

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS JOVENS E
ADULTOS: EVIDÊNCIAS FARMACOLÓGICAS DE ALTERAÇÕES
NOS RECEPTORES GABA-A / BENZODIAZEPÍNICOS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO

RAFAEL ROESLER

Orientador:
Prof. JORGE ALBERTO QUILLFELDT

Dissertação apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Biofísica.

Porto Alegre
1994

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - MEMÓRIA E APRENDIZADO	1
1.1.1 - <i>Processamento da Memória</i>	1
1.1.2 - <i>Bases Moleculares da Memória</i>	2
1.2 - SISTEMA GABAÉRGICO E RECEPTORES GABA-A / BENZODIAZEPÍNICOS	2
1.2.1 - <i>Ácido γ-aminobutírico (GABA)</i>	4
1.2.2 - <i>Estrutura e Distribuição Neuroanatômica dos Receptores GABA-A / Benzodiazepínicos</i>	6
1.2.3 - <i>Farmacologia dos Receptores GABA-A/Benzo- diazepínicos</i>	8
1.3 - HISTÓRICO E UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS BENZO- DIAZEPÍNICOS	9
1.4 - AÇÃO MODULATÓRIA DOS RECEPTORES GABA-A / BENZODIAZEPÍNICOS SOBRE A MEMÓRIA: PAPEL DOS BENZODIAZEPÍNICOS	10
1.5 - ONTOGENIA DOS RECEPTORES GABA-A/BENZODIA- ZEPÍNICOS	11
1.5.1 - <i>Alterações na Estrutura dos Receptores</i>	11
1.5.2 - <i>Alterações de Número e Densidade dos Receptores no Cérebro</i>	12
2- OBJETIVOS	14
3 - MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS	15
3.2 - PROCEDIMENTOS FARMACOLÓGICOS	15
3.3 - PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS	15
3.3.1 - <i>Esquiva Inibitória</i>	15
3.3.2 - <i>Esquiva Ativa de Duas Vias</i>	16
3.3.3 - <i>Habituação ao Campo Aberto</i>	16
3.4 - ANÁLISE DOS RESULTADOS	16
4 - RESULTADOS	17
4.1 - ESQUIVA INIBITÓRIA	17
4.2 - ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS	20
4.3 - HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO	23
5 - DISCUSSÃO	27
5.1 - ESQUIVA INIBITÓRIA	28
5.2 - ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS	28
5.3 - HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO	29
6 - CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31

ABREVIATURAS

AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

BZD - benzodiazepínico

DZP - diazepam

GABA - ácido γ -aminobutírico

ip - intra-peritoneal

LTM - "long-term memory" - memória de longa duração

LTP - "long-term potentiation" - potenciação de longa duração

NMDA - N-metil-D-aspartato

PKC - proteína quinase C

PTP - "post-tetanic potentiation" - potenciação pós-tetânica

SNC - sistema nervoso central

STM - "short-term memory" - memória de curta duração

STP - "short-term potentiation" - potenciação de curta duração

RESUMO

Os receptores GABA-A/Benzodiazepínicos sabidamente estão envolvidos na modulação da memória. Entre outros agentes químicos, os benzodiazepínicos, que ligam-se a sítios específicos neste receptor e potenciam a sua atividade, tendem a inibir o processo de formação da memória. Vários estudos, tanto no campo da biologia molecular quanto no da bioquímica, descrevem alterações na estrutura, na densidade e na distribuição dos receptores GABA-A/Benzodiazepínicos no cérebro, ao longo do desenvolvimento. Assim, a composição e as propriedades farmacológicas destes receptores no cérebro de ratos adultos parecem diferir daquelas observadas em animais jovens. Baseados nesses dados, poderíamos supor que um mesmo tratamento com benzodiazepínicos possa determinar efeitos distintos sobre a memória, de acordo com a idade do indivíduo. Não há, no entanto, dados anteriores que tratem da ontogenia dos receptores GABA-A/Benzodiazepínicos no que se refere ao estudo da memória, o que pode ser avaliado através da manipulação farmacológica destes receptores em animais de diferentes idades. Neste trabalho, procuramos observar o efeito de um benzodiazepínico de amplo uso clínico e experimental, o diazepam, sobre a memória de ratos Wistar fêmeas, adultos (60 dias) ou jovens (30 dias), em três tarefas comportamentais: Esquiva Inibitória, Esquiva Ativa de Duas Vias e Habituação ao Campo Aberto. O diazepam (0,2, 1,0 ou 5,0 mg/kg) ou seu veículo foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), 60 minutos antes da sessão de treino nas tarefas. O intervalo entre a sessão de treino e a sessão de teste foi de 24h. Os resultados mostraram que o diazepam prejudicou o desempenho dos animais adultos em Esquiva Inibitória e Esquiva Ativa, quando utilizadas as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, sugerindo déficit de memória. A dose de 0,2 mg/kg facilitou a memória em Esquiva Inibitória, e não teve efeito em Esquiva Ativa. Na tarefa de Habituação, o diazepam prejudicou o desempenho dos animais adultos em todas as doses utilizadas. Já em ratos jovens, o diazepam teve um efeito distinto do observado em ratos adultos, nas duas tarefas de esquiva. Em Esquiva Inibitória, todas as doses (inclusive a de 0,2 mg/kg) foram amnésicas, e, em Esquiva Ativa, a memória não foi afetada por nenhuma das doses utilizadas. O efeito sobre a tarefa de Habituação foi semelhante em ratos jovens e adultos. Os efeitos diferenciados do diazepam em ratos jovens e adultos, observados nas tarefas de esquiva, podem dever-se a alterações idade-dependentes no número, distribuição e estrutura dos receptores GABA-A/Benzodiazepínicos.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - MEMÓRIA E APRENDIZADO

1.1.1 - *Processamento da Memória*

A capacidade de formar memórias é uma importante característica do sistema nervoso central (SNC). A *aquisição* de novas informações através da experiência é chamada *aprendizado*, enquanto a memória é a capacidade de *armazenar* e *evocar* posteriormente essas informações (Izquierdo, 1989a, 1989b e 1992).

As informações são percebidas pelos sentidos através dos estímulos recebidos do ambiente, e passam por um processo de seleção que determina o que deve ser memorizado. Os mecanismos neurais responsáveis por essa seleção parecem envolver diversas estruturas do SNC, particularmente o hipocampo e a amígdala (Izquierdo, 1989a). Estudos recentes também indicam que o fórnix (via que comunica o hipocampo com o septo medial) ou o núcleo caudato participam de diferentes tipos de processamento de informação, uma vez que lesões nestas estruturas prejudicam a aquisição (Packard e McGaugh, 1992). O processo de memorização pode ocorrer sob a forma de uma memória de curta duração ("working memory" ou "short-term memory"- STM), que permanece no cérebro apenas por poucos segundos ou minutos (Agranoff, 1989; Izquierdo, 1992), ou de uma memória de longa duração ("long-term memory"- LTM), duradoura e estável, que pode ser evocada posteriormente (Agranoff, 1989). Aparentemente, estas duas formas de memória são formadas em vias diferentes no sistema nervoso. Estudos demonstraram que pacientes com lesão do lobo temporal medial (incluindo o hipocampo) apresentam deficiência na formação de LTM, mas não de STM, fenômeno semelhante ao observado em ratos com lesão dorsal do hipocampo (Kesner e Novak, 1982).

A formação de uma memória de longa duração envolve um processo chamado *consolidação*. Neste período, que ocorre após o momento da aquisição (aprendizado), as informações são mais suscetíveis a interferências do ambiente (Izquierdo, 1988, 1989a e 1992; McGaugh et al., 1984; Rosenzweig e Bennet, 1984). Na consolidação parecem estar envolvidos o hipocampo, o septo medial e a amígdala, sendo que o papel desempenhado por cada uma destas estruturas é determinado pelo tipo de informação que está sendo processada. Assim, enquanto o hipocampo atua principalmente na consolidação de informações espaciais (Izquierdo, 1992; Izquierdo e Medina, 1993), a amígdala é especializada no processamento de informações aversivas e de alerta, onde também há participação do septo medial (Izquierdo e Medina, 1993).

Na fase final da consolidação, a memória aparentemente passa a ser processada por uma região cortical chamada córtex entorrinal (Izquierdo, 1992). Esta estrutura tem conexões monossinápticas bidirecionais com a amígdala, o hipocampo e o septo medial,

Os neurotransmissores estão contidos em vesículas nos terminais pré-sinápticos. No momento em que chega um potencial de ação àquela terminação neural, e ocorre a despolarização local da membrana, os neurotransmissores são liberados das vesículas, graças a um mecanismo que depende da entrada de Ca^{++} na célula através de canais voltagem-dependentes. Uma vez liberado na fenda sináptica, o neurotransmissor liga-se a receptores específicos na membrana pós-sináptica, exercendo então seu efeito (Erulkar 1989; O'Donnel e Pazo, 1989).

A ação do neurotransmissor pode se expressar através de (1) uma alteração na permeabilidade da membrana da célula pós-sináptica a um ou mais íons, causando uma mudança no potencial de membrana (quando age sobre receptores ionotrópicos), ou (2) uma alteração no metabolismo da célula pós-sináptica, por exemplo, ativação de proteínas que determinem uma mudança no número de receptores (quando age sobre receptores metabotrópicos). No primeiro caso, podem ocorrer sinapses excitatórias ou sinapses inibitórias. Quando a ativação do receptor determina a abertura de um canal de Ca^{++} e/ou de Na^+ , isto contribui para a despolarização da membrana, e a sinapse é chamada de excitatória. Por outro lado, quando a ativação do receptor pós-sináptico leva à abertura de canais de Cl^- (ou de K^+), isto contribui para a hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, o que inibe a célula, e a sinapse neste caso é chamada de inibitória (Erulkar, 1989).

