBZ 6 µg/0,2 µl, e 25, 50 e 100 ng de SP, em um volume de 0,2 µl. Procurou-se tomar as precauções que são recomendadas para o uso da SP (Stewart, 1983): preparação de alíquotas que ficavam guardadas no “freezer” em tubos de polipropileno, os quais eram lavados com ácido acético a 0.01 M; manipulação da droga poucos momentos antes do experimento, com o cuidado de deixá-la descongelar em temperatura ambiente antes de abrir o tubo com a amostra; e não recongelar a droga que sobrava da alíquota após os experimentos.

7. Histologia

Após o término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados com uma overdose de pentobarbital e perfundidos por via intracardíaca com salina, seguido de formalina a 10%. Em seguida, foram feitas secções de 50 µm, em um micrótomo, e coradas com vermelho neutro para localização dos sítios de injeções, correspondentes ao atlas extereotáxico de Paxinos & Watson (1986).

8. Análise Estatística

Os resultados foram analisados através de uma análise de variância “one-way” (ANOVA) para os grupos de salina e SP, com comparações *post-hoc* realizadas através do teste de DUNCAN. Para os grupos de SCBZ e controle foi aplicado o teste *t* de Student, para amostras independentes.

EXPERIMENTO II

Efeitos produzidos por microinjeções de semicarbazida e substância P na MCPD de ratos submetidos ao teste de condicionamento ao lugar

1. Animais

Como no experimento I.

2. Cirurgia

O procedimento de cirurgia foi semelhante àquele do experimento 1, exceto com relação ao implante das cânulas, que neste experimento mediam 10 mm de comprimento e foram implantadas bilateralmente, com as seguintes coordenadas, baseadas no atlas de Paxinos & Watson (1986): 0.5 mm anterior; 1.2 mm lateral (com ângulo médio-lateral de 10°); 3.5 mm dorso-ventral.

3. Microinjeções

Para as microinjeções, os ratos foram gentilmente manipulados, os fios de aço das cânulas foram removidos e foram inseridas as agulhas de microinjeção (0.3 mm de diâmetro interno, 12.5 mm de comprimento) em cada cânula guia, de modo a ficar 2.5 mm abaixo destas. As agulhas foram conectadas a duas seringas *Hamilton* por meio de dois tubos de polietileno (PE-10). Um volume de 0,2 µl foi bilateralmente injetado, através de uma bomba de microinjeção (Harvard Apparatus, 22), por um período de 30 segundos. Nesse experimento foi utilizado o procedimento das injeções simuladas (*sham*), que era igual ao dos animais tratados com a diferença de que nada era injetado no local.

4. Aparato

Construído segundo modelo descrito por DiScala & Sandner (1987), com algumas modificações, esse aparato consistia de três compartimentos, sendo dois compartimentos largos (25x35x30 cm) conectados por um compartimento central menor (10x35x30 cm). Um dos compartimentos largos possuía as paredes pintadas de listras pretas e brancas e assoalho de acrílico transparente e o outro possuía as paredes pintadas de preto com o assoalho em arame. O compartimento central era de acrílico transparente, com portas tipo guilhotina, removíveis. Quando removidas os animais podiam mover-se livremente entre os dois compartimentos largos, via compartimento central (FIG.3).

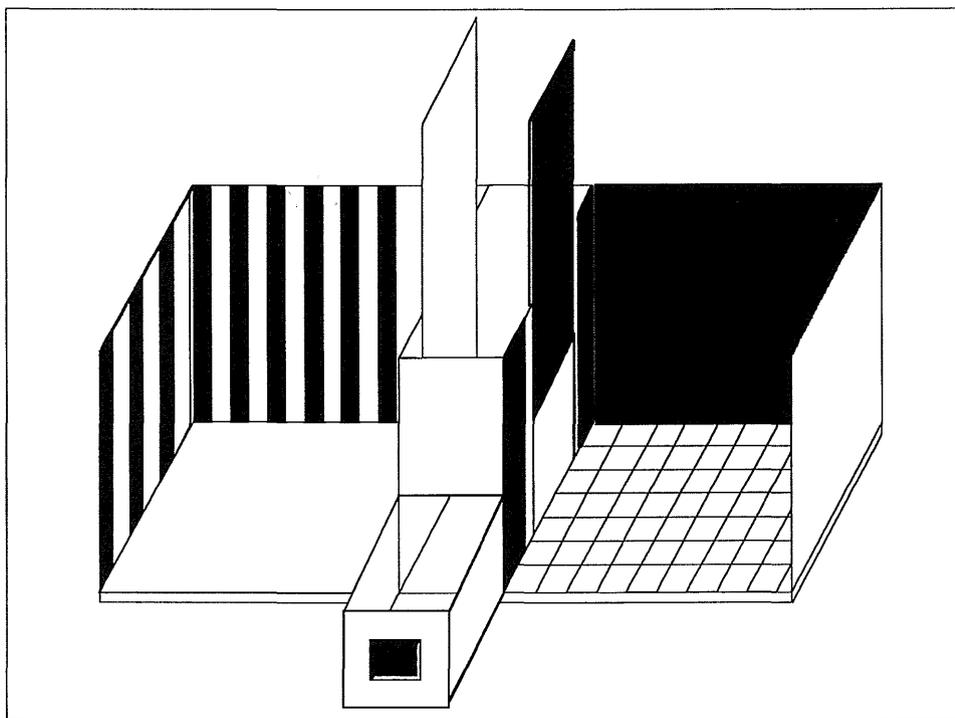


FIG. 3. Caixa de condicionamento ao lugar, construída a partir de um modelo descrito por DiScala & Sandner (1987).

5. Procedimento experimental

Os animais foram submetidos a sessões de habituação (15 minutos) na

caixa experimental, com livre acesso para cada compartimento, durante pelo menos três dias, com o objetivo de eliminar qualquer preferência do animal por algum dos compartimentos largos. Após esse período de habituação foi iniciado o treino, que durava dez dias e era dividido em três fases:

1a. Pré-condicionamento: No primeiro dia as portas do compartimento central eram removidas, com o animal podendo mover-se livremente através do aparato. Cada animal era gentilmente colocado no compartimento central e sua atividade era registrada em vídeo durante 15 minutos. O animal foi considerado estar dentro de um determinado compartimento quando sua cabeça e suas patas anteriores se encontravam dentro do mesmo. O número de vezes que o animal penetrava em cada lado da caixa, assim como o tempo que ele dispensava em cada um deles foram registrados.

2a. Condicionamento: Nos dias 2, 4, 6, e 8 os animais recebiam as microinjeções simuladas; nos dias 3, 5, 7 e 9 eles eram microinjetados com salina ou droga e em seguida confinados por um período de 30 minutos em um dos compartimentos largos, sendo que o número de animais que recebeu salina ou droga em um compartimento foi contrabalanceado com o número de animais que recebeu este tratamento no outro.

3a. Pós condicionamento: no décimo dia, os ratos eram colocados no compartimento central, com as portas removidas e sua atividade foi registrada durante 15 minutos, em um procedimento similar aquele utilizado no pré-condicionamento. Assim, o tempo dispensado em cada compartimento e o número de vezes que o animal entrava em cada um deles eram outra vez registrados e considerados variáveis dependentes para análise de variância.

6. Drogas utilizadas, histologia e análise estatística

Como no experimento I.

EXPERIMENTO III

Efeitos da microinjeção de semicarbazida e substância P na MCPD de ratos submetidos ao teste do LCE

1. Animais, cirurgia e microinjeções

Como no experimento I.

2. Aparato

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi construído em madeira, de acordo com as especificações propostas por Pellow *et al.* (1985). O mesmo consistiu de um equipamento elevado 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50 x 10 cm) dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais, sem teto (50 x 10 x 40 cm), formando um ângulo de 90°. Ao redor dos braços abertos foram acopladas lâminas em acrílico transparente, formando uma borda de 1 cm de altura, com o objetivo de evitar que os animais caíssem do labirinto (FIG. 4). Esse equipamento foi mantido no interior de uma sala, iluminada artificialmente por luz branca (lâmpada fluorescente de 40 W). Além do labirinto, na sala havia ainda uma câmera de vídeo a qual registrava o comportamento dos animais durante o tempo do experimento. Após os experimentos a fita era analisada através de um aparelho de vídeo cassete acoplado a um aparelho de TV.

3. Procedimento experimental

Imediatamente após a microinjeção de SP ou salina, e mais ou menos três minutos após a microinjeção de SCBZ, o animal era colocado na área central do labirinto, com a cabeça direcionada para um dos braços fechados. Cada animal

era submetido a uma única sessão experimental, a qual durava 5 minutos. O desempenho dos animais foi avaliado através de três parâmetros principais:

Frequência de entradas nos braços fechados

Obtido através da simples soma do número de vezes que o animal entrou nos braços fechados do labirinto. Essa medida foi utilizada por permitir a avaliação da atividade locomotora do animal.

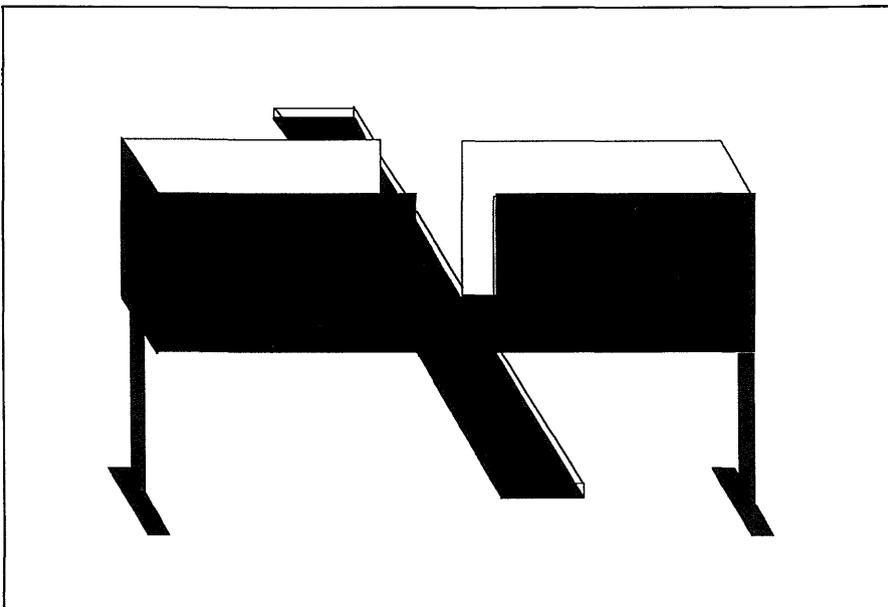


FIG. 4. Labirinto em cruz elevado, construído segundo especificações propostas por Pellow *et al.* (1985).

Porcentagem (%) de entradas nos braços abertos

Obtida através da relação entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto.

$$\% \text{ entradas} = \frac{100 \times \text{entradas braços abertos}}{\text{braços abertos} + \text{braços fechados}}$$

Porcentagem (%) de tempo nos braços abertos

Obtida através da relação entre o tempo gasto nos braços abertos do labirinto e o tempo gasto nos braços abertos e fechados durante o período total do teste (5 minutos).

$$\% \text{ tempo} = \frac{100 \times \text{tempo gasto nos braços abertos}}{\text{braços abertos} + \text{braços fechados}}$$

Obs: A frequência e o tempo que os animais dispensaram no compartimento central do labirinto, apesar de não terem sido avaliados foram registrados.

4. Drogas utilizadas e histologia

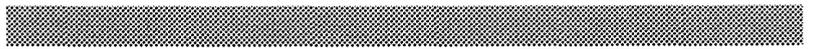
Como no experimento I.

5. Análise estatística

Para comparações estatísticas foi usada a análise de variância (ANOVA, “one-way”). Essa análise foi seguida pelo teste de Duncan, quando necessário, para verificação *post-hoc* das interações significativas entre os diferentes grupos.

Quando algum tratamento alterou a frequência de entrada nos braços fechados do labirinto (medida da atividade locomotora do animal), bem como a porcentagem de entradas nos braços abertos (medida de ansiedade), realizamos o teste de covariância. O objetivo do mesmo foi verificar se as alterações ocorridas na porcentagem de entradas nos braços abertos foi dependente do efeito na atividade locomotora geral do animal ou se significou um efeito ansiogênico da droga.

RESULTADOS



1. Sítios de Microinjeção

A localização dos sítios de microinjeções na MCPD, para os três experimentos foi, na sua maioria, a parte dorsal da matéria cinzenta, sendo que alguns poucos sítios podem ser observados na região do teto mesencefálico e camadas profundas do colículo superior. Vale a pena salientar que o número de sítios representados nas figuras é, obviamente, menor que o número total de animais utilizados em todos os experimentos, porém, isso deve-se ao fato de que vários desses animais tiveram os sítios de injeções sobrepostos. Na figura 5a estão representados os pontos para os experimentos 1 e 3 e na figura 5b estão representados os pontos para o experimento 2.

2. Experimento I

As microinjeções de SCBZ produziram uma forte ativação locomotora, caracterizada pelo grande número de cruzamentos na arena ($P < 0.01$, segundo teste t de Student), intercalada por períodos característicos de alerta, congelamento e um número significativo de levantamentos ($P < 0.05$). Com relação ao comportamento de limpeza não houve uma diferença significativa entre o grupo que recebeu SCBZ e o grupo controle ($P > 0.05$).

Com relação aos efeitos das microinjeções de SP verificou-se um aumento significativo na atividade locomotora, no número de respostas de levantamentos, bem como uma exacerbação do comportamento de limpeza. A ANOVA revelou um efeito significativo para o número de cruzamentos ($F_{3,24} = 3.58$, $P < 0.05$) e para o número de levantamentos ($F_{3,24} = 3.58$, $P < 0.05$). Segundo a análise *post-hoc*, através do teste de Duncan, esse efeito ocorreu somente com a dose de 25 ng de SP ($P < 0.05$). Com relação a resposta de limpeza a ANOVA revelou um efeito significativo para os grupos que receberam SP ($F_{3,24} = 11.13$, $P < 0.001$). Segundo a análise *post-hoc*, esse efeito foi produzido pelas três doses de SP ($P < 0.01$). De uma forma geral, a ativação comportamental induzida pela SCBZ iniciou-se por volta de 5 minutos após as microinjeções e desapareceram entre 15 e 20 minutos. Os

efeitos da SP foram imediatos as microinjeções e se estenderam por um período de 15 a 20 minutos.

Os resultados desse primeiro experimento encontram-se ilustrados na figura 6.

3. Experimento II

Durante a fase de pré-condicionamento os animais dos cinco grupos testados dispensaram um tempo equivalente em cada um dos compartimentos largos (405.33 ± 11.68 s). Uma análise de varância two-way (grupos X compartimento) confirmou que não houve uma preferência inicial por um determinado compartimento ($F_{1,62}=0.88$ $P>0.05$).

Os resultados foram analisados com base na diferença média de tempo dispensado no compartimento pareado com salina ou droga, antes e depois do condicionamento. Os tratamentos com SP promoveram uma significativa alteração nesta medida ($F_{3,25}=2.39$, $P<0.05$). A análise *post-hoc* revelou que estes efeitos foram devidos às doses de 25 e 50 ng de SP, as quais produziram uma clara redução no tempo gasto no compartimento pareado com a droga ($P<0.05$, em ambos os casos). A SCBZ também causou uma clara aversão condicionada ao lugar ($P<0.001$, segundo o teste *t* de Student). Os animais que receberam salina dispensaram uma soma de tempo similar tanto no compartimento no qual receberam a salina como naquele onde receberam injeções simuladas ($P>0.05$). Pareando um determinado compartimento com 100 ng de SP não foi observado nenhum efeito significativo ($P >0.05$).

Os resultados desse experimento encontram-se representados na figura 7.

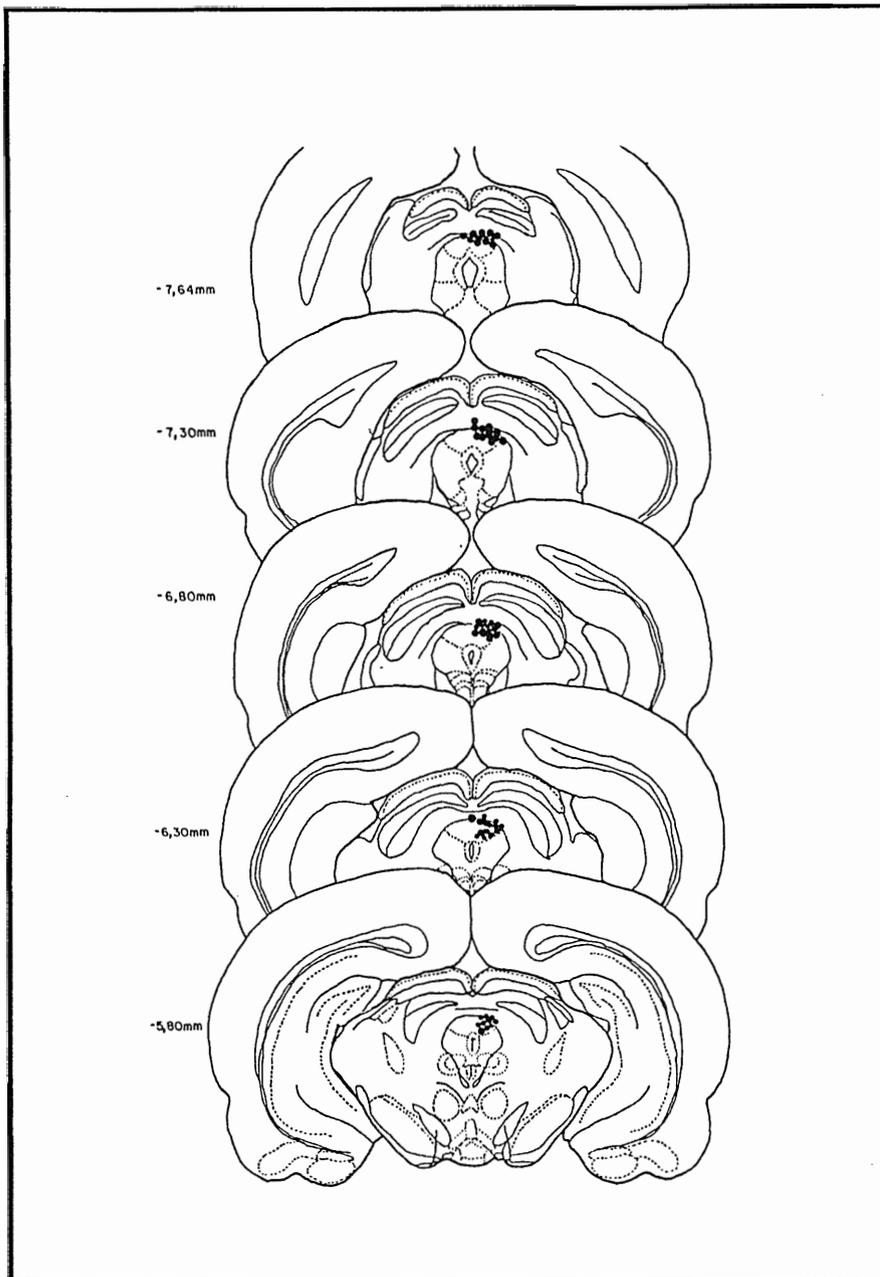


FIG. 5a. Localização dos pontos de microinjeções na matéria cinzenta periaquedutal de ratos, segundo coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (1986). Na figura encontram-se representados os pontos para os experimentos 1 e 3, com microinjeções unilaterais.

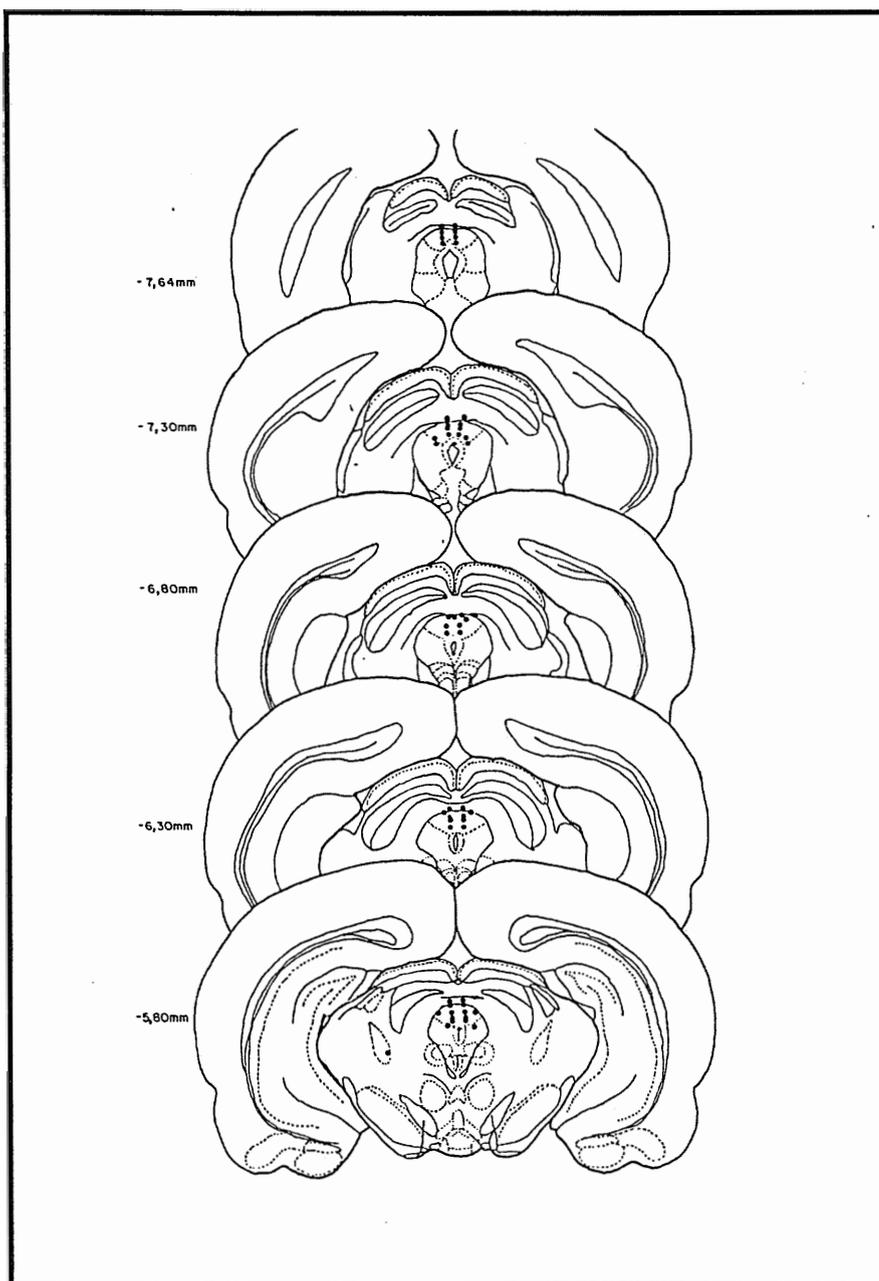


FIG. 5b. Localização dos pontos de microinjeções na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos, segundo coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (1986). Na figura encontram-se localizados os pontos de microinjeções, bilaterais, do experimento 2.

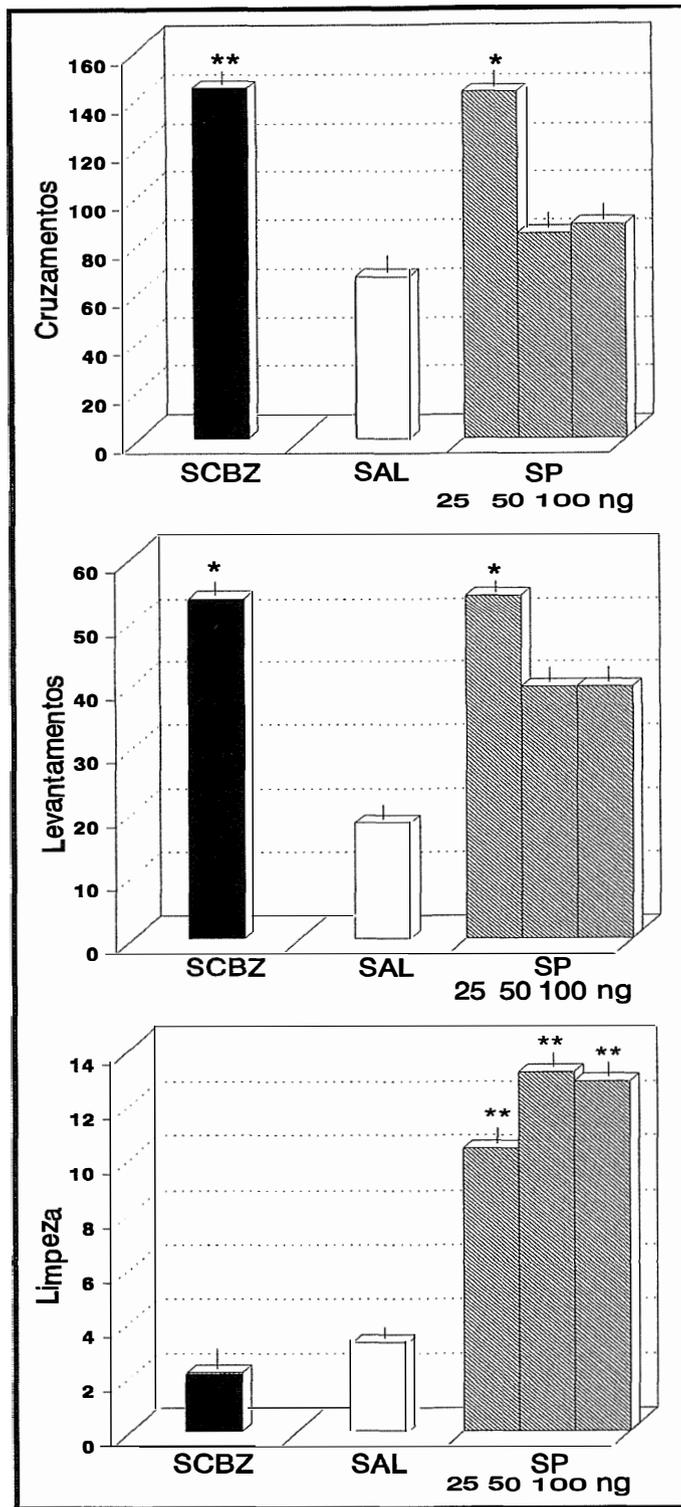


FIG. 6. Efeitos comportamentais da microinjeção de salina (SAL), semicarbazida (SCBZ- 6 $\mu\text{g}/0,2\mu\text{l}$) e substância P (SP- 25, 50 e 100 $\text{ng}/0,2\mu\text{l}$) na MCPD. A frequência das respostas está expressa como a média \pm EPM (ANOVA “one way” seguida pelo teste de DUNCAN, para a análise dos efeitos da SP e test *t* de Student para a análise dos efeitos da SCBZ). N=08 animais para os grupos SAL, SCBZ, SP 25 ng e N=06 animais para os grupos 50 e 100 ng de SP. *P< 0.05, **P <0.01.