A maior parte das sinapses excitatórias no SNC de um indivíduo adulto têm como neurotransmissor o glutamato, e existem no cérebro quatro subtipos de receptor para este aminoácido (Dingledine e McBain, 1994). Tem-se demonstrado que as sinapses excitatórias glutamatérgicas têm a propriedade de, sob ação de determinados padrões de estimulação repetitiva sobre a via neural, aumentar a eficiência da transmissão nessa mesma via, processo que se estabelece rapidamente e que persiste por longos períodos. Esse fenômeno é chamado *potenciação de longa duração* ("long-term potentiation"-LTP), e tem sido proposto como base da formação de memórias (Bliss e Collingridge, 1993; Lynch e Baudry, 1984).

O fenômeno da LTP foi demonstrado experimentalmente em vias monossinápticas excitatórias do hipocampo que receberam estímulos de alta frequência, o que levava a um aumento no componente sináptico da resposta. Em várias estruturas, como no CA1 do hipocampo, a ocorrência da LTP envolve a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (no momento da indução do fenômeno), e, posteriormente, a ativação de receptores do tipo AMPA. Quando o número de fibras aferentes estimuladas é muito pequeno, pode ocorrer apenas uma potenciação pós-tetânica ("post-tetanic potentiation"-PTP), ou uma potenciação de curta duração ("short-term potentiation"-STP), cuja duração é de menos de uma hora (Bliss e Collingridge, 1993).

Sendo a LTP uma potenciação duradoura de uma determinada via sináptica, devem ocorrer alterações que estabilizem esse aumento de eficiência da transmissão. Este mecanismo pode envolver (1) alterações pré-sinápticas que resultem em aumento da liberação de neurotransmissores, (2) alterações pós-sinápticas que resultem em aumento do número de receptores ou modificações em sua estrutura, (3) alterações na liberação de glutamato pelas células gliais, ou (4) alterações morfológicas. É provável que ocorra uma combinação de modificações pré- e pós-sinápticas, em diferentes proporções de acordo com o estágio do processo, começando com uma fase independente de proteína kinase

(STP), seguido por três estágios de LTP: na LTP 1, ocorreria fosforilação proteica, na LTP 2 a síntese proteica a partir de mRNAs, e, na LTP 3, transcrição gênica (Bliss e Colingridge, 1993). Evidências recentes mostram que a ativação de proteínas quinases, que levaria à fosforilação de várias proteínas importantes para a transmissão sináptica, têm grande importância para a formação de LTP (Ben-Ari et al., 1992; Sheu et al., 1993).

Estudos farmacológicos reforçam as evidências em favor da hipótese de que a LTP seja a base da memória, demonstrando que a formação de memória e a LTP podem ser bloqueados no estágio inicial por antagonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA e metabotrópicos, e, nas duas horas iniciais, por inibidores da proteína kinase II e da PKC. Indicam ainda que a evocação da memória depende da atividade dos receptores glutamatérgicos AMPA, já que pode ser bloqueada por antagonistas desses receptores, mas já não é sensível à administração de antagonistas do NMDA. Todos estes efeitos dependem do tipo de aprendizado e da estrutura cerebral em que a droga é injetada (Izquierdo et al., 1992; Izquierdo, 1994; Jerusalinsky et al., 1992).

Ainda que a formação da memória pareça depender basicamente dos mecanismos relacionados às sinapses glutamatérgicas, vários outros sistemas participam da sua modulação. A aquisição da memória envolve uma série de modificações hormonais e neurohumorais, como alteração nos níveis de adrenalina, noradrenalina, ACTH e outros neurotransmissores e peptídeos (Gold e Zornetzer, 1983; Izquierdo, 1982). Estudos demonstram a ação moduladora dos opióides, e opióides endógenos devem participar de um sistema fisiológico de regulação da memória, sendo a β -endorfina o principal destes reguladores (Brioni e Izquierdo, 1988; Gold e Zornetzer, 1983; Izquierdo, 1982; Izquierdo e Netto, 1985; Izquierdo et al., 1985).

Além disso, tem sido demonstrada a ação moduladora do sistema GABAérgico, que será detalhada abaixo.

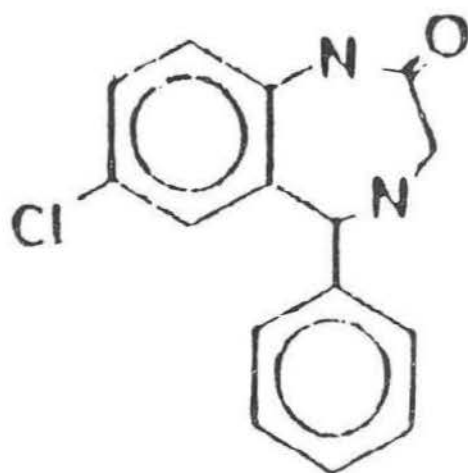
1.2-SISTEMA GABAÉRGICO E RECEPTORES GABA-A / BENZODIAZEPÍNICOS

1.2.1 - Ácido γ -aminobutírico (GABA)

Descrito pela primeira vez no tecido nervoso em 1950 por Roberts e Awapara (McGeer e McGeer, 1989), o ácido γ -aminobutírico (GABA) está presente em aproximadamente 30% das sinapses centrais, sendo o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (Schofield et al., 1987; Sieghart, 1989; Sigel et al., 1983; Stephenson, 1988). Parece estar distribuído em quase todas as áreas do cérebro, e sua concentração é 200 a 1000 vezes maior do que a de neurotransmissores e neuromoduladores como a acetilcolina, a dopamina, a norepinefrina, e a serotonina (McGeer e McGeer, 1989). O efeito predominante do GABA é um aumento da condução de cloro na membrana pós-sináptica, levando a uma hiperpolarização celular e contribuindo assim para inibir a atividade da célula pós-sináptica. (McGeer e McGeer, 1989; Sigel et al., 1983).

Este efeito inibitório clássico do GABA decorre de sua ligação a receptores pós-

sinápticos associados a um canal de cloro. Estes receptores são chamados GABA-A, e apresentam sensibilidade à bicuculina, ao muscimol, ao ácido 3-aminopropanesulfônico e à isoguvacina (McGeer e McGeer, 1989, Mohler e Okada, 1977a). Podem ter sua atividade modulada por uma série de agentes químicos, particularmente os benzodiazepínicos (figura 1), sendo, por isso, também chamados de receptores GABA-A/Benzodiazepínicos ou GABA-A/BZD (De Lorey e Olsen, 1994; Vitorica et al., 1990).



Diazepam

FIGURA 1: Formula estrutural do diazepam, um benzodiazepínico de amplo uso clínico e experimental. Os benzodiazepínicos ligam-se a sítios específicos no receptor GABA-A/Benzodiazepínico, potenciando a transmissão GABAérgica. Neste trabalho, o diazepam foi utilizado como ferramenta farmacológica para manipulação do receptor GABA-A/Benzodiazepínico.

Além destes, existem evidências da existência de outros dois tipos de receptores GABAérgicos, chamados GABA-B e GABA-C (Bowery, 1989; McGeer e McGeer, 1989; Sieghart, 1989; Stephenson, 1988), os quais não iremos descrever detalhadamente.

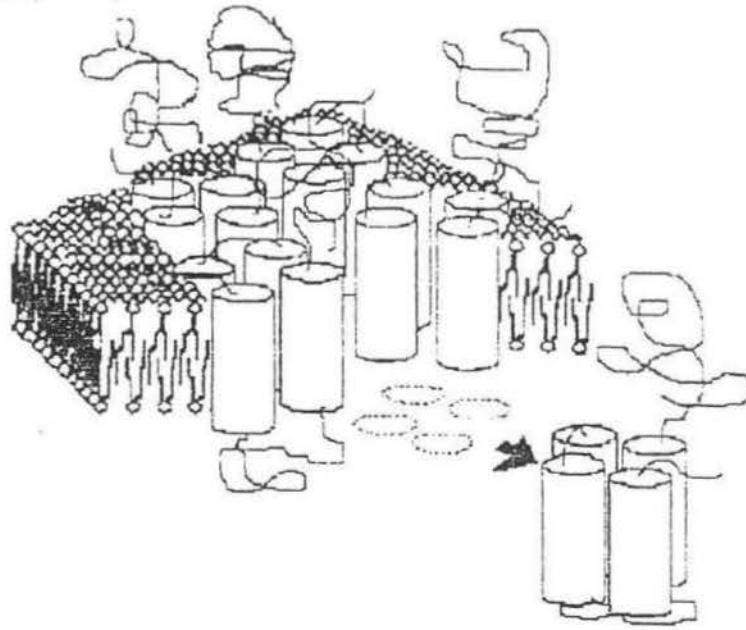
1.2.2 - Estrutura e Distribuição Neuroanatômica dos Receptores GABA-A / Benzodiazepínicos

Os receptores GABA-A/BZD são proteínas transmembrana pos-sinápticas, e, como já visto, sua ativação determina uma alteração conformacional que leva à abertura de um canal de cloro (McGeer e McGeer, 1989). A solubilização e purificação destes receptores foi descrita em vários estudos (Sigel et al., 1983; Sigel e Barnard, 1984; Stephenson, 1988).