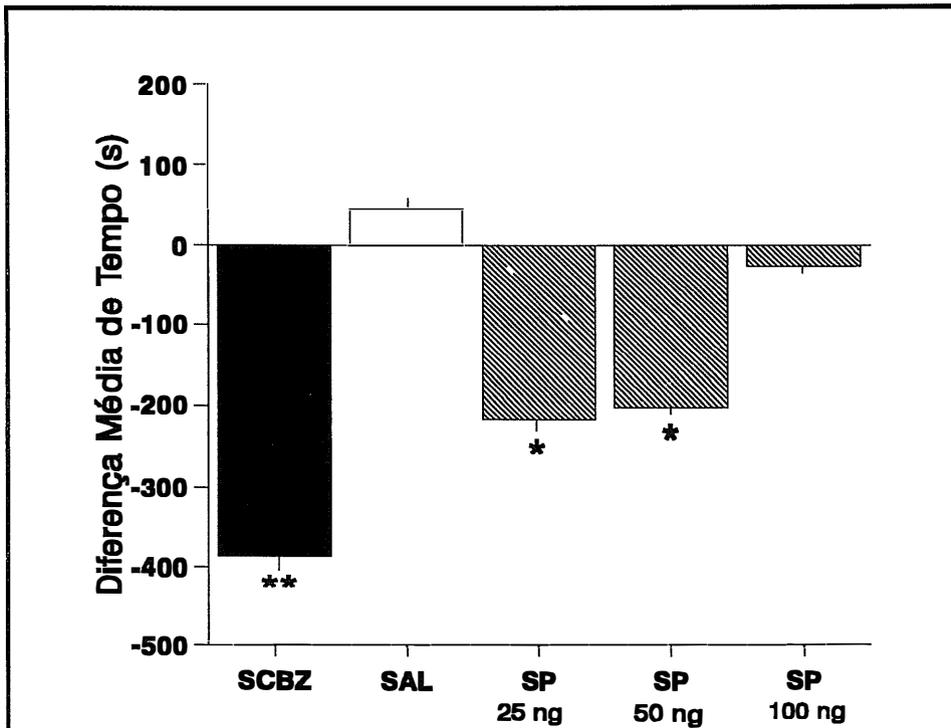


FIG. 7. Efeitos da microinjeção de salina (SAL), semicarbazida (SCBZ - 6 μ g/0,2 μ l) e substância P (SP- 25, 50 e 100 ng/0.2 μ l) na MCPD sobre o condicionamento ao lugar. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como a diferença média do tempo dispensado no compartimento pareado com salina ou droga, antes e depois do condicionamento (ANOVA one-way” seguida do teste de DUNCAN para a análise dos efeitos da SP e test *t* de Student para a análise dos efeitos da SCBZ). N=08 animais para os grupos SAL, SCBZ e SP 25 ng, N=06 animais para o grupo de SP 50 ng e N=07 animais para o grupo SP 100 ng. *P <0.05, **P <0.01)

4. Experimento III

Nossos resultados demonstram que a SCBZ, bem como a SP, quando administradas diretamente na MCPD de ratos submetidos ao teste do LCE, causam efeitos ansiogênicos. Os efeitos da SP foram dependentes da dose injetada.

A figura 8 ilustra o efeito das microinjeções de SCBZ e SP sobre a frequência de entrada nos braços fechados do LCE. O teste *t* de Student mostrou que a SCBZ não causou um efeito significativo sobre esse parâmetro (P>0.05).

Porém, com relação ao tratamento com SP, a ANOVA revelou um efeito significativo sobre a frequência de entradas nos braços fechados do labirinto ($F_{3,3}=2,99$, $P < 0,05$). A análise *post-hoc*, através do teste de Duncan, mostrou que esse efeito foi causado pela dose de 25 ng de SP ($P < 0,05$).

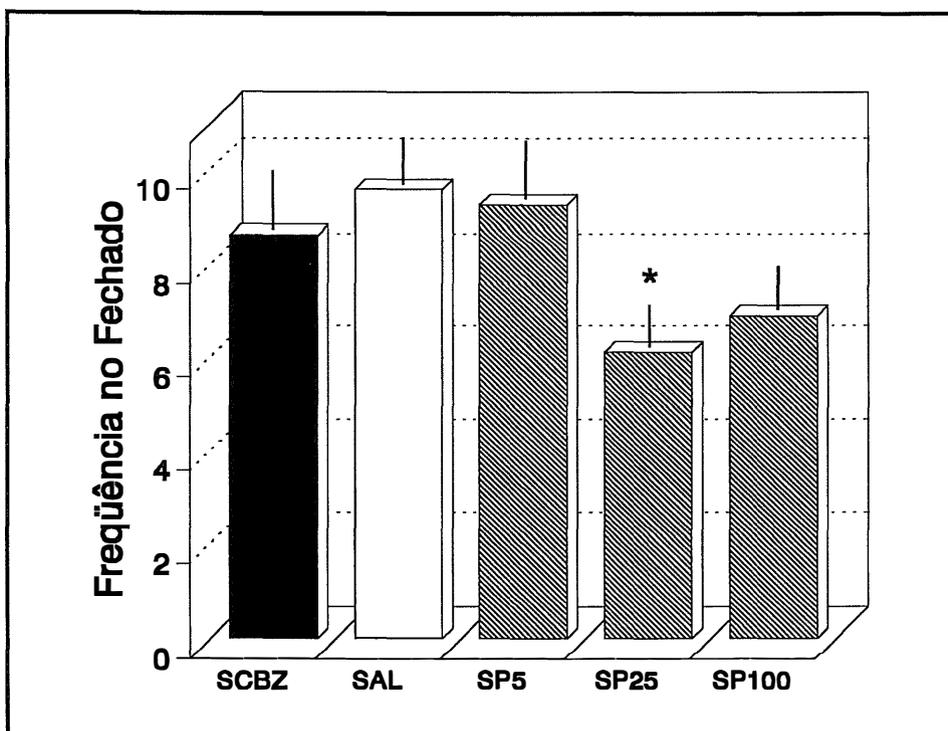


FIG. 8. Efeitos da microinjeção de salina (SAL), semicarbazida (SCBZ- 6 μ g/0,2 μ l) e substância P (SP- 5, 25, 100ng/0,2 μ l) na MCPD sobre a frequência de entradas nos braços fechados (média \pm EPM) do labirinto em cruz elevado (ANOVA “one-way” seguida do teste de DUNCAN para a análise dos efeitos da SP e teste *t* de Student para a análise dos efeitos da SCBZ). N=09 animais para os grupos de SAL e 25 ng de SP, N=08 animais para os grupos de SCBZ, 5 e 100 ng de SP. *P < 0.05.

Na figura 9 estão representados os resultados obtidos com microinjeções de SCBZ e SP sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas, e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo total do teste. O teste *t* de Student demonstrou um efeito

significativo da SCBZ tanto na porcentagem de entradas ($P < 0,05$) quanto na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($P < 0,05$). Através da ANOVA foi verificado um efeito significativo da SP sobre a porcentagem de entradas ($F_{3,30}=4,02$, $P < 0,05$) e sobre a porcentagem de tempo ($F_{3,30}=11,40$, $P < 0,01$), mais uma vez de forma dose-dependente. A análise *post-hoc* de Duncan revelou que o efeito significativo sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos foi devido à dose de 25 ng, que diferiu significativamente do grupo controle ($P < 0,05$). Com relação à porcentagem do tempo gasto nos braços abertos a análise *post-hoc* mostrou que o efeito ocorreu com as doses de 25 e 100 ng de SP ($P < 0,05$). A dose de 5 ng não produziu nenhum efeito significativo com relação ao controle ($P > 0,05$).

Devido ao fato de que a dose de 25 ng de SP causou uma diferença significativa na frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, foi feita uma análise de covariância, para a certificação de que esse efeito não foi devido a uma queda geral na atividade motora do animal. Os resultados obtidos foram os seguintes:

- Porcentagem de entradas covariado com frequência de entradas nos braços fechados: ($F_{3,29}=4,54$, $P < 0,01$). A análise *post-hoc* mostrou que houve uma diferença significativa das doses de 25 e 100 ng de SP com relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

- Frequência de entradas nos braços fechados covariado com % de entradas: ($F_{3,29}=3,50$, $P < 0,05$). A análise *post-hoc* revelou uma diferença significativa entre as doses de 25 e 100 ng de SP com relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

- Porcentagem de tempo covariado com frequência de entradas nos fechados: ($F_{3,29}=7,14$, $P < 0,01$). A análise *post-hoc* mostrou que esse efeito foi devido às doses de 25 e 100 ng de SP ($P < 0,05$).

- Frequência de entradas no fechado covariado com a % porcentagem de tempo: ($F_{3,29}=0,74$, $P > 0,05$). A análise *post-hoc* confirmou que não houve diferença significativa entre nenhum grupo ($P > 0,05$).

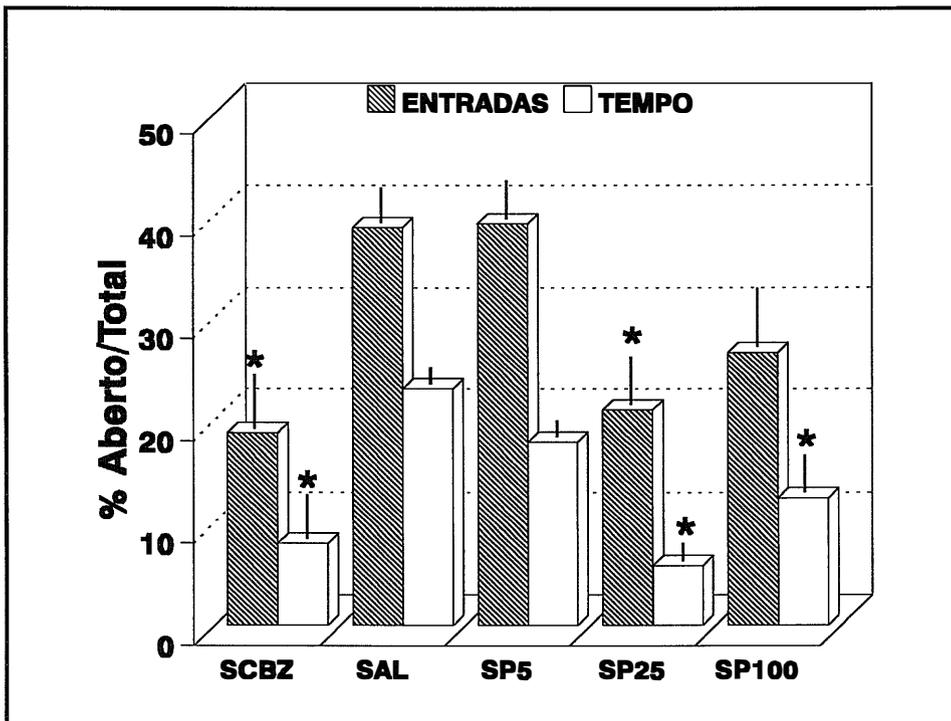
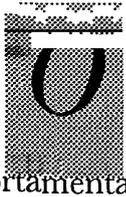


FIG. 9. Efeitos da administração de salina (SAL), semicarbazida (SCBZ- 6 μ g/0,2 μ l) e substância P (SP- 5, 25 e 100 ng/0,2 μ l) na MCPD sobre a porcentagem de entradas e tempo gasto (média \pm EPM) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (ANOVA seguida do teste de DUNCAN, para a análise dos efeitos da SP e test *t* de Student para a análise dos efeitos da SCBZ). *P <0.05.

DISCUSSÃO





s resultados obtidos neste trabalho mostram que microinjeções de SCBZ, diretamente na MCPD, induzem, após uma latência de cerca de 5 minutos, uma ativação comportamental caracterizada por posturas características de alerta, intercaladas por congelamento e muitas vezes corridas. Esses dados apóiam trabalhos anteriores que mostram que esta latência para o início dos efeitos e esse padrão comportamental de respostas produzido pela SCBZ são compatíveis com o bloqueio da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), a enzima responsável pela síntese de GABA (Killam & Bain, 1957; Yamashita & Hirata, 1978; Brandão *et al.*, 1986). A semicarbazida também produziu uma clara aversão condicionada ao lugar, efeito esse que já foi verificado por outros autores (DiScala & Sandner, 1989) utilizando o mesmo procedimento experimental. Estes dados sugerem que microinjeções de SCBZ na MCPD têm consequências aversivas para o animal, as quais são associadas a estímulos contextuais durante o condicionamento e que o bloqueio da neurotransmissão GABAérgica nesse sítio produz um estado aversivo que se reflete em um processo de aprendizagem associativa. Os resultados com a semicarbazida na arena e no teste de condicionamento ao lugar, obtidos no presente trabalho e associados a outros relatos na literatura, sustentam fortemente que neurônios na MCPD são tonicamente inibidos pelo GABA, ou seja, a desinibição desse processo resulta na experiência afetiva da aversão, com respostas comportamentais compatíveis com o comportamento defensivo ou a fuga.

É interessante notar que a SCBZ também foi capaz de causar um efeito ansiogênico, quando administrada na MCPD de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Nesse teste, a SCBZ diminuiu de forma significativa tanto a percentagem de entradas nos braços abertos do labirinto, como a percentagem de tempo que os animais dispensaram nesses braços. O fato de que essa droga não alterou a frequência de entrada nos braços fechados permite sugerir que a diminuição na percentagem de entrada e tempo gasto nos braços abertos tenha sido um efeito aversivo dessa droga, sem significar um efeito sobre a atividade locomotora. Analisados em conjunto, os efeitos da semicarbazida

reproduzem em boa medida os resultados de estudos anteriormente realizados neste e em outros laboratórios, validando as condições experimentais nas quais os testes do presente estudo foram realizados, ao mesmo tempo que permite o uso, conforme o planejado, da semicarbazida como referencial para a análise dos efeitos das microinjeções de substância P na MCPD.

Vários relatos mostram que a administração por via intracerebroventricular de substância P, bem como a administração local em determinadas estruturas do SNC, como a área tegmental ventral(ATV), produzem um aumento significativo na frequência de respostas como locomoção, limpeza e coçar (Eison & Iversen, 1981; Elliot & Iversen, 1986), que são respostas motoras comumente relacionadas a situações estressantes e/ou de ansiedade. Essas respostas comportamentais produzidas pela substância P têm sido associadas com a ativação de vias nociceptivas no SNC (Share & Rackham, 1981), uma vez que analgésicos narcóticos, como o sulfato de morfina, são capaz de antagonizar essas respostas e que a naloxona reverte essa ação da morfina ao mesmo tempo que potencia os efeitos da SP. No presente trabalho, microinjeções de substância P diretamente na MCPD causaram um padrão de respostas comportamentais similares a estes, isto é, foi observado um aumento significativo no número de respostas tais como o levantar e locomover, com microinjeções de 25 ng de SP, bem como na resposta de limpeza. Este último efeito pareceu ser específico da substância P, uma vez que foi observado com todas as doses utilizadas de substância P e não foi induzido com SCBZ.

Foi observado também que a substância P causou um claro condicionamento ao lugar, sendo que esse efeito foi observado com microinjeções de 25 ng. Estudos prévios já mostraram que o agonista sintético de substância P, o DIMETIL-C7, administrado por via intracerebroventricular, também produz uma aversão condicionada ao lugar (Elliot, 1988). O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que microinjeções da própria substância P administrada diretamente em uma estrutura do SCA de ratos, no caso a MCPD, também é capaz de causar esse efeito. Sabe-se que uma das principais características do DIMETIL-C7, é seu efeito prolongado no SNC (Eison & Iversen, 1981). Levando em consideração as

discussões acerca do rápido efeito da substância P no SNC (Shults *et al.*, 1984), os resultados por nós obtidos com o teste do condicionamento ao lugar são relevantes por demonstrarem que independente do tempo de atuação dessa substância nas vias neuronais da aversão na MCPD ele é o suficiente para causar um pareamento aversivo através de um processo de aprendizagem associativa com dicas ambientais, similar àquele causado por uma droga que possui um efeito classicamente aversivo e prolongado, como é o caso da SCBZ. Os resultados obtidos com a administração de substância P na MCPD de ratos submetidos ao teste do LCE mostram um efeito ansiogênico, dessa vez com microinjeções de 25 e 100 ng. Esses efeitos foram mais pronunciados com a dose de 25 ng e foram caracterizados pela diminuição significativa da frequência relativa e do tempo relativo dispensados nos braços abertos desse aparato.

A escolha do número de entrada nos braços fechados, neste estudo, ao invés do tradicional número total de entradas, deve-se a recentes estudos que demonstram que essa medida geralmente apresenta um peso alto e exclusivo no fator associado com a exploração, constituindo-se assim em um parâmetro mais indicado para avaliar o índice de atividade motora do animal no labirinto (File, 1992). Como a substância P promove efeitos consideráveis sobre a atividade locomotora, quando avaliada em outros testes, este parâmetro no LCE reverte-se de particular importância. Com relação ao presente trabalho, como já foi possível observar, os efeitos produzidos pela substância P, bem como pela SCBZ, foram claramente verificados exatamente com relação a percentagem de tempo e a percentagem na frequência de entradas nos braços abertos, que como já foi salientado é considerada a melhor medida para a ansiedade no labirinto. Como a frequência de entradas nos braços fechados foi significativamente reduzida com a dose 25 ng, foi realizada uma análise de covariância destes dados. Os resultados obtidos com essa análise revelaram que não houve uma correlação entre o número de entradas nos braços abertos com a frequência de entradas nos braços fechados. Assim, essa análise nos indica que os efeitos da substância P podem ser atribuídos à ação da droga sobre os estados motivacionais do medo e não sobre a atividade locomotora.

Foi observado que nos três testes utilizados neste trabalho, os efeitos da SP apareciam em uma faixa de dose que pareciam depender do comportamento estudado. Assim, verificou-se que a ativação comportamental, caracterizada pelo número de levantamentos e cruzamentos na arena ocorreu de forma significativa em relação ao grupo controle somente com a dose de 25 ng, não sendo observado um efeito com as outras duas utilizadas (50 e 100 ng), enquanto que para a resposta de limpeza as três doses utilizadas foram efetivas. No teste de condicionamento ao lugar o efeito aversivo foi observado com microinjeções de 25 e 50 ng de SP, não sendo observado nenhum efeito com a dose de 100 ng. Com relação ao teste do labirinto em cruz elevado, além das doses que estão utilizadas neste trabalho (5, 25 e 100 ng) também foram testadas as doses de 10 e 50 ng de SP, no entanto, pelo fato dos efeitos produzidos por essas duas doses terem sido bastante similares àqueles observados com as doses de 25 e 100 ng, as mesmas não foram incluídas neste estudo.

Com relação a diferença de efeitos entre as doses de SP que foram utilizadas nos presentes experimentos, cabe salientar que a mesma já foi verificada em estudos avaliando os efeitos da substância P sobre outros processos, como os mecanismos de memória e reforço, bem como nos mecanismos de regeneração celular. Dessa forma, nos estudos sobre aprendizagem e memória já foi observado que doses mais altas (370 nmol/kg) e doses mais baixas (3.7 nmol/kg) tanto de SP quanto de seus fragmentos N-terminal (SP1-7) e N-terminal (DIME-C7) não apresentam um efeito significativo sobre a retenção da aprendizagem de diversas tarefas comportamentais, como por exemplo o teste de esQUIVA inibitória da geotaxia negativa e o teste de preferência por lugar. Porém, doses intermediárias (37 nmol/kg e 185 nmol/kg) apresentam um efeito facilitador. Já em relação aos estudos sobre os efeitos da SP nos processos de reforço, o tratamento com 3.7 nmol ou 185 nmol/kg não tiveram nenhum efeito no teste de preferência por lugar, enquanto que 50 µg/kg de SP e a dose equimolar (0.74 pmol) de seu fragmento C-terminal (DIME-C7) causaram um efeito reforçador positivo nesse teste. Esse mesmo padrão de efeitos já foi observado em estudos sobre os efeitos neurotróficos

da SP, bem como em estudos que utilizaram injeções periféricas desse neuropeptídeo (para revisão ver Huston *et al.*, 1993).

Como podemos notar, os efeitos da SP em diversos processos no SNC parecem estar relacionados a uma determinada faixa de doses, demonstrando obedecer uma curva em U invertido, onde as doses intermediárias apresentam um maior efeito e as doses mais baixas e mais altas apresentam um efeito menor ou nenhum efeito. Neste trabalho não podemos falar sobre efeitos dose-dependentes, uma vez que o padrão de doses por nós utilizado não permite uma avaliação segura sobre isso, sendo necessário a utilização de outras doses para tanto. Contudo, para se ter uma idéia se esse mesmo padrão dose-resposta relatado em outros estudos da SP se mantém em relação aos seus efeitos na reação de defesa é necessário, sem dúvida, uma melhor padronização da faixa de doses, com a utilização de doses mais altas e mais baixas que estas aqui utilizadas.

Alguns fatores pelos quais essas diferenças de efeitos aparecem podem ser discutidos. Um desses fatores poderia ser o próprio fato das injeções terem sido administradas de forma intracerebral. É necessário levar em consideração que o raio de penetração da droga pode variar em alguns animais, bem como de uma dose para outra. Se isso acontece, pode-se supor que poderia haver o recrutamento de diferentes vias neurais e até mesmo de outros receptores que são utilizados por outros neurotransmissores, em outras estruturas vizinhas. Isso por si só já seria o suficiente para alterar o efeito da SP em relação aquele observado se a droga age apenas na região desejada. No caso do presente trabalho, como já foi citado na sessão de resultados, algumas microinjeções caíam na região do teto mesencefálico e camadas profundas do colículo superior. Por outro lado, sabe-se que o colículo superior, ao contrário da MCP, é rica em receptores para SP, enquanto esta é rica em corpos celulares para esse neuropeptídeo, sendo assim, os efeitos verificados em alguns animais poderiam ser fruto da estimulação de neurônios vizinhos à MCPD e não dessa estrutura em si. Ainda em relação ao sítio de ação da SP, poderia acontecer também dessa droga chegar até outras regiões da MCP, como a porção ventral, por exemplo, a qual possui propriedades analgésicas que poderiam

modificar os efeitos da SP. Uma forma de certificação a respeito disso é realizar testes com SP marcada, nas doses utilizadas e ver seu raio de espriamento.

Um outro motivo que poderia explicar as diferenças de efeitos são os diferentes testes utilizados, uma vez que os efeitos da droga pareceram obedecer a esse fator. O que poderia estar ocorrendo é que, dependendo do “componente motivacional do teste”, isto é, do que era requerido do animal, diferentes circuitos ou estruturas neurais poderiam estar sendo recrutadas, resultando em um menor ou maior efeito das diferentes doses. Além disso, o fator degradação da droga também pode ter influenciado nos efeitos, dependendo da dose administrada. É sabido que a SP é degradada por enzimas conhecidas pelo nome de endopeptidases, sendo que uma das principais dessas enzimas na degradação da SP é a chamada endopeptidase 24.11, que se encontra em várias regiões do SNC, possuindo uma grande afinidade por esse peptídeo e que atua hidrolizando a SP (para revisão ver Krause, 1985). Diversos trabalhos, *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que os efeitos da SP sobre determinadas respostas fisiológicas, como a salivação, por exemplo podem ser moduladas por enzimas degradantes (Lemberk *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1981 e 1982). Com relação aos presentes resultados, a forma como a SP é degradada no sítio de ação poderia estar influenciando nos efeitos da mesmas nos diferentes testes utilizados.

Levando em consideração todos esses fatores, podemos dizer que independente das características dos efeitos da SP, em relação as doses administradas, os resultados por nós obtidos são relevantes, uma vez que eles vão a favor de nosso objetivo fundamental que foi verificar um possível efeito desse neurotransmissor nas reações ditas de defesa. Sem dúvida, é fundamental que na continuidade de nossas investigações haja a preocupação com uma melhor padronização das doses a serem utilizadas, até mesmo porque o fato desta linha de pesquisa ser relativamente recente, não existe ainda um conhecimento acerca das doses mais efetivas da SP na modulação de tais reações e as doses utilizadas por nós terem sido bastante limitadas. Um dos cuidados será fazer uma correlação entre as doses efetivas de SP em outros fenômenos como a memória e a recuperação funcional. Uma outra medida a ser tomada é a utilização de agonistas e

antagonistas específicos dessa substância a fim de conhecermos melhor as características de ação da substância P nos mecanismos da reação de defesa, inclusive com relação a sua faixa de doses efetivas.

Algumas diferenças marcantes entre os efeitos produzidos pelas microinjeções de substância P e os efeitos produzidos pela SCBZ devem ser destacadas. Primeiro foi verificado que a SCBZ sempre apresentava uma latência de cerca de cinco minutos para começar a produzir seu efeito, o que já está bem descrito na literatura, e que é devido ao fato dessa droga atuar bloqueando a síntese de GABA no terminal nervoso e não competindo com seu receptor. Já está demonstrado que o tempo necessário para que a redução dos níveis de GABA decorrentes deste bloqueio produza efeitos comportamentais detectáveis se situa entre cinco e dez minutos, enquanto que os efeitos da substância P podem ser observados poucos segundos após a administração, sugerindo uma provável ação direta desse neuropeptídeo em receptores específicos. Além do mais, as características das respostas aversivas produzidas pela SCBZ não foram as mesmas verificadas pela ação da substância P, uma vez que com a SCBZ o aumento da atividade locomotora sempre se intercalava com períodos de congelamento e, em alguns animais, causava corridas desenfreadas similares àquelas observadas com bicuculina (Brandão *et al.*, 1988), um antagonista direto de receptores GABAérgicos, havendo inclusive alguns casos de animais que apresentavam convulsões. Por outro lado, como já foi citado, a resposta de limpeza era bastante pronunciada com a administração de substância P e confundia-se, em alguns momentos, com o comportamento de arranhar ou coçar, caracterizado principalmente pelo uso das patas traseiras na região do abdômen. Neste sentido, um relato interessante na literatura descreve um padrão comportamental semelhante, após microinjeção de substância P por via intracerebroventricular, em camundongos. Nesse trabalho os autores verificaram que a ativação comportamental induzida por substância P, e que foi caracterizada principalmente por respostas de autolimpeza e de coçar, foi antagonizada por morfina e potencializada por naloxona (Share & Rackman, 1981). É interessante observar

que a limpeza, em quantidade excessiva, tem sido relacionada com estados aversivos, possivelmente envolvidos com a ansiedade (Mood *et al.*, 1988).

As diferenças entre os efeitos causados por microinjeções de SCBZ e SP nos levam a supor que os efeitos desta última nos processos aversivos estejam ocorrendo por outros mecanismos que não aqueles mediados pelo GABA na MCPD. As características de efeitos da SP, os quais apareciam imediatamente após a administração da droga, podem ser um indício de uma ação direta desse neuropeptídeo em receptores específicos na região da MCPD. Podemos sugerir, portanto, que esses efeitos observados por nós tenham se dado através da ação da SP em determinados receptores taquicinérgicos, pelos quais ela tenha afinidade. Como já foi falado a respeito, sabe-se hoje que as taquicinininas de uma forma geral exercem suas múltiplas funções por meio da ativação de pelo menos quatro tipos de receptores: NK-1, NK-2, NK-3 e NK-4, sendo que a SP possui melhor afinidade por receptores do tipo NK-1. Vale salientar que muito pouco é conhecido sobre a relevância fisiológica desses subtipos de receptores no SNC, uma vez que agonistas e antagonistas com alta afinidade para os mesmos apenas começam ser avaliados, além do mais não parece haver uma correlação entre a densidade de inervação da SP e a densidade de sítios de ligação desse peptídeo no SNC (Huston *et al.*, 1993). No entanto, dados recentes da literatura mostram que as taquicinininas, e entre elas a SP, parecem desempenhar um papel modulador da ansiedade, quando avaliada no teste do labirinto em cruz elevado, através de receptores do tipo NK-1, NK-2 e NK-3. Assim, injeções ICV, em camundongos, de agonistas e antagonistas específicos para tais receptores, mostraram que a SP e outras taquicinininas que têm afinidade por receptores NK-1 e NK-2 causam um efeito ansiogênico nesse modelo de ansiedade, enquanto que taquicinininas que têm afinidade por receptores do tipo NK-3 causaram um efeito ansiolítico (Teixeira *et al.*, 1995).

No entanto, se levarmos em consideração a complexidade de ação da SP e a quantidade relativamente pobre de receptores para ela na estrutura cerebral estudada, é mais provável supor que esse neuropeptídeo esteja exercendo sua ação através de uma interação com outros sistemas de neurotransmissão na MCPD

e/ou em outras estruturas a ela relacionadas. Existe um amplo corpo de evidências na literatura que nos levam sugerir que os efeitos verificados por nós com microinjeções de SP na MCPD pode estar sendo mediado através do sistema de nocicepção nessa região do cérebro. Como já foi discutido, é bastante amplo o número de trabalhos mostrando que a substância P pode atuar tanto como neurotransmissor quanto como neuromodulador nos processos sensoriais do SNC dos mamíferos (Höckfelt *et al.*, 1975a, 1975b), especialmente em vias nociceptivas (Henry, 1976; Andersen *et al.*, 1978; Sastry, 1979; Yaksh *et al.*, 1979), sendo que foram observados tanto efeitos analgésicos (Stewart *et al.*, 1976; Fredrickson *et al.*, 1978; Malick & Goldstein, 1978; Mohrland & Gebhart, 1979), como hiperalgésicos (Fredrickson *et al.*, 1978) com esta substância. Vários trabalhos já demonstraram que a substância P pode atuar nos processos nociceptivos, ao nível das fibras sensoriais, particularmente as fibras C, as quais transportam a informação dolorosa para a raiz dorsal da medula espinhal (para revisão ver Nicoll *et al.*, 1980).