Quanto à sua estrutura, foi proposto inicialmente um modelo em que ocorreriam duas subunidades (α e β), e cada molécula do receptor consistiria de duas cópias de cada uma dessas subunidades. Cada subunidade seria um polipeptídeo com quatro domínios hidrofóbicos transmembrana, que formariam a parede do canal de Cl⁻. O sequenciamento das subunidades α e β revelou grandes similaridades entre as suas estruturas, indicando uma possível origem evolucionária comum (Schofield et al., 1987). Além disso, as semelhanças encontradas entre as estruturas do receptor GABA-A/BZD e do receptor colinérgico nicotínico (nAChR) indicaram a existência de uma super-família de receptores, na qual estariam incluídos também canais iônicos ativados pela glicina ou por neurotransmissores excitatórios (Sakmann et al., 1985; Schofield et al., 1987; Stephenson, 1988). Outros estudos demonstraram a ocorrência de diferentes subtipos de polipeptídeos α e β (Levitan et al., 1988; Sieghart, 1989), e, em 1989, Pritchett e colaboradores propuseram a existência de uma nova subunidade (γ 2).

Atualmente, aceita-se a existência de cinco famílias de subunidades (α , β , γ , δ e ρ), cada uma delas podendo apresentar múltiplos subtipos (α -1-6, β 1-4, γ 1-3, δ e ρ 1-2). Cada molécula do receptor seria formada geralmente por uma combinação de cinco subunidades (figura 2), sendo que os seus diversos subtipos provavelmente ocorrem e combinam-se de maneira diferenciada de acordo com a região do cérebro. Formar-se iam assim diferentes subtipos de receptor, cada um deles com características farmacológicas próprias (MacDonald e Olsen, 1994; Olsen e Tobin, 1990).

(a)



(b)

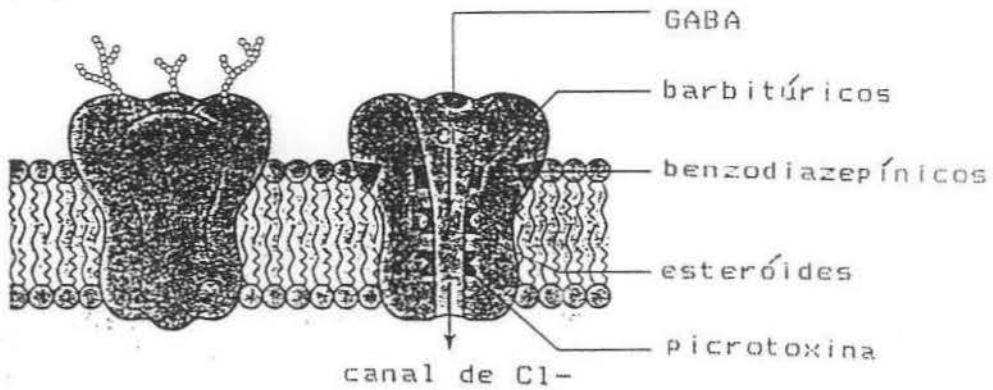


FIGURA 2: Estrutura do receptor GABA-A/Benzodiazepínico. a) modelo mostrando o arranjo entre as subunidades, cada uma possuindo quatro domínios transmembrana que formam o canal de cloro (modificado de Olsen e Tobin, 1990). b) Modelo mostrando os sítios de ligação dos compostos que podem modular a atividade do receptor (DeLorey e Olsen, 1994).

Estudos tem sido realizados na tentativa de determinar as combinações de subunidades existentes em diferentes subtipos de receptor GABA-A/BZD que poderiam ocorrer no cérebro. Sigel e colaboradores, em 1990 (citado por Cherubini et al., 1991) propuseram que o mínimo necessário para a funcionalidade do receptor seria a combinação de uma subunidade α , uma β e uma γ 2. A ocorrência de pelo menos cinco combinações foi proposta por Wisden e colaboradores (1992): α 1 β 2 γ 2, α 2 β 3 γ x, α 5 β 1 γ x, α 1 α 4 β 2 δ , e α 1 α 6 β 2 δ . Os dados também indicam uma grande variação na expressão das diferentes subunidades, de acordo com a região do cérebro. Por exemplo, enquanto a subunidade α 1 tem uma distribuição bastante ampla no SNC de ratos, a α 6 parece ser limitada ao cerebelo (Laurie et al., 1992), e a γ 1 está restrita às regiões límbicas da amígdala, do hipotálamo e do septo (Wisden et al., 1992). Montpied e colaboradores (1988) indicaram uma grande ocorrência de subunidades α no cerebelo, seguido pelo tálamo, córtex frontal, hipocampo, córtex parietal e hipotálamo, com valores mais baixos sendo encontrados na ponte e na medula.

Vários estudos relativos a distribuição neuroanatômica dos receptores GABA-A/BZD indicam a sua predominância nas áreas corticais, e as menores densidades parecem ser encontradas na medula e na ponte, tanto em ratos como em humanos. Valores intermediários podem ser observados, por exemplo, no hipotálamo, no hipocampo, no cerebelo e no estriato (Braestrup et al., 1977; Mohler e Okada, 1977b; Squires e Braestrup, 1977; Young e Kuhar, 1979).

1.2.3 - Farmacologia do Receptor GABA-A/Benzodiazepínico

Vários compostos podem ligar-se a sítios específicos no receptor GABA-A/BZD (figura 2) e modular sua atividade. O muscimol, um isoxazol do tipo psicotropicomimético, é um potente agonista do sítio de ligação do GABA, enquanto a bicuculina age como antagonista deste sítio (Sieghart, 1992). A picrotoxina bloqueia o fluxo de Cl⁻ através do canal (McGeer e McGeer, 1989). Os barbitúricos potênciam a transmissão GABAérgica no receptor GABA-A/BZD ligando-se a uma região associada ao canal de Cl⁻, aumentando assim o tempo médio de abertura deste canal (Malenka et al., 1989; Sieghart, 1992; MacDonald e Olsen, 1994). Alguns esteróides (androsterona e pregnanolona, por exemplo) parecem aumentar tanto o tempo médio quanto à frequência de abertura do canal (Twyman e MacDonald, 1992), e metabólitos de esteróides endógenos poderiam ser moduladores fisiológicos dos receptores GABA-A/BZD (Majewska et al., 1986).

Para os objetivos deste trabalho, é de particular interesse a relação entre os benzodiazepínicos e a transmissão GABAérgica, demonstrada em vários estudos (Briley e Langer, 1978; Costa e Rodbard, 1979; Karobath et al., 1979; Karobath e Sperk, 1979; Tallman et al., 1978). Os benzodiazepínicos ligam-se a um sítio específico no receptor GABA-A/BZD, facilitando a transmissão GABAérgica através do aumento da frequência de abertura do canal de Cl⁻ em resposta à ligação do GABA ao receptor (De Lorey e Olsen, 1994; MacDonald e Olsen, 1994; Malenka et al., 1989; Sieghart, 1992). Este efeito pode ser bloqueado pelo flumazenil, um antagonista específico do sítio receptor benzodiazepínico (Hunkeler et al., 1981). Sabe-se também que o GABA e os

benzodiazepínicos exercem uma ação modulatória alostérica recíproca sobre a ligação um do outro (MacDonald e Olsen, 1994; Malenka et al., 1989; Sieghart, 1992).

O papel que as várias subunidades desempenham na ligação destes moduladores ao receptor GABA-A/BZD tem sido determinado. A variação do subtipo de subunidade α em combinação com subtipos constantes de subunidades β e γ parece alterar a resposta do receptor aos benzodiazepínicos, a interação GABA-benzodiazepínico, e o efeito modulatório dos esteróides, mas não causa diferenças na sensibilidade aos barbitúricos, à picrotoxina ou à bicuculina. A natureza da subunidade γ aparentemente confere a sensibilidade do receptor aos benzodiazepínicos: enquanto a presença da subunidade $\gamma 2$ define um receptor com alta afinidade, a ocorrência da subunidade $\gamma 1$ leva a uma baixa afinidade por estes fármacos (MacDonald e Olsen, 1994). Além disso, a presença da subunidade $\alpha 1$ em um receptor sensível aos benzodiazepínicos caracteriza um sítio de ligação para benzodiazepínicos com afinidade pelo CL 218,872. Este receptor é chamado receptor benzodiazepínico de tipo 1 (Pritchett et al., 1989). Por outro lado, a ocorrência de subunidades $\alpha 2$, 3 ou 5 caracteriza o receptor benzodiazepínico de tipo 2 (Sieghart e Drexler, 1983). Sabe-se também que a administração crônica de diazepam pode alterar a expressão da subunidade $\alpha 1$ no cérebro de ratos (Heninger et al., 1990).

1.3 - HISTÓRICO E UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS BENZODIAZEPÍNICOS

Os benzodiazepínicos passaram a ser sintetizados a partir da década de 1930. O clordiazepóxido, desenvolvido na década de 1950 por Sternbach e seus colaboradores nos laboratórios da Roche, foi o primeiro benzodiazepínico a ser utilizado com sucesso em experimentos com animais, e, mais tarde, em tratamentos clínicos (Baldessarini, 1985). Os compostos deste tipo que tem sido sintetizados apresentam propriedades ansiolítica, sedativa, anticolvulsivante e relaxante muscular, e grandes doses podem levar a hipnose e a perda de consciência (Marshall e Wollman, 1985; Reves et al., 1985).