É possível sugerir que os efeitos por nós observados com microinjeções de substância P diretamente na MCPD sejam devidos a ativação de processos nociceptivos nessa estrutura, uma vez que ela recebe colaterais de vias nociceptivas ascendentes (Mehler, 1966), bem como possui neurônios contendo substância P (Nieuwenhuys, 1985). Por outro lado, existem várias evidências de que os efeitos da substância P nos processos nociceptivos podem ser modulados por mecanismos opióides endógenos. Assim, alguns autores já demonstraram que a liberação de substância P, induzida por potássio em fatias do núcleo trigeminal, foi reduzida por peptídeos opióides, bem como por opióides sintéticos, como a morfina, e que esse bloqueio foi prevenido por naloxona (Jessel & Iversen, 1977). Mudge *et al.* (1979) também demonstraram que a encefalina inibe a liberação de SP em culturas de neurônios sensoriais. Além disso, estudos mais antigos já mostraram, por meio da técnica de iontonforese, que a encefalina, bem como opióides sintéticos, como a morfina, bloqueiam a ativação de neurônios das lâminas IV e V, exclusivamente através de estímulos nocivos, sendo esse efeito também revertido pela naloxona (Dungan *et al.*, 1976).

Trabalhos mais recentes, entretanto, têm mostrado que a substância P está envolvida em respostas típicas de defesa ao nível da própria MCPD, onde as encefalinas cumprem um papel inibitório. Assim, trabalhos apresentados por Siegel e colaboradores (Fuchs *et al.*, 1985; Shaikh *et al.*, 1991; Shaikh *et al.*, 1993; Shaikh & Siegel, 1994), envolvendo estudos comportamentais, neuroquímicos e neuroanatômicos têm mostrado que em duas das mais típicas respostas de defesa no gato, a raiva defensiva e o ataque predatório (mordida silenciosa), a substância P é um dos neurotransmissores envolvidos na mediação.

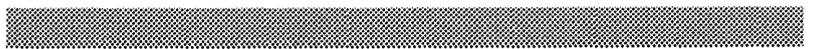
Através de uma série de trabalhos estes autores observaram que ao nível do SCA, principalmente nas conexões entre MCPD, HM e AM, respostas típicas de reação de defesa, no gato, são elicadas via mecanismos de aminoácidos excitatórios, opióides endógenos e substância P. Em primeiro lugar eles demonstraram que o hipotálamo e a matéria cinzenta periqueductal (na sua porção rostral) cumprem um papel fundamental na expressão do comportamento de raiva defensiva, através das informações recebidas da amígdala, a qual por si só não elicia essa resposta. Neste contexto, a amígdala estaria cumprindo um papel modulador nesses processos, enviando à matéria cinzenta periaqueductal e ao hipotálamo as mensagens sobre como estas estruturas deveriam mediar essa resposta, segundo a necessidade do organismo em perigo. Analisando os resultados de Siegel e colaboradores, em seu conjunto, é possível supor que no rato ocorram mecanismos similares, uma vez que é sabido que ele também possui substratos neurais relacionados ao SCA envolvidos no ataque predatório caracterizados por mordidas no outro animal, principalmente com animais da mesma espécie (Blanchard & Blanchard, 1988). É provável que os efeitos da substância P verificados no presente trabalho envolvam mecanismos da raiva defensiva, como proposto por Siegel e colaboradores. Segundo estes autores, este comportamento é caracterizado principalmente pelos aspectos ditos afetivos da defesa, com respostas fisiológicas tais como piloereção, dilatação pupilar, comportamento de cheirar, micção e defecação, bem como respostas cardiovasculares, acompanhadas de tentativa de fuga, não envolvendo um ataque propriamente dito, e é mediado por mecanismos que envolvem a substância P e o sistema de opióides endógenos, ao nível do SCA (Shaikh *et al.*, 1987). Assim, a

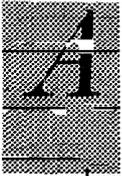
substância P, quando injetada diretamente na MCPD, rica em neurônios contendo este neuropeptídeo, ativaria os mecanismos que normalmente são regulados pelas encefalinas nas vias de conexões desta estrutura com a amígdala. Um desequilíbrio nestes processos auto-regulados seria responsável pelos efeitos pró-aversivos induzidos pela microinjeção de SP na MCPD. Para testar essa hipótese é necessário realizar no rato experimentos envolvendo as três estruturas básicas do SCA, à luz da hipótese de Siegel e colaboradores. Esse seria, sem dúvida um dos primeiros passos para se buscar maior clareza sobre os mecanismos neurais nos quais a substância P participa, de forma a produzir os efeitos aversivos observados nos testes utilizados neste estudo. Cabe salientar que uma outra preocupação na continuação deste trabalho é com relação à identificação dos segmentos ativos da molécula de substância P responsáveis pelos efeitos aqui relatados, uma vez que tem sido observado que diversos efeitos produzidos por este neuropeptídeo são dependentes de sua estrutura molecular, parecendo estarem codificados em fragmentos específicos dessa molécula, como é o caso dos mecanismos de aprendizagem e memória, o comportamento motor e a regeneração celular. Assim, tem sido verificado que os efeitos da substância P sobre o comportamento motor, via mediação dopaminérgica, se dá através de seu fragmento C-terminal (DIMETIL-C7), enquanto que os efeitos sobre a aprendizagem e memória, os processos de reforço, bem como os processos de regeneração celular são mediados pelo seu fragmento N-terminal (SP1-7). É interessante notar que o efeito da substância P sobre a aversão já foi observado com a administração, por via intracerebroventricular, de seu agonista sintético, o DIMETIL-C7, que representa sua porção C-terminal (para revisão ver Huston *et al.*, 1993), portanto existe a necessidade de se verificar se a atividade específica das diferentes sequências de aminoácidos da SP na reação de defesa obedece uma lógica com aquelas observadas para outros mecanismos nos quais a SP está envolvida.

Finalmente, através de nossos resultados, podemos sugerir que além do controle inibitório que é conhecidamente realizado pelo GABA, a mediação realizada pelos aminoácidos excitatórios, a 5-HT e peptídeos opióides endógenos na MCPD, neurônios contendo substância P nessa estrutura também podem estar

envolvidos na integração dos estados aversivos no SCA, sugerindo, por extensão, uma participação desse neuropeptídeo nos mecanismos neurais que regulam a expressão do medo e/ou ansiedade.

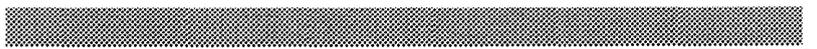
RESUMO

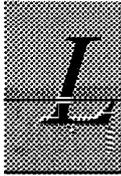


 participação dos neuropeptídeos na geração de estados aversivos no sistema nervoso central (SNC), até o momento, tem sido muito pouco investigada. No presente trabalho foram investigados os efeitos produzidos por microinjeções do neuropeptídeo substância P (SP) em uma das estruturas mais relevantes do sistema cerebral aversivo (SCA), a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), com o objetivo de contribuir com um maior conhecimento acerca do papel da SP na neurobiologia do comportamento defensivo integrado na MCPD. Esta investigação foi realizada através da análise das respostas comportamentais de ratos em uma arena, após a microinjeção de SP na MCPD, e as respostas aversivas no contexto motivacional foram avaliadas no teste de condicionamento aversivo ao lugar, bem como em um modelo animal de ansiedade, amplamente utilizado em laboratórios de Psicobiologia, o labirinto em cruz elevado. Além da SP, foi utilizada a semicarbazida (SCBZ), um bloqueador da síntese GABAérgica, com o objetivo de comparar os efeitos conhecidamente aversivos desta droga com aqueles obtidos através de microinjeções de SP. Nossos resultados mostram que os animais observados na arena apresentaram uma clara ativação comportamental, caracterizada pelo alto índice de respostas de levantar e locomover, com microinjeção de SCBZ e 25 ng de SP, além de uma grande quantidade de episódios de limpeza, no caso da SP. No teste de condicionamento ao lugar, foi verificado que tanto a SCBZ quanto a SP induziram uma forte aversão condicionada ao lugar, sugerindo um efeito aversivo dessas drogas. No labirinto em cruz elevado as microinjeções de SCBZ e SP causaram um efeito ansiogênico, que foi caracterizado pela diminuição significativa da porcentagem do número de entradas nos braços abertos do labirinto e da porcentagem no tempo dispensado nesses braços em relação ao total de entradas e tempo total do teste. Esses resultados confirmam relatos prévios na literatura mostrando que a SCBZ injetada na MCPD causa efeitos aversivos, provavelmente através da redução dos mecanismos inibitórios tônicos exercidos pelo GABA sobre os substratos neurais da aversão. Um padrão similar de respostas comportamentais foram observados após as microinjeções de SP na MCPD. Os efeitos ansiogênicos da SP ocorreram com as microinjeções de 25 e 100 ng de SP, sendo mais pronunciados com a dose de 25

ng. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que além do controle inibitório que é conhecidamente realizado pelo GABA, a mediação realizada pela 5-HT, os aminoácidos excitatórios e peptídeos opióides endógenos na MCPD, neurônios contendo SP nessa estrutura também podem estar envolvidos na integração dos estados aversivos no SCA, sugerindo, assim, uma participação da SP nos mecanismos neurais que regulam a expressão do medo e/ou ansiedade.

ABSTRACT





ittle is know about the participation of neuropeptides in the generation of aversive states in the brain aversion system. In order to contribute to this area of inquiry, semicarbazide, a glutamic acid decarboxylase inhibitor, and substance P (SP), an active neuropeptide, were injected into the DPAG and their effects evaluated in rats placed inside a circular arena, in the conditioned place aversion test and in the elevated plus maze test. The results show that microinjections of semicarbazide into the DPAG, following a latency of 5-10 min, induce a behavioral activation characterized by locomotion, rearings, attentive postures, freezing and running. These data support previous studies that suggest that this pattern of behavioral responses to semicarbazide is due to the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD), the enzyme responsible for the synthesis of GABA. This drug also produced a clear conditioned place aversion, which suggests that the blockade of GABA neurotransmission in the DPAG produces an aversive state whichs support associative learning. In the elevated plus maze test, microinjections of semicarbazide into the DPAG caused a significant decrease in the percent of entries and the percent of time spent in the open arms, suggesting an anxiogenic effect of this drug. Taken together, these data are consistent with the view that the DPAG neurons are tonically inhibited by GABA, and that disinhibition results in both the affective experience of aversion and the behavioral responses compatible with escape behavior. Intraventricular microinjections or local injections of SP into particular regions of the brain, including the ventral mesencephalon, have been found to increase locomotion, grooming and scratching that have been associated with the activation of nociceptive pathways within the central nervous system. Local injections of SP into the DPAG caused a similar pattern of behavioral responses in rats observed in a circular arena. it is likely that these effects result from the activation of nociceptive processes in the DPAG, as this structure receives collaterals from ascending pain pathways. Previous studies have shown the ability of intraventricular administration of a SP agonist, the DIMETHIL-C7, to produce place aversion. The present work demonstrates for the first time that microinjections of SP into

the DPAG caused a clear place aversion. In the elevated plus maze test, the microinjections of SP in the DPAG caused a significant reduction in the percent of entries and in the percent of time spent in the open arms, suggesting an anxiogenic effect of this drug. The results obtained in this work, suggest that besides GABA, 5-HT, excitatory aminoacids and endogenous opioid peptides, substance P neurons may also be involved in the overall expression of aversive states in the DPAG.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**



- ABRAHAMAS, V. C., HILTON, S. M. & ZBROZYNA, A. W. (1960) Active muscle vasodilatation produced of the brain stem and its significance in the defense reaction. *Journal of Physiology*, 154: 491-513.
- ACHER, R. (1981) Evolution of neuropeptides. *Trends in Neurosciences*, 4: 225-229.
- ADAMS, D. B. (1979) Brain mechanisms for offense, defense and submission. *The Behavioral and Brain Sciences*, 2: 201-241.
- ADAMS, D. B. (1968) The activity of single cells in the midbrain and hypothalamus of the cat during affective defense behavior. *Archives of Italian Biology*, 106: 243-269.
- AGUIAR, M. S. & TOMAZ, C. (1990) Enhanced habituation produced by post-trial peripheral injection of substance P. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 3, 28: 204-206.
- ANDERSEN, R. K., LUND, J. P. & PULL, E. (1978) Enkephalin and substance P effects related to trigeminal pain. *Canadian Journal of Physiological Pharmacology*, 56: 216-222.
- ANDERSON, D. J., HANNAN, A. C & MATTHEWS, B. (1970) Sensory mechanisms in mammalian teeth and their supporting structures. *Physiology Review*, 50: 171-195.
- AMANO, K. T., ISEKI, I., KAWABATAKE, H., NOTANI, M., KAWAMURA, H. & KITAMURA, K. (1978) Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum (rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief). *Applied Neurophysiology*, 41: 66-78.
- ARCHER, J. (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behaviour*, 21: 305-235.
- AZEVEDO, A. D. (1987) Role of hypothalamus in the regulation of blood pressure: the defense reaction. Em: M. L. Brandão (Ed.), *Neuroscience & Behavior*. Vitória: Gráfica da UFES, pp. 263-296.
- BANDLER, R., CARRIVE, P. & DEPAULIS, A. (1991) Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 1-8.
- BANDLER, R., CARRIVE, P. (1988) Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. *Brain Research*, 439: 95-106.

- BANDLER, R. (1982) Induction of rage following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. *Neuroscience Letters*, 30: 183-188.
- BANDLER, R. & DEPAULIS, A. (1991) Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 175-198.
- BANDLER, R., DEPAULIS, A. & VERGNES, M. (1985) Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behavioural Brain Research*, 15: 107-119.
- BARD, D. P. (1928) A diencephalic mechanisms for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology*, 84: 490-515.
- BASBAUM, A. I. & FIELDS, H. L. (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 7: 309-338.
- BECKSTEAD, R. M. (1979) Autoradiographic examination of cortical and subcortical projection (prefrontal) cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 184: 43-62.
- BEITZ, A. J. (1985) The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *Journal of Comparative Neurology*, 237: 445-459.
- BEITZ, A. J. (1982) The organization of diferente projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 7: 133-159.
- BLANCHARD, D. C., WILLIAMS, G., LEE, E. M. C. & BLANCHARD, R. J. (1981) Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Journal of Physiological Psychology*, 9: 157-163.
- BLANCHARD, D. C. & BLANCHARD, R. J. (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39: 43-68.
- BRAESTRUP, C. & NIELSEN, M. (1980) Benzodiazepine receptor. *Research*, 30: 852-857.
- BRAESTRUP, C., ALBECHTSEN, R. & SQUIRES, R. F. (1977). High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*, 269: 702-704.