Os benzodiazepínicos foram primeiramente utilizados clinicamente no tratamento da ansiedade (Marshall e Wollman, 1985), e permanecem como as drogas ansiolíticas mais consumidas atualmente (Baldessarini, 1985; Lader, 1987). Além disso, são amplamente utilizados como medicação pré-anestésica (Lader, 1987; Marshall e Wollman, 1985; Smith e Wollman, 1985), e no tratamento de insônia, espasmos musculares, distúrbios relacionados ao stress e epilepsia (Lader, 1987). Nas doses utilizadas clinicamente, apresentam poucos efeitos sobre os sistemas cardiovascular, respiratório e gastrointestinal (Kanto e Allonen, 1983; Reves et al., 1985), mas há vários estudos que indicam a ocorrência de dependência e tolerância em indivíduos submetidos a altas doses de benzodiazepínicos por longos períodos (Lader et al., 1987; Miller et al., 1989; Owen e Tyrer, 1983; Rickels et al., 1983).

Recentemente, foi descrita a existência de moléculas semelhantes a benzodiazepínicos no tecido nervoso de mamíferos, inclusive nas vesículas sinápticas, sugerindo um papel fisiológico para as mesmas (Izquierdo et al., 1990).

1.4 - AÇÃO MODULATÓRIA DOS RECEPTORES GABA-A / BENZODIAZEPÍNICOS SOBRE A MEMÓRIA: PAPEL DOS BENZODIAZEPÍNICOS

O envolvimento dos receptores GABA-A/BZD na modulação da memória foi demonstrado primeiramente em estudos em que injeções pós-treino do bloqueador do canal de cloro picrotoxina melhoraram o aprendizado de ratos em um labirinto (Breen e McGaugh, 1961). Estudos posteriores com picrotoxina e com a bicuculina comprovaram que as drogas que deprimem a transmissão GABAérgica tendem a melhorar a memória. Este efeito depende da dose utilizada, bem como do intervalo de tempo entre a administração da droga e a realização da tarefa comportamental (Brioni e McGaugh, 1988; Brioni et al., 1989; Castellano e McGaugh, 1990; McGaugh, 1989). Por outro lado, foi demonstrado posteriormente que o agonista GABAérgico muscimol tem um efeito deletério sobre a memória em uma série de tarefas comportamentais, sendo também este efeito dose-dependente e tempo-dependente (Brioni et al., 1990; Castellano et al., 1989; Castellano e McGaugh, 1990; Chrobak et al., 1989; Nagahara e McGaugh, 1992).

Assim como o muscimol, os benzodiazepínicos, como potenciadores da transmissão GABAérgica, deprimem a formação de novas memórias. Este efeito amnésico foi observado em humanos, inicialmente em pacientes que receberam benzodiazepínicos como medicação pré-anestésica (Pandit e Dundee, 1970; Pandit et al., 1971; Dundee e Pandit, 1972). Observações clínicas posteriores indicaram a ocorrência de amnésia após a utilização do diazepam intravenoso em cirurgia oral e tratamentos dentários (Clarke et al., 1970), bem como após a administração oral de diazepam (Jones et al., 1978), e uma série de outros estudos tem confirmado que indivíduos tratados com este benzodiazepínico apresentam deficiências na aquisição da memória em diferentes tarefas (Hinrichs et al., 1982; Petersen e Ghoneim, 1980). Brown e colaboradores (1982) indicaram que a amnésia induzida por diazepam apresenta similaridades com aquela associada a danos orgânicos.

Estudos das propriedades amnésicas dos benzodiazepínicos em animais de laboratório foram realizados em 1961, por Heise e McConnell, e Randall e colaboradores, que demonstraram os efeitos do clordiazepóxido e do diazepam sobre ratos em uma tarefa de esquiva. Mais tarde, foi observado o efeito do clordiazepóxido sobre o desempenho de ratos em uma tarefa de Esquiva Inibitória (Oishi et al., 1972), e, em 1976, Soubrie e colaboradores estudaram o efeito amnésico anterógrado de benzodiazepínicos em ratos treinados em um procedimento envolvendo uma resposta emocional condicionada. Gamzu e colaboradores, em 1979, descreveram um modelo de Esquiva Inibitória através do qual observaram a amnésia induzida pela administração pré-treino de varios benzodiazepínicos em camundongos (Gamzu, 1987; Gamzu, 1988). Ainda no mesmo ano, Patel e colaboradores realizaram um estudo que indicava um efeito amnésico dose-dependente de benzodiazepínicos, notadamente o lorazepam e o diazepam, sobre camundongos em Esquiva Inibitória.

Atualmente, os efeitos amnésicos dos benzodiazepínicos em animais já foram descritos em várias tarefas comportamentais, como diferentes tipos de Esquiva Inibitória (Brioni e Izquierdo, 1986; Venault et al., 1986), habituação a novos ambientes (Venault et

al., 1986), Esquiva Ativa (Pereira et al., 1988), e labirintos aquáticos (McNamara e Skelton, 1991).

Estudos recentes sugerem ainda que benzodiazepínicos endógenos podem estar envolvidos na modulação da memória (Izquierdo et al., 1990). Também tem sido estudados os efeitos de antagonistas e agonistas inversos do sítio receptor benzodiazepínico sobre a memória, demonstrando que tanto o flumazenil como as β -carbolinas tendem a melhorar o processo de aquisição da memória (File e Pellow, 1988; Gentil et al., 1989; Lal et al., 1988; Venault et al., 1986).

1.5 - ONTOGENIA DOS RECEPTORES GABA-A/BENZODIAZEPÍNICOS

Vários pesquisadores tem investigado o processo de maturação do sistema GABAérgico, em particular do sítio receptor benzodiazepínico. Foram demonstradas alterações ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal, quanto aos seguintes aspectos: (1) expressão de diferentes subunidades do receptor GABA-A/BZD, de acordo com a estrutura cerebral e o estágio de desenvolvimento, tendo esta expressão diferenciada consequências sobre a afinidade dos receptores pelos seus ligantes (Laurie et al., 1992, Vitorica et al., 1990), (2) alterações de número e concentração dos receptores no cérebro (Braestrup e Nielsen, 1978; Palacios et al., 1979) e (3) um possível papel predominantemente excitatório da neurotransmissão GABAérgica, que ocorreria somente durante o período neonatal (Cherubini et al., 1991). Sabe-se também que as três primeiras semanas de vida pós-natal parecem ser o período crítico para a ontogênese dos receptores GABA-A/BZD (Coen et al., 1983, citado por Cuomo, 1987), e que a administração de benzodiazepínicos durante o período pré-natal pode interferir sobre a mesma (Cuomo, 1987, Rementeria e Bhatt, 1977). Abaixo serão analisadas com maiores detalhes as alterações de estrutura, número e densidade.

1.5.1 - Alterações na Estrutura dos Receptores

A expressão diferenciada, de acordo com a idade, das subunidades β 1-3 (Zhang et al., 1991), bem como das subunidades α 1-5 e β 1 do receptor GABA-A/BZD no SNC de ratos foi demonstrada em vários estudos. (Montpied et al., 1989; Garrett et al., 1990; MacLennan et al., 1991; McKernan et al., 1991, citados por Laurie et al., 1992) Padrões distintos de expressão das subunidades α 1, α 2 e α 4 ao longo do desenvolvimento foram relatados por MacLennan et al., em 1991, e estudos semelhantes referentes à expressão dos mRNAs das subunidades α 1, α 5, e γ 2 foram descritos por Bovolin e colaboradores (1992). Em experimentos com anticorpos capazes de reconhecer as subunidades α e β , Vitorica e colaboradores (1990) acompanharam o desenvolvimento pós-natal dos receptores GABA-A/BZD no cérebro de ratos e sugeriram que a subunidade β permaneceria estável durante o desenvolvimento, o mesmo não ocorrendo com a subunidade α , que apresentaria heterogeneidade. MacLennan e colaboradores (1991)

encontraram um aumento bastante pronunciado do mRNA da subunidade $\alpha 1$ entre 7 e 38 dias após o nascimento, período em que o mRNA da subunidade $\alpha 2$ também atingiu o nível máximo de concentração. O mRNA da subunidade $\alpha 4$, por sua vez, pareceu atingir o nível máximo no sétimo dia após o nascimento, decaindo depois para os níveis adultos em torno de 21 dias.

O mapeamento dos mRNAs de 13 subunidades ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$ e δ) em diferentes estruturas do cérebro de rato, ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal, foi realizado por Laurie e colaboradores (1992). Em torno de 14 dias de gestação, apenas as subunidades $\alpha 2$, 3 e 5 puderam ter suas presenças detectadas. Algumas subunidades ($\alpha 5$ e $\beta 1$, por exemplo), atingiram seu pico de expressão alguns dias após o nascimento e declinaram na vida adulta na maior parte das estruturas analisadas, enquanto outras, como a $\alpha 1$ e a δ , tiveram sua maior expressão na vida adulta em todas as estruturas.

As variações na expressão dos receptores benzodiazepínicos de tipo 1 e 2 ao longo do desenvolvimento também foram bastante estudadas. No cérebro neonatal, ocorreria principalmente o receptor de tipo 2, e o de tipo 1 só começaria a aumentar sua expressão após a primeira semana de vida (Lippa et al., 1981; Sato e Neale, 1989; Vitorica et al., 1989).

1.5.2 - Alterações de Número e Densidade de Receptores no Cérebro

A dosagem de receptores GABA-A/BZD em cérebros de ratos de diferentes idades tem indicado uma grande variabilidade em seu número e em sua densidade ao longo do desenvolvimento. Foi demonstrado que o sítio de ligação ao GABA encontra-se em níveis muito baixos no período neonatal (10% dos valores adultos no segundo dia após o nascimento), e aumenta rapidamente durante as três primeiras semanas de vida. O sítio receptor benzodiazepínico, por outro lado, parece apresentar 30% dos níveis adultos no segundo dia de vida no cerebelo, e 50% no restante do cérebro, aumentando seus níveis em uma taxa constante até em torno de 3-4 semanas de vida (Palacios et al., 1979).

Outros estudos (Braestrup e Nielsen, 1978) indicaram que, no dia do nascimento, a concentração de sítios benzodiazepínicos no cérebro de ratos é de 35,4% dos valores adultos, representando apenas 2,5% do número total encontrado em adultos. A máxima concentração parece ser atingida em torno de uma semana de vida, e o número total de sítios aparentemente cresce até atingir um platô em torno de 4 semanas de vida.

Em humanos, os sítios benzodiazepínicos parecem atingir a densidade similar a de cérebros adultos em torno de 45 semanas após a concepção no tálamo, na medula, na ponte e na oliva. No córtex frontal e no cerebelo ocorre ainda um grande aumento na densidade no período pós-natal, possivelmente até em torno de um ano e seis meses de idade (Reichelt et al., 1991).

Os dados aqui apresentados indicam que a composição estrutural (e possivelmente as propriedades farmacológicas), a distribuição e a densidade dos receptores GABA-A/BZD encontrados no cérebro de ratos e humanos adultos difere daquela observada em diferentes estágios do desenvolvimento. Portanto, poderíamos supor que um mesmo tratamento com benzodiazepínicos poderia determinar efeitos distintos, de acordo com a

idade do indivíduo. Já existem estudos clínicos que indicaram a ocorrência de efeitos diferenciados de benzodiazepínicos em pacientes jovens e adultos (Lanius et al., 1993). Entretanto, não existem na literatura estudos farmacológicos anteriores referentes a alterações comportamentais induzidas por benzodiazepínicos em animais de diferentes idades, especialmente no que se refere ao efeito destes fármacos sobre os processos de aprendizagem e memória. Assim, pareceu-nos importante observar neste trabalho os efeitos de um benzodiazepínico sobre a memória em ratos de diferentes idades.

2 - OBJETIVOS

Este trabalho de dissertação tem como objetivos:

2.1 - Avaliar o efeito da administração pré-treino de um agonista do sítio receptor benzodiazepínico no receptor GABA-A/BZD, o diazepam, sobre a memória de ratos jovens (em torno de 30 dias de idade), ou adultos (em torno de 60 dias de idade), na tarefa de Esquiva Inibitória.

2.2 - Avaliar o efeito do diazepam pré-treino sobre a memória de ratos de 60 dias ou de 30 dias de idade na tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias.

2.3 - Avaliar o efeito do diazepam pré-treino sobre o desempenho de ratos de 60 dias ou de 30 dias de idade em uma tarefa não-aversiva, a Habituação ao Campo Aberto.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas adultos (58-69 dias de idade) e jovens (30-32 dias de idade), obtidos no Bioterio do Instituto de Biociências da UFRGS. Os animais dispunham de água e comida "ad libitum", e eram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

3.2 - PROCEDIMENTOS FARMACOLÓGICOS

Diazepam (Roche) foi dissolvido em solução veículo (40% de propilenoglicol, 10% de álcool etílico, 15% de álcool benzílico, 5g% de ácido benzoico, 48,5% de água destilada, pH=7,4), nas concentrações de 0,2 , 1,0 e 5,0 mg/ml.

O diazepam foi injetado por via i.p., nas doses de 0,2 , 1,0 ou 5,0 mg/kg, 60 minutos antes da sessão de treino na tarefa comportamental. O grupo controle recebeu solução veículo.

3.3 - PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

3.3.1 - *Esquiva Inibitória*

Foi realizada em uma caixa de acrílico com 50 cm de largura, 25 cm de altura e 25 cm de profundidade, sendo que a face frontal era constituída de um vidro transparente.

O assoalho da caixa consistia de uma grade formada por barras paralelas de bronze, na qual podia-se aplicar uma diferença de potencial. Na extremidade esquerda da caixa, havia uma plataforma de madeira revestida com fórmica, com 7 cm de largura por 5 cm de altura (para ratos adultos), ou 4 cm de largura por 2,5 cm de altura (para ratos de 30 dias).

Na sessão de treino, os animais eram colocados gentilmente no interior da caixa de condicionamento, sobre a plataforma, voltados para o canto superior esquerdo da caixa. Cronometrava-se o tempo de descida dos animais (com as quatro patas) da plataforma para o assoalho da caixa. Os animais então recebiam choques nas patas, com intensidade de 0,4 mA e duração de 6 segundos. Na sessão de teste, realizada 24 horas depois, os animais eram novamente colocados na caixa, e novamente, era cronometrado o tempo de descida da plataforma. A diferença de latência para a descida entre as sessões de teste e de treino era tomada como medida de memória. Foi utilizado um limite máximo de tempo para a descida de 300 s, sendo que os animais que ultrapassavam este limite sem descer da plataforma eram computados com este valor.

3.3.2 - *Esquiva Ativa de Duas Vias*

Foi realizada em uma caixa de condicionamento com as mesmas dimensões da caixa utilizada na tarefa de Esquiva Inibitória, sendo o assoalho constituído de barras de bronze. Na sessão de treino os animais passavam por um período de adaptação de 2 minutos, após o que eram emitidos 30 tons (1,0 KHZ, 5s, 70 dB), em intervalos irregulares. Cada ton era seguido de um choque nas patas (0,3 mA), aplicado no lado da caixa em que o animal estivesse. O choque era mantido até que o animal cruzasse para o outro lado da caixa. Para evitar o choque, os animais deveriam aprender a emitir a resposta de cruzamento durante a apresentação do choque (esquiva). A apresentação dos estímulos e o registro de respostas de cruzamento e de esquiva eram automáticos. A sessão de teste era realizada 24h depois, e a diferença teste-treino do número de respostas de esquiva foi tomada como medida de memória, e referida nos gráficos como escore de retenção.

3.3.3 - *Habituação ao Campo Aberto*

Foi realizada em uma caixa de condicionamento de madeira envernizada, com as dimensões de 60 cm de largura, 40 cm de profundidade e 50 cm de altura, sendo a face frontal constituída de vidro transparente. O assoalho da caixa consistia de uma superfície de linóleo dividida com linhas escuras em doze quadrados idênticos, de 15 X 13 cm.

Na sessão de treino, os animais eram colocados gentilmente no canto posterior esquerdo da caixa, com a face voltada para a parede, e exploravam livremente o ambiente durante dois minutos. Contava-se o número de respostas de orientação ("rearings") e o número de cruzamentos pelas linhas desenhadas no assoalho ("crossings"). Na sessão de teste, 24 horas depois, repetia-se o mesmo procedimento, e o número de respostas de orientação e cruzamentos era novamente observado. A diferença entre o número de respostas de orientação entre as sessões de teste e de treino foi tomada como medida de memória. O número de cruzamentos permitiu avaliar alterações na atividade locomotora.

3.4 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Dados não-paramétricos (diferença de latência teste-treino em Esquiva Inibitória) foram avaliados pela Análise de Variância de Kruskal-Wallis; no caso de haver diferença, aplicou-se o Teste de Comparações Múltiplas de Dunn. Dados paramétricos (diferença teste-treino no número de respostas de Esquiva Ativa, respostas de orientação, número de cruzamentos em Habituação) foram avaliados com o emprego de ANOVA, seguido do Teste *t* de Student para Amostras Dependentes, e do Teste de Newman-Keuls, quando necessário.

4 - RESULTADOS

Em todos os experimentos descritos neste trabalho, as tarefas comportamentais são utilizadas como modelos de medição da memória em ratos. Para todas as tarefas, um prejuízo no desempenho no teste é interpretado como deficiência de memória, enquanto uma melhora no desempenho indica facilitação da memória.

4.1 - ESQUIVA INIBITÓRIA

Em ratos adultos (figura 3), o diazepam prejudicou o desempenho no teste nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg. Já na dose de 0,2 mg/kg, o valor dos intervalos interquartis indica uma melhora do desempenho, sugerindo que, nesta dose, o diazepam causou uma facilitação da memória.

Os resultados referentes aos ratos jovens (figura 4) mostram um prejuízo do desempenho em todas as doses utilizadas.