- BRANDÃO, M. L., De AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. (1982) Mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 16: 397-402.
- BRANDÃO, M. L., CARDOSO, S. H., MELO, L. L., MOTTA, V. & COIMBRA, N. C. (1994) Neural Substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 3,18: 339-346.
- BRANDÃO, M. L. (1993) Involvement of opioid mechanisms in the dorsal periaqueductal gray in drug abuse. *Reviews in Neurosciences*, 4: 397-405.
- BRANDÃO, M. L., DiSCALA, G., BOUCHET, M. J. & SCHMITT, P. (1986) Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxilase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 24: 497-502.
- BRANDÃO, M. L., TOMAZ, C., COIMBRA, N. C. & BAGRI, A. (1988) Defense reaction induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*, 44: 361-365.
- BRANDÃO, M. L., CARDOSO, S. H. & MELO, L.L. (1993) Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, 58: 49-55.
- BRUTUS, M., SHAIKH, M. B. & SIEGEL, A. (1985) Differential control of hypothalamically elicited flight behavior by the midbrain periaqueductal gray in the cat. *Behavioural Brain Research*, 17: 235-244.
- CANNON, W. B. (1927) The James-Lange theory of emotion: a critical examination and an alternative theory. *American Journal of Psychology*, 39: 10-124.
- CARDOSO, S. H., BRANDÃO, M. L. & COIMBRA, N. C. (1994) Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, 63: 17-24.
- CARRIVE, P. (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research*, 58: 27-47.
- CHANG, M. M. & LEEMAN, S. E. (1970) Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *Journal of Biological Chemistry*, 245: 4784-4790.
- CHAPMAN, W. P., SCHROEDER, H. R., GEYER, G., BRAZIER, M. A. B., FAGER, C., POPPEN, J. L., SOLOMON, H. C. & YAKLOVEV, P. I. (1954) Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid

nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science*, 120: 849-850.

CHI, C. C. (1970) An experimental silver study of the ascending projections of the central gray substance and adjacent tegmentum in the rat with observations in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 139: 259-272.

COIMBRA, N. C., TOMAZ, C. & BRANDÃO, M. L. (1992) Evidence for involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical and chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behavioural Brain Research*, 50: 77-83.

CUELLO, A. C. (1987). Peptides as neuromodulators in primary sensory neurons. *Neuropharmacology*, 26: 971-979.

CUELLO, A. C., PRIESTLEY, J. V. & PAXINOS, G. (1985) Substance P and enkephalin containing pathways. In: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System, Vol. 1: Forebrain and Midbrain*. Sydney: Academic Press, pp. 440-469.

CUELLO, A. C. & KANAZAWA, I. (1978) The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 178: 129-156.

DARWIN, C. (reeditado em 1965) *The Expression of Emotions in Man and Animals*. Chicago & London: The University of Chicago Press.

DAVIS, M. (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Reviews in Neuroscience*, 15: 353-375.

DE MOLINA, A. F. & HUNSPERGER, R. W. (1962) Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in the cat. *Journal of Physiology*, 160: 200-213.

DE MOLINA, A. F. & HUNSPERGER, R. W. (1959) Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *Journal of Physiology*, 145: 251-265.

DELGADO, J. M. R. (1955) Cerebral structures involved in transmission and elaboration of noxious stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 18: 261-275.

DELGADO, J. M. R., ROBERTS, W. W. & MILNER, N. E. (1954) Learning motivated by electrical stimulation of the brain. *American Journal of Physiology*, 179: 587-593.

- DEPAULIS, A. & VERGNES, M. (1986) Elicitation of intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of picrotoxin, a GABA antagonist, into the midbrain periaqueductal gray matter. *Brain Research*, 367: 87-95.
- DEPAULIS, A., KEAY, K. A. & BANDLER, R. (1992) Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray regions of the rat. *Experimental Brain Research*, 90: 307-318.
- DEPAULIS, A., BANDLER, R. & VERGNES, M. (1989) Characterization of pretentorial periaqueductal gray neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. *Brain Research*, 486: 121-132.
- DESTRADE, C. & JAFFARD, R. (1978) Post-trial hippocampal and lateral hypothalamic electrical stimulation. *Behavioral Biology*, 22: 354-374.
- DiSCALA, G. & SANDNER, G. (1989) Conditioned place aversion produced by microinjections of semicarbazide into the periaqueductal gray of the rat. *Brain Research*, 483: 91-97.
- DiSCALA, G., SCHMITT, P. & KARLI, P. (1984) Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Research*, 309: 199-208.
- DUGGAN, A. W., HALL, J. G. & HEADLEY, P. M. (1976) Morphine, enkephalin, and the substantia gelatinosa. *Nature*, 264: 456-458.
- EIPPER, B. A., MAINS, R. E. & HERBERT, E. (1986) Peptides in the nervous system. *Trends in Neurosciences*: 463-468.
- EISON, A. S. & IVERSEN, S. D. (1981) Substance P analog, DIMETHYL-C7: Evidence for stability in rat brain and prolonged central actions. *Science*, 215: 188-190.
- ELLIOTT, J. P. & IVERSEN, S. D. (1986) Behavioural effects of tachykinins and related peptides. *Brain Research*, 381: 68-76.
- ELLIOTT, J. P. & IVERSEN, S. D. (1987) Substance P antagonists: effect on spontaneous and drug induced locomotor activity in the rat. *Neuropharmacology*, 26: 419-422.
- ELLIOTT, J. P. (1988) Place aversion induced by the substance P analogue, dimethyl-C7, is not state dependent: implication of substance P in aversion. *Experimental Brain Research*, 73: 354-356.

- ENDO, S., YOKOSAWA, H. & ISHII, S. (1989a) Degradation of substance P by neuronal and glial cells cultured from rat fetal brain and their membranes. *Neuropeptides*, 14: 31-37.
- ENDO, S., YOKOSAWA, H. & ISHII, S. (1989b) Involvement of endopeptidase-24.11 in degradation of substance P by glioma cells. *Neuropeptides*, 14: 177-184.
- ERSPAMER, V. (1981) The tachykinin peptide family. *Trends in Neurosciences*, 4: 267-269.
- ERSPAMER, V., MELCHIORRI, P. ERSPAMER, C. F. & NEGRI, L. (1978) *Advanced Experimental Medical Biology*, 106: 51-64.
- FANSELOW, M. S. (1980) Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Sciences*, 15: 177-182.
- FANSELOW, M. S. (1991) The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 151-173.
- FILE, S. E. (1992) Behavioural detection of anxiolytic action. In: J. M. Elliot, D. J. Heal and C. A. Marsden (Eds.), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. London: John Wiley & Sons Ltd., pp. 25-44.
- FREDRICKSON, C. A., BURGIS, V., HARREL, C. E. & EDWARDS, J. D. (1978) Dual actions of substance P on nociception: possible role of endogenous opioids. *Science*, 199: 1359-1361.
- FUCHS, S. A. G., DALSSASS, M., SIEGEL, H. E. & SIEGEL, A. (1981) The neural pathways mediating quiet biting attack behavior from the hypothalamus in the cat: a functional autoradiographic study. *Aggressive Behavior*, 7: 51-68.
- FUCHS, S. A. G. & SIEGEL, A. (1984) Neural pathways mediating hypothalamically-elicited flight behavior in the cat. *Brain Research*, 306: 263-
- FUCHS, S. A. G., EDINGER, H. M. & SIEGEL, A. (1985) The organization of the hypothalamic pathways mediating affective defense behavior in the cat. *Brain Research*, 330: 77-92.
- GERHARDT, P., HASENÖHRL, R. U., HOCK, F. J. & HUSTON, J. P. (1993) Mnemogenic effects of injecting Ra-octil, an ACE-inhibitor derivate, systemically or into the basal forebrain. *Psychopharmacology*, 111: 442-448.

- GERHARDT, P., HASENÖHRL, R. U. & HUSTON, J. P. (1992) Enhanced learning produced by injection of neurokinin substance P into the region of the nucleus basalis magnocellularis: mediation by the N-terminal sequence. *Experimental Neurology*, 118: 302-308.
- GRAEFF, F. G. (1981) Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 14: 239-265.
- GRAEFF, F. G. (1988) Animals models of aversion. In: B. SIMON, P. SOUBRIÉ & D. WILDLOCHE (Eds.), *Animals Models of Psychiatric Disorders. Selected Models of Anxiety, Depression and Psychosis*. Basel: Karger, PP. 115-141.
- GRAEFF, F. G. (1990) Brain defense systems and anxiety. In: M. ROTH, G. D. BURROWS & R. NOYES (Eds.), *Handbook of Anxiety, vol. 3*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, PP. 307-354.
- GRAEFF, F. G. (1994) Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 811-829.
- GRAY, J. A. (1982a) Précis of the neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *The Behavioral and Brain Sciences*, 5: 469-534.
- GRAY, J. A. (1982b) *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. New York: Oxford University Press.
- GRAY, J. A. (1987) *The Psychology of fear and stress*. Cambridge: Cambridge University Press.
- GROWCOTT, J. W., JAMIESON, A., TARPEY, A. V. & TOPHAM, L. D. (1983) *European Journal of Pharmacology*, 86: 59.
- HALL, M. E., GRANTHAM, P., LIMOLI, J., STEWART, J. M. (1987) Effects of substance P and neurokinin A (substance K) on motor behavior: unique effect of substance P attributable to its amino-terminal sequence. *Brain Research*, 420: 82-94.
- HALL, C. S. (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defaecation and urination as measures of individuals differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18: 385-403.

- HALL, C. S. (1936) Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory behavior. *Journal of Comparative Psychology*, 22: 345-352.
- HAMILTON, B. L. (1973) Projections of the nuclei of the periaqueductal gray matter in the cat. *Journal of the Comparative Neurology*, 152: 45-58.
- HANDLEY, S. L. & MITHANI, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327: 1-5.
- HARDY, S. G. P. & LEICHNETZ, G. R. (1981) Frontal cortical projections to the periaqueductal gray in the rat: a retrograde and orthograde horseradish peroxidase study. *Neuroscience Letters*, 23: 13-17.
- HASENÖHRL, R. U., GEHARDT, P. & HUSTON, J. P. (1992) Positively reinforcing effects of the neurokinin substance P in the basal forebrain: mediation by its C-terminal sequence. *Experimental Neurology*, 115: 282-291.
- HASENÖHRL, R. U., HUSTON, J. P. & SCHUURMAN T. (1990) Neuropeptide substance P improves water maze performance in aged rats. *Psychopharmacology*, 101: 23-26.
- HENRY, J. L. (1976) Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Research*, 114: 439-451.
- HESS, W. R. & BRÜGGER, M. (1943) Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. *Helvetica Physiologica Pharmacologica Acta*, 1: 33-52.
- APUD: HILTON, S. M. & ZBROZYNA, A. W. (1963) Amygdaloid region for defense reactions and its efferent pathways to the brain stem. *Journal of Physiology*, 165: 160-173.
- HILTON, S. M. & REDFERN, W. S. (1986) A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *Journal of Physiology*, 378: 213-228.
- HILTON, S. M. & ZBROZYNA, A. W. (1963) Amygdaloid region for defense reactions and its efferent pathways to the brain stem. *Journal of Physiology*, 165: 160-173.
- HILTON, S. M. (1982) The defense-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *Journal of Experimental Biology*, 100: 159-174.

- HITCHCOCK, J. & DAVIS, M. (1986) Lesions of the amygdala, but not the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behavioral Neuroscience*, 100: 11-22.
- HÖKFELT, T., ELFVIN, L. G., SCHULTZBERG, M., GOLDSTEIN, M. & NILSSON, G. (1977) On the occurrence of substance P-containing fibers in sympathetic ganglia: immunohistochemical evidence. *Brain Research*, 132: 29-41.
- HÖKFELT, T., KELLERTH, J., NILSSON, G. & PERNOW, B. (1975) Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Research*, 100: 235-252.
- HOLSTEGE, G. (1991) Descending pathways from the periaqueductal gray and adjacent areas. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 239-265.
- HUNSPERGER, R. W. (1956) Affektreaktionen auf elektrische reizung im hirnstem der katze. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta*, 14: 70-92.
- HUSTON, J. P. & STÄUBLI, U. (1978) Retrograde amnesia produced by post-trial injection of substance P into the substantia nigra. *Brain Research*, 159: 468-472.
- HUSTON, J. P. & STÄUBLI, U. (1979) Post-trial injection of substance P into lateral hypothalamus and amygdala, respectively, facilitates and impairs learning. *Behavioral and Neural Biology*, 27: 244-248.
- HUSTON, J. P., MUELLER, C. C. & MONDADORI, C. (1977) Memory facilitation by post-trial hypothalamic stimulation and other reinforcers: a central theory of reinforcement. *Biobehavioral Reviews*, 1: 143-150.
- HUSTON, J. P. & OITZL, M.-S. (1989) The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effect of the neuropeptide substance P. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 13: 171-180.
- HUSTON, J. P., HASENÖHRL, R. U., BOIX, F., GERHARDT, P. & SCHWARTING, R. K. W. (1993) Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity. *Psychopharmacology*, 112: 147-162.
- IVERSEN, L. L. (1989) Central actions of substance P and related tachykinins. *Journal of Psychopharmacology*, 3: 1-6.

- IVERSEN, L. L. (1984) Amino acids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous systems?. *Proceedings of Royal Society of London*, 21: 245-260.
- IVERSEN, L. L. (1983) Neuropeptides - What the Next?. *Trends in Neurosciences*, 6: 293-295.
- IVERSEN, L. L. (1987) Molecular biology of neuropeptides - Overview: peptides in the nervous system. In: A. J. Turner (Ed.), *Neuropeptides and their Peptidases (Ellis Horwood Series in Biomedicine)*. New York: VCH Publishers, pp. 3-8.
- IWASAKI, Y., KINOSHITA, M., IKEDA, K., TAKAMIYA, K. & SHIOJIMA, T. (1989) Trophic effect of various neuropeptides on the cultured ventral spinal cord of rat embryo. *Neuroscience Letters*, 101: 316-320.
- JACQUET, Y. F. & LAJTHA, A. (1973) Morphine action at central nervous system sites in rat. Analgesia or hyperanalgesia depending on site and dose. *Science*, 182: 490-492.
- JACQUET, Y. F. & LAJTHA, A. (1974) Paradoxical effects after microinjection of morphine in the periaqueductal gray matter in the rat. *Science*, 185: 1055-1057.
- JACQUET, Y. F. & WOLF, G. (1981) Morphine and ACTH (1-24): correlative excitations following microinjections in rat periaqueductal gray. *Brain Research*, 219: 214-218.
- JAMES, T. & STARR, M. S. (1979) Effects of substance P injected into the substantia nigra. *British Journal of Pharmacology*, 65: 423-429.
- JESSELL, T. M. & IVERSEN, L. L. (1977) Opiates analgesics inhibits Substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature (London)*, 268: 549-551.
- JESSELL, T. M. (1978) Substance P release from the substantia nigra. *Brain Research*, 151: 469-478.
- JOHANSSON, G. & HALLMAN, H. (1982) Substance P modifies the 6-hydroxydopamine induced alteration of post-natal development of central noradrenaline neurons. *Neuroscience*, 7: 209-218.
- JÜRGENS, U. & PRATT, R. (1979) Role of the periaqueductal gray in vocal expression of emotion. *Brain Research*, 167: 367-378.