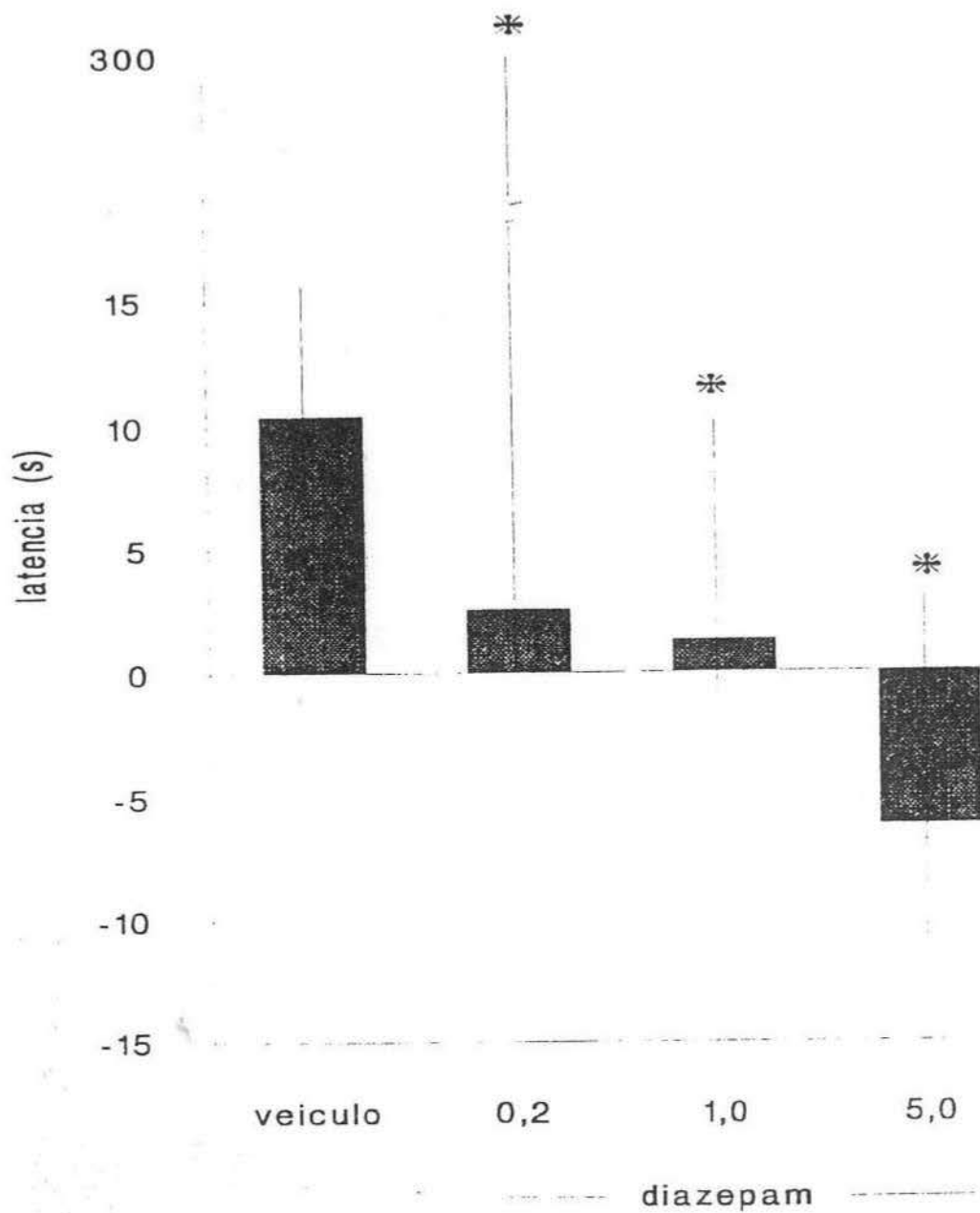


FIGURA 3: Efeito do diazepam pré-treino, via i.p., sobre o desempenho de ratos de 60 dias de idade em Esquiva Inibitória. Valores expressos como latência para descida da plataforma (s). N = 11-14 animais por grupo. *Diferença significativa dos demais grupos ($p < 0,05$).

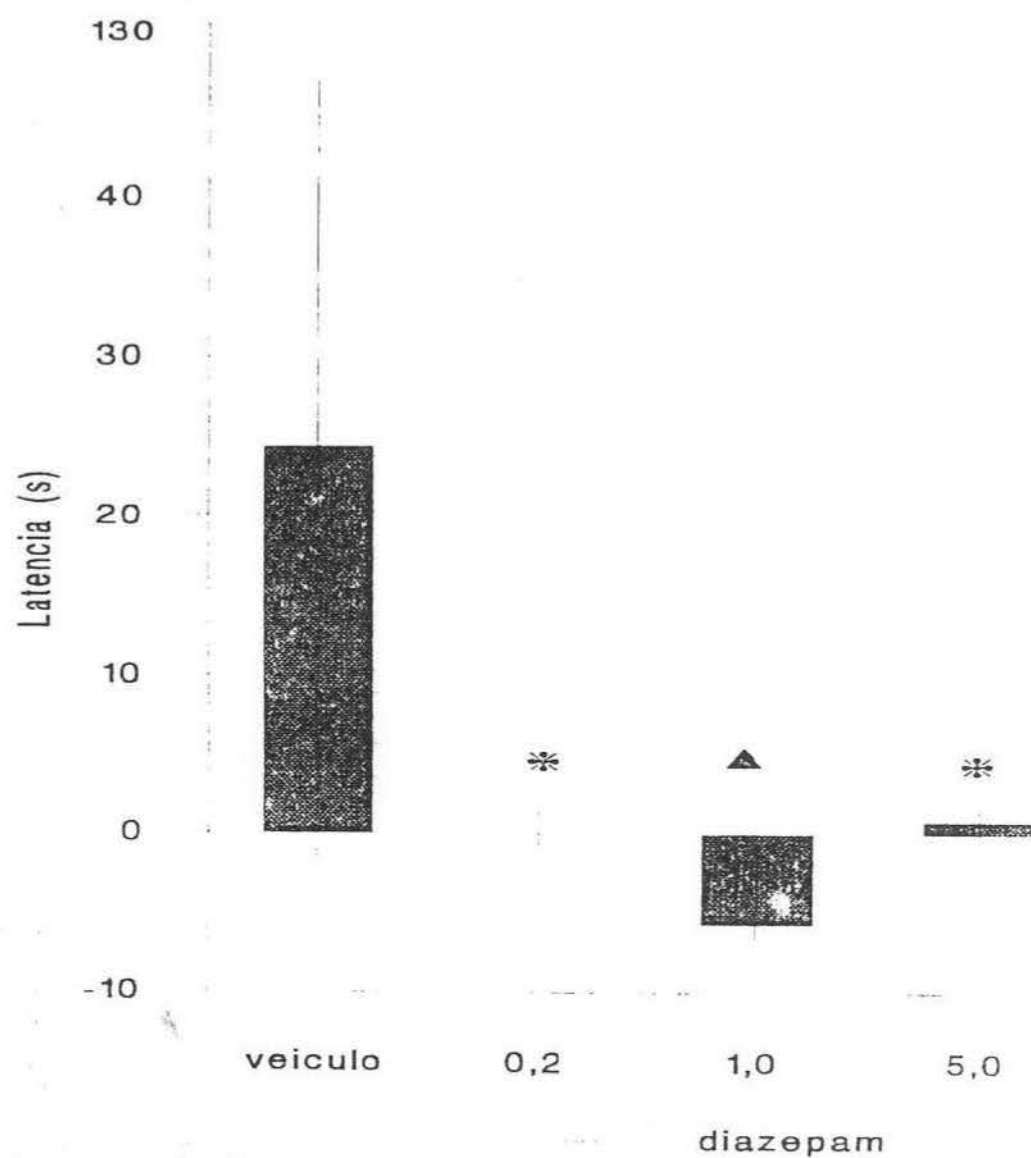
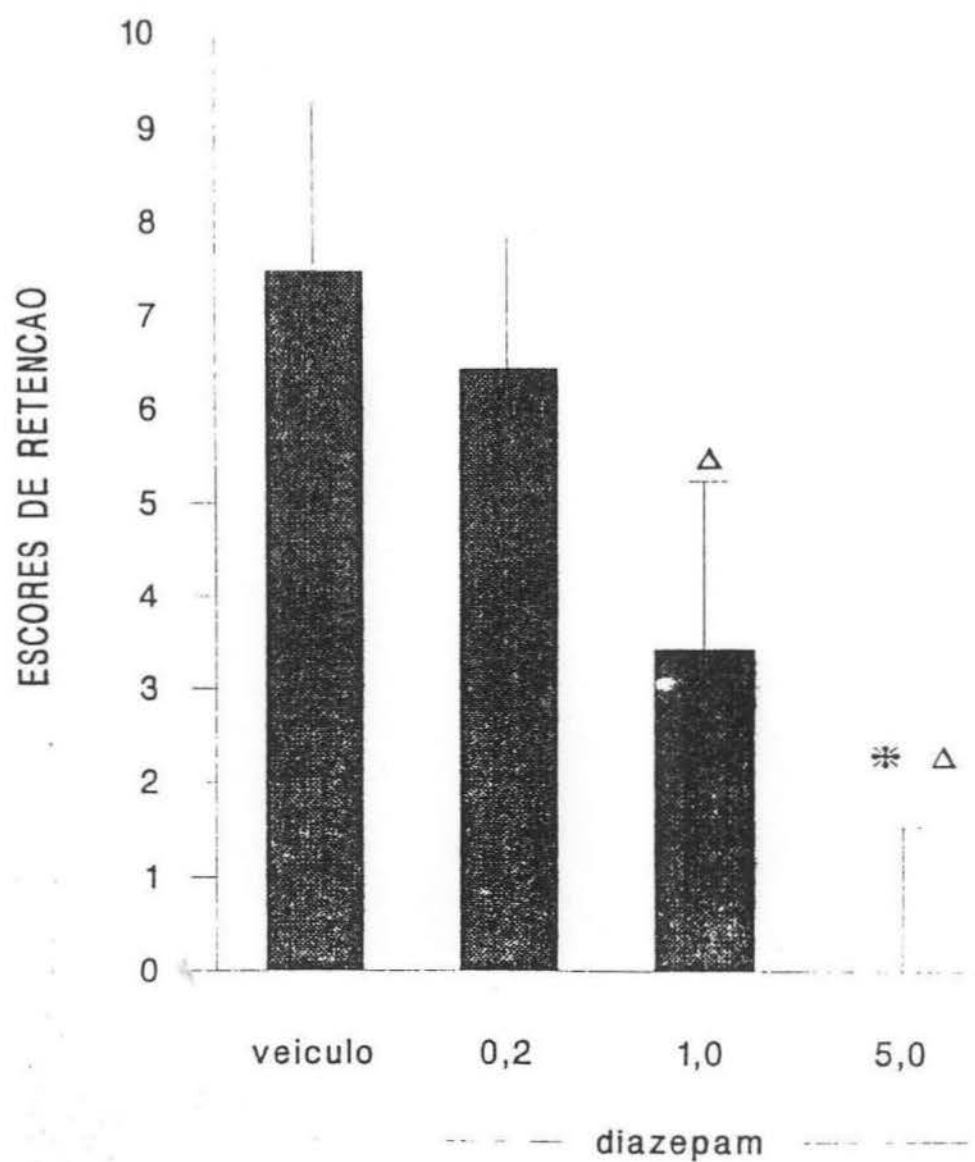


FIGURA 4: Efeito do diazepam sobre o desempenho de ratos de 30 dias de idade em Esquiva Inibitória. Valores expressos como latência para descida da plataforma (s). N = 9-12 animais por grupo. *Diferença significativa do grupo controle ($p < 0,05$). ▲Diferença significativa dos demais grupos ($p < 0,05$).