- KANAZAWA, I., EMSON, P. C. & CUELLO, C. (1977) Evidence for the existence of substance P-containing fibres in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Research*, 119: 447-453.
- KELLEY, A. E. & IVERSEN, S. D. (1978) Behavioural response to bilateral injections of substance P into the substantia nigra of the rat. *Brain Research*, 158: 474-478.
- KELLEY, A. E., STINUS, L. & IVERSEN, S. D. (1979) Behavioural activation induced in the rat by substance P infusion into the ventral tegmental area: implication of dopaminergic A10 neurons. *Neuroscience Letters*, 11: 335-339.
- KELLEY, A. E., CADOR, M. & STINUS, L. (1985) Behavioural analysis of the effect of substance P injected into the ventral mesencephalon on investigatory and spontaneous motor behavior in the rat. *Psychopharmacology*, 85: 37-46.
- KILLAM, K. F. & BAIN, J. A. (1957) Convulsant hydrazides. I. *In vitro* and *in vivo* inhibitions of vitamin B6 enzymes by convulsant hidrazides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 119: 255-262.
- KRAUSE, J. E. (1985) On the physiological metabolism of substance P. In: Jordan C. C. & Oehme P (Eds.) *Substance P: metabolism and biological actions*. Taylor and Francis, London, pp 13-31. APUD: HUSTON, J. P., HASENÖHRL, R. U., BOIX, F., GERHARDT, P. & SCHWARTING, R. K. W. (1993) Sequence-specific of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity. *Psychopharmacology*, 112: 147-162.
- KOSLOVA, M. V., IL'YINSKII, O. B., KALENCHUK, V. U. & KONDRIKOVA, E. S. (1987) Activating effects of substance P on nerve tissue culture. *Neurophysiology*, 18: 429-434.
- KRIEGER, D. T. (1983) Brain peptides: what, where and why?. *Science (Washington)*, 222: 975-985.
- LEDOUX, J. E., IWATA, J., PEARL, D. & REIS, D. J. (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate behavioral and autonomic correlates of fear. *Journal of Neurosciences*, 8: 2517-2529.
- LEE, C. M., IVERSEN, L. L., HANLEY, M. R. & SANDBERG, B. E. B. (1982) The possible existence of multiple receptors for substance P. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 318: 281-287.

- LEMBECK, F., HOLZER, P., SCHWEDITSCH, M. & GAMSER, R. (1978) Elimination of substance P from the circulation of the rat and its inhibition by bacitracin. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of pharmacology*, 305: 9-16.
- LIEBESKIND, J. C., GUILBAUD, G., BESSON, J.-M. & OLIVERAS, J.-L. (1973) Analgesia from electrical of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. *Brain Research*, 50: 441-446.
- LIEBMAN, J. M., MAYER, D. J. & LIEBESKIND, J. C. (1970) Mesencephalic central gray lesions and fear-motivated behavior in rats. *Brain Research*, 23: 353-370.
- LISTER, R. G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185.
- LJUNGDAHAL, A., HÖKFELT, T. & NILSSON, G. (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat-I Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, 3: 861-943.
- LOVICK, T. A. (1991) Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 101-120.
- LOVICK, T. A. (1993) The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defense reaction: efferent pathways and descending control mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 58: 19-25.
- LUNDBERG, J. M. & HÖKFELT, T. (1983) Coexistência of neuropeptides and classical neurotransmitters. *Trends in Neurosciences*, 6: 325-333.
- LÜNEBURG, U. & FLOHR, H. (1988) Effects of substance P on vestibular compensation. In: H. Flohr (Ed.), *Post-Lesion Neural Plasticity*. Berlin: Springer Verlag, pp. 699-704.
- MAGGIO, J. L. (1988) Tachykinins. *Annual Review of Neurosciences*, 11: 13-28.
- MAINS, R. E., EIPPER, B. A., GLEMBOTSKI, C. C. & DORES, R. M. (1983) Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides. *Trends in Neurosciences*, 6 : 229-235.
- MALLICK, J. B. & GOLDSTEIN, J. M. (1978) Analgesic activity of substance P following intracerebral administration in rats. *Life Science*, 23: 835-844.

- MALLICK, J. B. (1970) Effects of selected drugs on stimulus-bound emotional behavior elicited by hypothalamic stimulation in the cat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie*, 186: 137-141.
- MANTYH, P. W. (1982a) The midbrain periaqueductal in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. *Journal of Comparative Neurology*, 204: 349-263.
- MANTYH, P. W. (1982b) Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey with observation in the cat and the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 206: 146-158.
- MANTYH, P. W. & PESCHANSKI, M. (1982) Spinal cord projections from the periaqueductal gray and dorsal rafe in the rat, cat and monkey. *Neuroscience*, 7: 2769-2776.
- MARCHAND, J. E. & HIGINO, N. (1983) Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 9: 95-106.
- MARKS, I. M. (1987) Fear, Defense, and Evolution. In: I. M. Marks (Ed.), *Fears, Phobias and Rituals. Panic, anxiety and theirs disorders*. New York: Oxford University Press, pp. 3-24.
- MATTIOLI, R. (1992a) Efeitos comportamentais e neuroquímicos de injeções sistêmicas de substância P: relação com a via dopaminérgica mesotelencefálica. Tese de doutorado apresentada à FFCLRP-USP.
- MATTIOLI, R., SCHWARTING, R. K. W. & HUSTON, J. P. (1992b). Recovery from unilateral 6-hydroxydopamine lesion of substantia nigra promoted by the neurotachykinin substance P₁₋₁₁. *Neuroscience*, 48: 595-605.
- MAYER, D. J. & LIEBESKIND, J. C. (1974) Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. *Brain Research* 68: 73-93.
- MEHLER, W. R. (1966) Some observations on secondary ascending efferent systems in the central nervous system. In: R. S. Knighton & B. R. Kumbé (Eds.), *Henry Ford Hospital International Symposium on Pain*. Boston: Little Brown, pp. 11-32.
- MELLO, L. L., CARDOSO, S. H. & BRANDÃO, M. L. (1992) Antiaversive actions of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*, 51: 557-562.

- MILANI, H. & GRAEFF, F. G. (1987) GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 28: 21-27.
- MONTGOMERY, K. C. (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48, 4: 254-260.
- MONTGOMERY, K. C. & MONKMAN, J. A. (1955) The relation between fear and exploratory behavior. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48, 2: 132-136.
- MOOD, T. W., MORALI, Z. & CRAWLEY, J. N. (1988) The effects of anxiolytics and others agents on rat grooming behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 525: 281-290.
- MOREAU, J. L. & FIELDS, H. L. (1986) Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Research*, 397: 37-46.
- MORGAN, M. M., DEPAULIS, A. & LIEBESKIND, J. C. (1987) Diazepam dissociates the analgesic and aversive effects of periaqueductal gray stimulation in the rat. *Brain Research*, 423: 395-398.
- MOHRLAND, J. S. & GEBHARDT, G. F. (1979) Substance P induced analgesia in the rat. *Brain Research*, 171: 556-559.
- MOSS, M. S., GLAZER, E. J. & BASBAUM, A. I. (1983) The peptidergic organization of the cat periaqueductal gray: I. The distribution of enkephalin-containing neurons and terminals. *Journal of Neuroscience*, 3: 603-616.
- MOTTA, V. & BRANDÃO, M. L. (1993) Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 44: 119-125.
- MOTTA, V., PENHA, K. & BRANDÃO, M. L. (1995) Effects of microinjeções of μ and κ receptors agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. *Psychopharmacology (in press)*.
- MUCHA, R. F., VAN DER KOOY, D., O'SHAUGHNESSY, M. & BUCENIEKS, P. (1982) Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat. *Brain Research*, 243: 91-105.
- MUDGE, A. W., LEEMAN, S. E. & FISHBACH, G. (1979) Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proceedings National Academic Sciences of USA*, 76: 526-530.

- NAKAI, K. & KAZAMATSU, T. (1984) Accelerated regeneration of central catecholamine fibers in cat occipital cortex: effects of substance P. *Brain Research*, 323: 374-379.
- NAKAO, H. (1958) Emotional behavior produced by hypothalamic stimulation. *American Journal of Physiology Behavior*, 194: 411-418.
- NARANJO, J. R. & DEL RIO, J. (1984) Locomotor activation induced in rodents by substance P and analogues. *Neuropharmacology*, 23: 1167-1171.
- NARUMI, S. & FUJITA, T. (1978) Stimulatory effects of substance P and nerve growth factor (NGF) on neurite outgrowth in embryonic chick dorsal root ganglia. *Neuropharmacology*, 17: 73-76.
- NASHOLD, B. S., WILSON, W. P. & SLAUGHTER, D. G. (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery*, 30: 14-24.
- NAUTA, W. J. H. (1958) Hippocampal projections and related neural pathways to the mid-brain in the cat. *Brain*, 81: 319-340.
- NICOLL, R. A., SCHENKER, C. & LEEMAN, S. E. (1980) Substance P as a transmitter candidate. *Annual Review of Neurosciences*, 3: 227-268.
- NOGUEIRA, P. J. C. & TOMAZ, C. (1990) Substance P and naloxone enhancement of avoidance conditioning in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23: 163-167.
- NOGUEIRA, P. J. C., TOMAZ, C. & WILLIAMS, C. L. (1994) Contribution of the vagus nerve in mediating the memory-facilitating effects of substance P. *Behavioural Brain Research*, 62: 165-169.
- NOGUEIRA, R. L. & GRAEFF, F. G. (1991) 5-HT mediation of the antiaversive effect of isamoltane injected into the dorsal periaqueductal gray. *Behavioral Pharmacology*, 2: 73-77.
- OGAWA, S., KOW, L. M. & PFAFF, D.W. (1989) Neuronal activity of dorsal periaqueductal gray neurons of female rats: responsiveness to GABA and enkephalin. *Abstracts of Neuroscience Society*, 15: 146.
- OLDS, M. E. & OLDS, J. (1963) Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 120: 259-295.
- OLDS, M. E. & OLDS, J. (1962) Approach-escape interactions in rat brain. *American Journal of Pharmacology*, 203: 803-810.

- OLGART, L., GAZELIUS, B., BRODIN, E. & NILSSON, G. (1977a) Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiologica Scandinavica*, 101: 510-512.
- OLGART, L., HÖKFELT, T., NILSSON, G. & PERNOW, B. (1977b) Localization of substance P-like immunoreactivity in nerves in the tooth pulp. *Pain*, 4: 153-159.
- OLPE, H.-R. & KOELLA, W. P. (1977) Rotatory behavior in rats by intranigral application of substance P and an eleudoisin fragment. *Brain Research*, 126: 576-579.
- PANKSEEP, J. (1990) The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animals models in understanding human anxiety. In: G. D. Burrows, M. Roth & R. Jr. Noyes (Eds.), *Handbook of Anxiety, The Neurobiology of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, vol. 3, pp. 3-58.
- PANKSEPP, J. (1982) Toward a general psychobiological theory of emotions. *The Behavioral and Brain Sciences*, 5: 407-467.
- PAPEZ, J. W. (1937) A proposed mechanism of emotion. *Archives of Neurology and psychiatry*, 38: 725-743.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.
- PELLEYMOUNTER, M. A., SCHLESINGER, K., WEHNER, J., HALL, M. E. & STEWART, J. M. (1988) Nigral 5-HT and substance P-induced enhancement of passive avoidance retention. *Behavioural Brain Research*, 29: 159-172.
- PELLOW, S., CHOPIN P., FILE, S. E. & MIKE, B. (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.
- PELLOW, S. & FILE, S. E. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 24: 525-529.
- PERNOW, B. (1983) Substance P. *Pharmacology Review*, 35: 85-141.
- PIERCEY, M. F., DARBY, P., MASIQUES, N. & SCHROEDER, L. A. (1985) Stereospecificity of SP₁ and SP₂ Substance P receptors. *Life Science*, 36: 777-780.

- RANSON, S. W., KABAT, H. & MAGOUN, H. W. (1935) Autonomic responses to electrical stimulation of hypothalamus preoptic region and septum. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 467-477.
- REICHLING, D. B. (1991) GABAergic neuronal circuitry in the periaqueductal gray matter. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 329-344.
- REYNOLDS, D. V. (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, 164: 444-445.
- RONDEAU, D. B., JOLICOEUR, F. B., BELANGER, F. & BARBEAU, A. (1978) Motor activity induced by substance P in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 9: 769-775.
- RUDA, M. A. (1975) An autoradiographic study of the efferent connections of the midbrain central gray in the rat. *Anatomical Records*, 181: 468-474.
- SANDNER, G., DESSERT, D., SCHMITT, P. & KARLI, P. (1981) Distribution of GABA in the periaqueductal gray matter. Effects of medial hypothalamic lesions. *Brain Research*, 224: 279-290.
- SASTRY, B. R. (1979) Substance P effects on spinal nociceptive neurons. *Life Science*, 24: 2169-2178.
- SCHENBERG, L. C. & GRAEFF, F. G. (1978) Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 9: 287-295.
- SCHENKER, C., MROZ, E. A. & LEEMAN, S. E. (1976) Release of substance P from isolated nerve endings. *Nature*, 264: 790-792.
- SCHMITT, P. & KARLI, P. (1980) Escape induced by combined stimulation in medial hypothalamus and central gray. *Physiology & Behavior*, 24: 111-121.
- SCHLESINGER, K., PELLEYMOUNTER, M. A., VAN de CAMP, J., BADER, D. L., STEWART, J. M. & CHASE, T. N. (1986) Substance P facilitation of memory: effects in appetitively motivated learning task. *Behavioral and Neural Biology*, 45: 230-239.
- SCHLESINGER, K., LIPSITZ, U., PECK, P. L., PELLEYMOUNTER, M. A., STEWART, J. M. & CHASE, T. N. (1983) Substance P enhancement of passive and active avoidance conditioning in mice. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 19: 655-661.