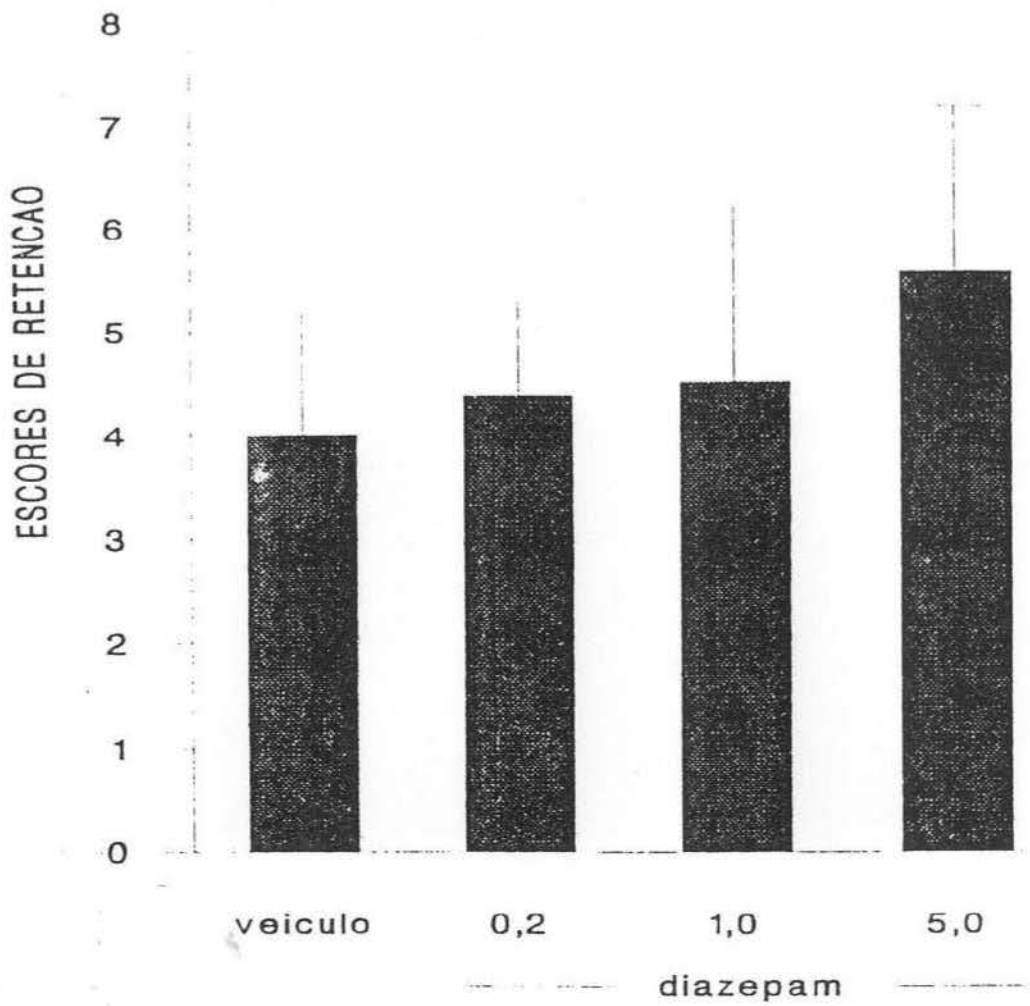
4.2 - ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Nesta tarefa, o diazepam prejudicou o desempenho dos ratos adultos nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, enquanto a dose de 0,2 mg/kg não apresentou efeito sobre a memória (figura 5).

Já nos ratos jovens, não foi observado prejuízo do desempenho em nenhuma dose utilizada, sugerindo que, nesta idade, o diazepam não tem efeito sobre a memória da tarefa de Esquiva Ativa (figura 6).



• **FIGURA 5:** Efeito do diazepam sobre o desempenho de ratos de 60 dias de idade em Esquiva Ativa de Duas Vias. Valores expressos como escores de retenção (δ de fugas teste-treino). N = 13-15 animais por grupo. Δ Diferença significativa entre sessão de treino e sessão de teste ($p < 0,05$). * Diferença significativa dos demais grupos ($p < 0,05$).



* **FIGURA 6:** Efeito do diazepam sobre o desempenho de ratos de 30 dias de idade em Esquiva Ativa de Duas Vias. Valores expressos como escores de retenção (δ de fugas teste-treino). N = 22-26 animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

4.3 - HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

Os resultados observados em ratos adultos e jovens nesta tarefa tiveram padrões semelhantes. A observação do número de respostas de orientação (que indica memória) mostrou que: houve prejuízo do desempenho em todas as doses utilizadas, em ambas as idades. A dose mais alta (5,0 mg/kg), entretanto, afetou a performance no treino, dificultando a interpretação dos resultados em termos de memória.

O outro parâmetro avaliado nesta tarefa (número de cruzamentos) mostrou que o diazepam provocou um aumento no número de cruzamentos na sessão de treino, em relação ao grupo controle, na dose de 1,0 mg/kg, e um aumento ainda maior foi observado na dose de 5,0 mg/kg. Este efeito também foi semelhante para os ratos de ambas as idades (Tabela I).

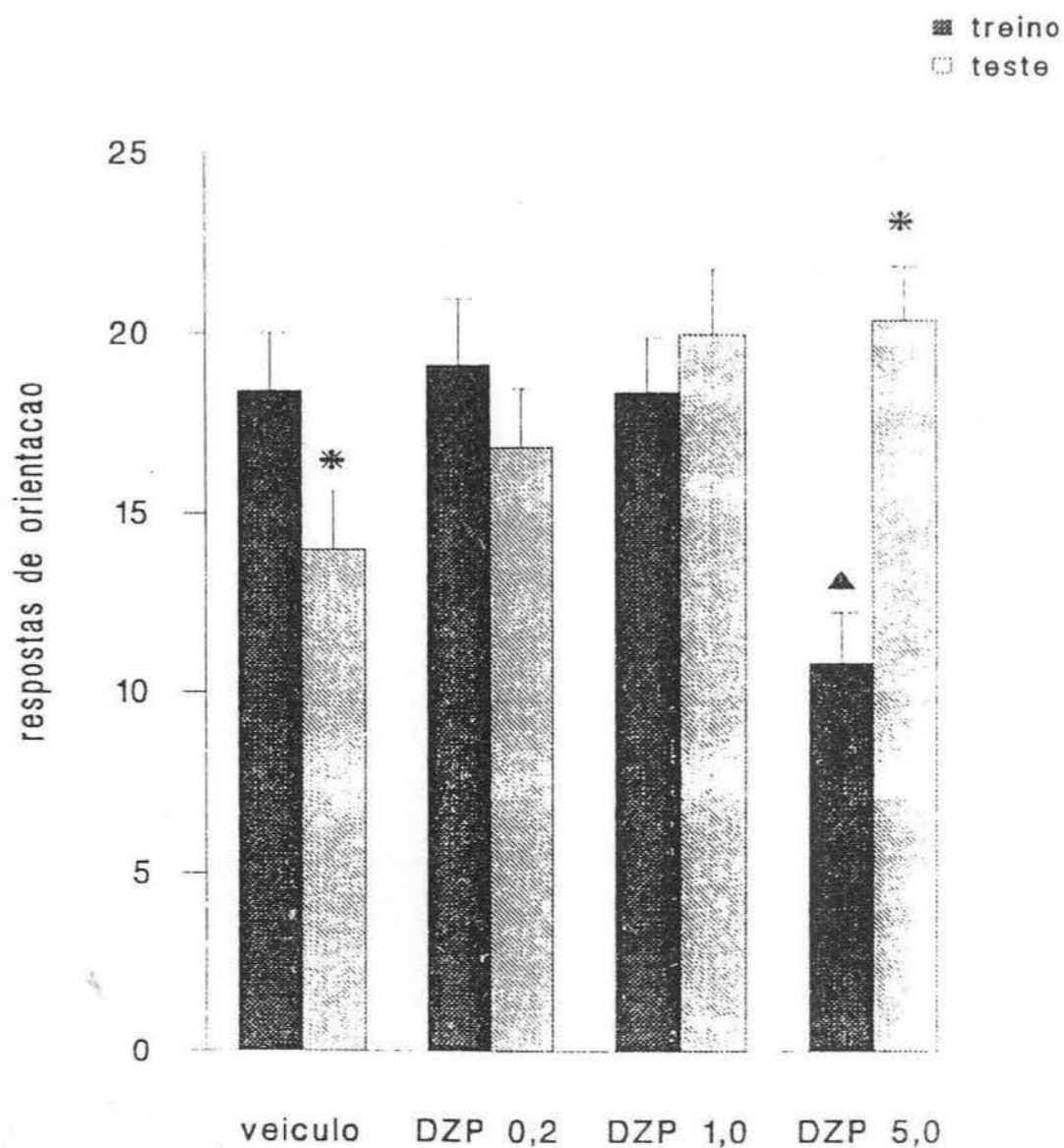


FIGURA 7: Efeito do diazepam sobre o desempenho de ratos de 60 dias de idade em Habituação ao Campo Aberto. Valores expressos como número de respostas de orientação (média + erro padrão). N = 12-13 animais por grupo. *Diferença significativa entre sessão de treino e sessão de teste ($p < 0,05$). ▲ Diferença significativa dos demais grupos na sessão de treino ($p < 0,05$).