- SHAIKH, M. B., BARRETT, J. A. & SIEGEL, A. (1987) The pathways mediating affective defense and quiet biting attack behavior from midbrain central gray of the cat: An autoradiographic study. *Brain Research*, 437: 9-25.
- SHAIKH, M. B., SHAIKH, A. B. & SIEGEL, A. (1988) Opioid peptides within the midbrain periaqueductal gray suppress affective defense behavior in the cat. *Peptides*, 9: 999-1004.
- SHAIKH, M. B., STEINBERG, A. & SIEGEL, A. (1993) Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. *Brain Research*, 625: 283-294.
- SHAIKH, M. B. & SIEGEL, A. (1994) Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defensive rage behavior in the cat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 2759-2779.
- SHAIKH, M. B., LU, C. & SIEGEL, A. (1991) An enkephalinergic mechanism involved in amygdaloid suppression of affective defence behavior elicited from the midbrain periaqueductal gray in the cat. *Brain Research*, 559: 109-117.
- SHARE, N. N. & RACKMAN, A. (1981) Intracerebral substance P in mice: behavioral effects and narcotic agents. *Brain Research*, 211: 379-386.
- SHERMAN, A. D. & GEBHART, G. F. (1976) Morphine and pain: effects on aspartate GABA and glutamate in four discrete areas of mouse brain. *Brain Research*, 110: 273-281.
- SHIPLEY, M.T., ENNIS, M., RIZVI, T. A. & BEHBEHANI, M. M. (1991) Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: A. Depaulis & R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, pp. 417-448.
- SHULTS, C. W., QUIRION, R., CHRONWALL, B., THOMAS, N. C. & O'DONOHUE, T. L. (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat nervous system. *Peptides*, 5: 1097-1128.
- SIEGEL, J. & BROWNSTEIN, R. A. (1975) Stimulation to the raphe dorsalis, central gray and hypothalamus: inhibitory and aversive effects. *Physiology & Behavior*, 14: 431-438.

- SIEGEL, A. & POTT, C. B. (1988) Neural substrates of aggression and flight in the cat. *Progress in Neurobiology*, 31: 261-270 .
- SILVA, M., NOGUEIRA, P. J. C. & TOMAZ, C. (1993) Effects of naloxone treatment on memory-enhancing properties of post-training administration of substance P. *Behavioural Brain Research*, 56: 101-106.
- STÄUBLI, U. & HUSTON, J. P. (1985) Central action of substance P: possible role in reward. *Behavioral and Neural Biology*, 43: 100-108.
- STEIN, L. & BELLUZZI, J. D. (1979) Brain endorphins: possible role in reward and memory formation. *Federation Proceedings*, 38: 2468-2472.
- STEPHENS, D. N. ANDREWS, J. S., TURSKI, L. & SCHNEIDER, H. H. (1991) Excitatory aminoacids and anxiety. In: M. Briley, S. E. File (Eds.), *New Concepts in Anxiety*. London: MacMillan Press, pp. 366-381.
- STEWART, J. M., GETTO, C. J., NELDNER, K., REEVE, E. B., KRIVOY, W. A. & ZIMMERMAN, E. (1976) Substance P and analgesia. *Nature (London)*, 262: 784-785.
- STEWART, J. M. (1983) Problem in the use of substance P. In: P. S. Krabanek & D. Powell (Eds.), *Substance P*. Dublin: Boole Press, pp. 6-7.
- TEIXEIRA, R. M. SANTOS, A. R. S. & de LIMA, T. C. M. (1995) Influência de agonistas e antagonistas seletivos taquicinérgicos num modelo experimental de ansiedade. Resumos da X Reunião Anual da FESBE, pág. 39.
- TOMAZ, C. & HUSTON, J. C. (1986) Facilitation of conditioned inhibitory avoidance by post-trial peripheral injection of substance P. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 25: 469-472.
- TOMAZ, C., NOGUEIRA, P. J. C. & AGUIAR, M. S. (1990) Improved learning by peripheral injection of substance P. In: S. Morato, A. P. Carobrez & T. M. C. Lima (Eds.), *Neuroscience & Behavior - 2*. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, pp. 31-43.
- TREDICI, G., BIANCHI, R. & GIOIA, M. (1983) Short intrinsic circuit in the periaqueductal gray matter of the cat. *Neuroscience Letters*, 39: 131-136.
- von EULER, U. S. & GADDUM, J. H. (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *Journal of Physiology*, 72: 74-87.
- WASMAN, M. & FLYNN, J. P. (1962) Directed attack elicited from hypothalamus. *Archives of Neurology*, 60-67.

- WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. (1976) The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83, 3: 482-504.
- WILLNER, P. (1991) *Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives*. In: P. Willner (Ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- WOODS, J. H. (1964) Behavior of chronic decerebrate rats. *Journal of Neurophysiology*, 27: 635-644.
- YAKSH, T. L., YEUNG, J. C. & RUDY, T. A. (1976) Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Research*, 114: 83-103.
- YAKSH, T. L., FARB, D. H., LEEMAN, S. E. & JESSEL, T. M. (1979) Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science*, 206: 481-483.
- YAMASHITA, J. & HIRATA, H. (1978) Running fits induced by directed administration of semicarbazide into the superior colliculus in the mouse. *Neuroscience Letters*, 8: 89-92.

APÉNDICE



RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÃO DE 0,2 µl DE SALINA NA MCPD DE RATOS REGISTRADAS NA ARENA DURANTE 30 MINUTOS.

Animal	Cruzamentos	Levantamentos	Limpeza
1	26	11	03
2	58	19	00
3	82	28	06
4	91	30	06
5	32	22	06
6	72	20	05
7	147	12	00
8	24	05	00
X	66.05	18.38	03.35
EPM	14.67	03.04	01.01

RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÕES DE 6 µg / 0,2 µl de SEMICARBAZIDA NA MCPD DE RATOS REGISTRADAS NA ARENA DURANTE 30 MINUTOS.

Animal	Cruzamentos	Levantamentos	Limpeza
1	116	41	06
2	153	109	03
3	161	41	05
4	220	54	11
5	122	33	17
6	150	67	08
7	114	48	01
8	117	36	04
X	144.13	53.63	06.88
EPM	12 73	08.80	01.81

RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÕES DE 25 ng / 0,2 µl DE SUBSTÂNCIA P NA MCPD DE RATOS REGISTRADAS NA ARENA DURANTE 30 MINUTOS.

Animal	Cruzamentos	Levantamentos	Limpeza
1	198	63	10
2	231	118	06
3	103	21	21
4	188	68	12
5	100	53	08
6	104	28	07
7	132	41	10
8	84	40	09
X	142.50	54.00	10.38
EPM	19.53	10.77	03.67

REPOSTAS COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÕES DE 50 ng / 0,2 µl NA MCPD DE RATOS REGISTRADAS NA ARENA DURANTE 30 MINUTOS.

Animal	Cruzamentos	Levantamentos	Limpeza
1	75	46	15
2	67	24	09
3	124	86	17
4	35	15	13
5	143	34	10
6	61	33	15
X	84.17	39.67	13.17
EPM	16.71	10.19	01.28

RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÕES DE 100 ng/0,2µl DE SUBSTÂNCIA P NA MCPD DE RATOS REGISTRADAS NAS ARENA DURANTE 30 MINUTOS.

Animal	Cruzamentos	Levantamentos	Limpeza
1	140	65	15
2	59	31	08
3	143	53	18
4	91	38	15
5	63	32	09
6	31	19	12
X	87.83	39.67	12.83
EPM	18.67	06.79	01.58

**DIFERENÇA MÉDIA (PÓS-TREINO - PRÉ-TREINO) DO TEMPO
DISPENSADO NO COMPARTIMENTO PAREADO COM 0,2µl DE
SALINA, INJETADA NA MCPD DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE
DO CONDICIONAMENTO AO LUGAR.**

Animal	Pós-treino	-	Pré-treino	=	
1	306.78	-	350.42	=	-43.74
2	577.05	-	382.73	=	194.32
3	805.34	-	738.96	=	66.38
4	505.62	-	519.06	=	-13.44
5	660.00	-	510.07	=	149.93
6	780.00	-	752.03	=	27.97
7	630.00	-	685.11	=	-55.11
8	419.88	-	390.34	=	29.54
X	44.48				
EPM	31.51				

**DIFERENÇA MÉDIA DO TEMPO (PÓS-TREINO - PRÉ-TREINO)
DISPENSADO NO COMPARTIMENTO PAREADO COM
MICROINJEÇÕES DE 6 µg / 0,2 µl DE SEMICARBAZIDA INJETADA
NA MCPD DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE
CONDICIONAMENTO AO LUGAR.**

Animal	Pós-treino	-	Pré-treino	=	
1	81.61	-	867.46	=	-785.85
2	471.00	-	744.28	=	-273.28
3	565.55	-	524.09	=	41.46
4	65.43	-	836.14	=	-790.71
5	55.75	-	389.11	=	-333.36
6	141.00	-	450.87	=	-309.87
7	46.00	-	440.73	=	-394.73
8	194.20	-	440.41	=	-246.21
X	-386.57				
EPM	04.36				

DIFERENÇA MÉDIA DO TEMPO DISPENSADO NO COMPARTIMENTO PAREADO COM MICROINJEÇÕES DE 25 ng / 0,2 µl DE SUBSTÂNCIA P NA MCPD DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DO CONDICIONAMENTO AO LUGAR.

Animal	Pós-treino	-	Pré-treino	
1	810.33	-	672.45	= 137.88
2	92.63	-	651.83	= -559.20
3	98.11	-	542.31	= -450.20
4	97.20	-	341.90	= -244.70
5	107.60	-	529.34	= -421.74
6	650.00	-	605.55	= 44.45
7	323.00	-	603.80	= -208.80
8	252.28	-	284.43	= -32.15
X	-216.81			
EPM	03.93			

DIFERENÇA MÉDIA DO TEMPO (PÓS-TREINO - PRÉ-TREINO) DISPENSADO NO COMPARTIMENTO PAREADO COM MICROINJEÇÕES DE 50 ng / 0,2 µl DE SUBSTÂNCIA P NA MCPD DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CONDICIONAMENTO AO LUGAR.

Animal	Pós-treino	-	Pré-treino	=	
1	494.90	-	324.35	=	170.65
2	191.52	-	348.80	=	-157.28
3	667.00	-	698.00	=	-31.00
4	164.00	-	754.00	=	-590.00
5	117.13	-	681.63	=	-564.50
6	412.89	-	450.00	=	-37.11
X	-201.54				
EPM	08.60				

DIFERENÇA MÉDIA DO TEMPO (PÓS-TREINO - PRÉ-TREINO) DISPENSADO NO COMPARTIMENTO PAREADO COM MICROINJEÇÕES DE 100 ng / 0,2 µl DE SUBSTÂNCIA P NA MCPD DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CONDICIONAMENTO AO LUGAR.

	Animal	Pós-treino	-	Pré-treino	
	1	669.07	-	595.51	= 73.56
	2	180.95	-	278.21	= -97.26
	3	641.00	-	404.18	= 236.82
	4	613.95	-	528.20	= 85.75
	5	315.03	-	738.71	= -423.68
	6	114.10	-	333.45	= -219.35
	7	810.00	-	651.85	= 158.15
X	-26.57				
EPM	04.76				

EXPLORATÓRIO DE RATOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.**ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE QUE RECEBEU 0,2 µl DE SALINA NA MCPD.**

Animal	Total	Braços Abertos		Braços Fechados		%	%
	Entrad.	Freq.	Tempo	Freq.	Tempo	Entrad. Abertos	Tempo Abertos
01	17	06	59	11	197	35.29	23.05
02	15	06	47	09	205	40.00	18.65
03	16	05	35	11	198	31.25	15.02
04	19	07	58	12	178	36.84	24.57
05	11	05	64	06	205	45.45	23.79
06	12	07	54	06	191	58.33	22.04
07	16	05	59	11	159	31.25	27.06
08	11	05	75	06	206	45.45	26.69
09	19	05	59	14	167	26.32	26.11
X	15.11	05.67	56.67	09.56	189.56	38.91	23.00
EPM	01.05	00.29	03.69	00.99	05.84	03.24	01.32

COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO. ANIMAIS DO GRUPO QUE RECEBEU 6 µg / 0,2 µl DE SEMICARBAZIDA NA MCPD.

Animal	Total	Braços Abertos		Braços Fechados		%	%
	Entrad.	Freq.	Tempo	Freq.	Tempo	Entrad. Abertos	Tempo Abertos
01	14	02	04	12	250	14.28	01.57
02	23	08	55	15	198	34.78	21.74
03	06	01	17	05	254	16.67	06.27
04	08	02	08	06	265	25.00	02.93
05	12	05	92	07	156	00.42	00.37
06	06	01	02	05	260	16.67	00.76
07	11	03	13	08	141	00.37	00.44
08	19	08	78	11	183	42.11	29.89
X	12.37	03.75	33.63	08.63	213.38	18.79	08.00
EPM	02.16	01.03	12.73	01.29	17.69	05.25	04.02

COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO. ANIMAIS DO GRUPO QUE RECEBEU 5 ng / 0,2 µl de SUBSTÂNCIA P NA MCPD.

Animal	Total	<u>Braços Abertos</u>		<u>Braços Fechados</u>		%	%
	Entrad.	Freq.	Tempo	Freq.	Tempo	Entrad.	Tempo
						Abertos	Abertos
01	22	04	23	18	218	18.18	10
02	19	10	74	09	181	53	29.02
03	11	04	41	07	215	36.36	16.02
04	11	05	47	06	229	45.00	17.03
05	14	07	38	07	244	50.00	13.48
06	13	05	43	08	209	38.46	17.06
07	16	06	56	10	168	37.05	25.00
08	14	05	36	09	196	35.71	15.52
X	15.00	05.75	44.75	09.25	207.05	39.28	17.89
EPM	01.36	00.70	05.34	01.33	08.82	03.79	02.18