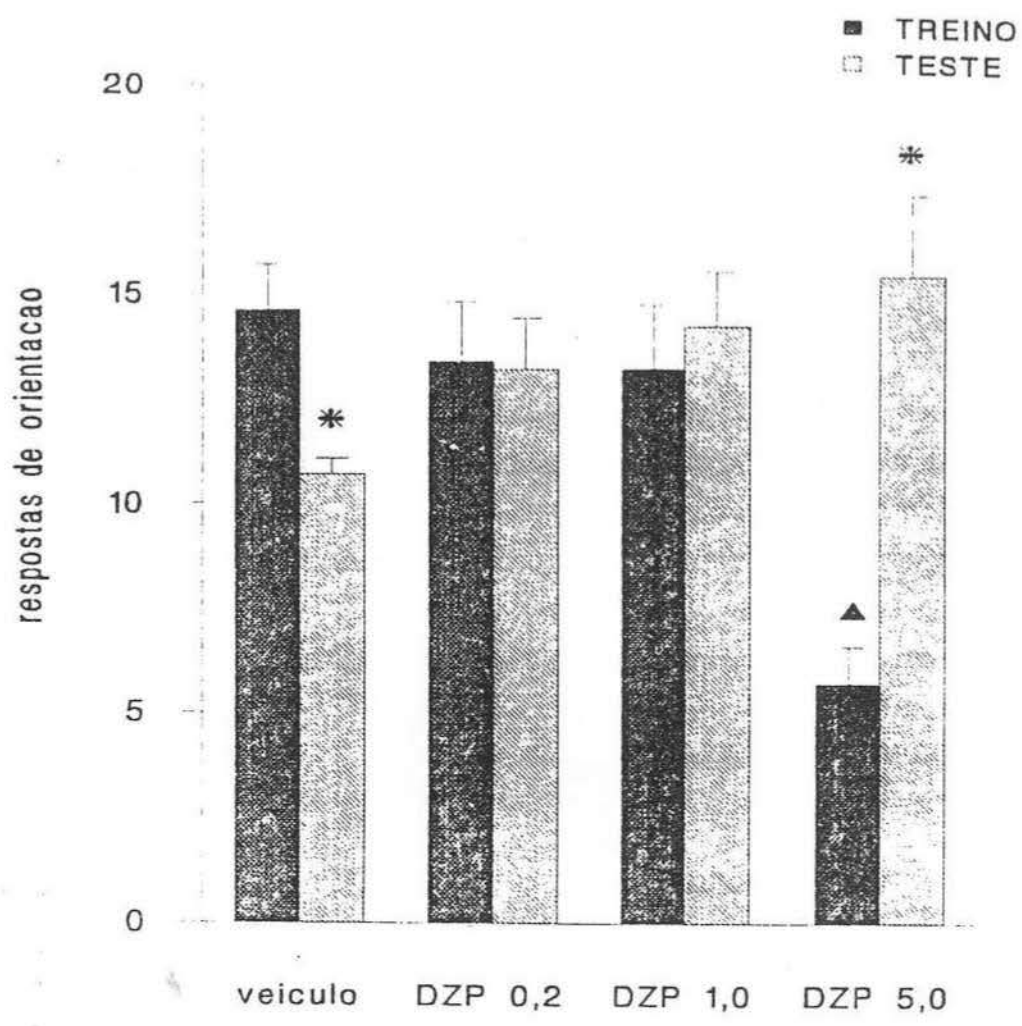


FIGURA 8: Efeito do diazepam sobre o desempenho de ratos de 30 dias de idade em Habituação ao Campo Aberto. Valores expressos como número de respostas de orientação (média + erro padrão). N = 12-15 animais por grupo. *Diferença significativa entre sessão de treino e sessão de teste ($p < 0,05$), ▲ Diferença significativa dos demais grupos na sessão de treino ($p < 0,05$).

TABELA I

Efeito do diazepam sobre o número de cruzamentos de ratos de 60 dias ou de 30 dias de idade na sessão de treino da tarefa de Habituação ao Campo Aberto (média \pm erro padrão).

Tratamento	Ratos de 60 dias		Ratos de 30 dias	
	n	cruzamentos	n	cruzamentos
Veículo	13	54,85 \pm 3,28	15	49,93 \pm 4,02
DZP 0,2 mg/kg	13	57,62 \pm 2,55	13	49,92 \pm 4,62
DZP 1,0 mg/kg	12	76,00 \pm 4,84*	13	70,15 \pm 5,34*
DZP 5,0 mg/kg	12	84,75 \pm 3,90*	12	88,75 \pm 5,19*

* Diferença significativa em relação aos demais grupos de ratos da mesma idade ($p < 0,05$).

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, procuramos comparar os efeitos do diazepam sobre a memória de ratos jovens (30 dias) e adultos (60 dias). Como vimos na introdução, há um grande número de estudos, tanto no campo da biologia molecular (descrição da estrutura dos receptores, e expressão de suas subunidades ao longo do desenvolvimento), quanto da bioquímica (ensaios de "binding" a partir de preparações de células nervosas de animais de diferentes idades), que descrevem alterações nos receptores GABA-A/BZD durante a ontogenia. Não há, no entanto, estudos anteriores no campo da neurofarmacologia, particularmente no que se refere ao estudo farmacológico da memória, que abordem a questão da ontogenia dos receptores GABA-A/BZD. Assim, o presente trabalho pretende estudar algumas implicações comportamentais de um fenômeno até agora apenas descrito a nível bioquímico e molecular.

Começamos discutindo algumas questões metodológicas. A primeira refere-se à escolha das idades dos animais experimentais. A opção pela idade de 60 dias para a realização dos experimentos com os ratos adultos teve como base dados anteriores da literatura (Cuomo, 1987), que indicam que, nesta idade, o SNC do rato atinge a completa maturação. Ratos desta idade tem sido utilizados em vários estudos farmacológicos que procuram avaliar os efeitos de drogas psicotrópicas em adultos (Cuomo, 1987).

Por outro lado, ratos de 30 dias de idade (considerados neste estudo como ratos jovens), apresentam o SNC ainda em processo de maturação, apesar de que as alterações mais significativas parecem ocorrer durante as três primeiras semanas de vida (Cuomo, 1987). Tentativas de realização de experimentos como os descritos no presente trabalho com ratos ainda mais jovens (15 e 20 dias), em nosso laboratório, não foram bem sucedidas. Isso parece decorrer tanto da desproporção entre as dimensões das nossas caixas de condicionamento e dos ratos nessas idades, como também de características comportamentais observadas nestes animais. Por exemplo, o número de respostas de orientação de ratos de 15 ou 20 dias de idade na tarefa de Habituação é muito baixo em relação aos apresentados pelos ratos adultos, para o mesmo tempo de observação, dificultando a comparação entre os grupos (dados não mostrados).

Outra questão metodológica a ser discutida é a escolha do diazepam como ferramenta farmacológica para a manipulação dos receptores GABA-A/BZD. Isto deveu-se a vários fatores: (1) o diazepam tem um efeito específico bem descrito a nível de SNC, que decorre, como já visto, de sua ligação ao sítio benzodiazepínico no receptor GABA-A/BZD. Não apresenta efeitos sobre outros tipos de receptores, e nem sobre o Sistema Nervoso periférico ou sobre outros sistemas do organismo; (2) grande parte dos estudos bioquímicos que tratam da ontogenia dos receptores GABA-A/BZD utilizam-se de benzodiazepínicos como ferramenta de estudo destes receptores (um exemplo são os estudos de dosagem de receptores em cérebros de ratos de diferentes idades realizados por Braestrup e Nielsen, 1978); (3) os benzodiazepínicos, e o diazepam em particular, têm um efeito bem descrito sobre a memória (ver introdução); (4) o estudo dos benzodiazepínicos, em comparação com outros ligantes do receptor GABA-A/BZD, tem maior relevância clínica, uma vez que são fármacos amplamente utilizados na prática

médica.

Feitas essas considerações, passaremos a discussão dos resultados obtidos em cada tarefa.

5.1 - ESQUIVA INIBITÓRIA

Nesta tarefa, observou-se um efeito deletério sobre a memória nas duas doses mais altas de diazepam, em adultos, e em todas as doses utilizadas, nos ratos jovens. O efeito facilitador da dose mais baixa (0,2 mg/kg), observado nos animais adultos, foi indicado pelo grande número de animais que permaneceram na plataforma durante 300 segundos (Gráfico 1). Os intervalos interquartis revelam, no entanto, uma grande dispersão de dados, ou seja, esta dose parece ter facilitado a memória da maior parte dos ratos, enquanto teve um efeito amnésico em outros. Estudos anteriores indicam que, em humanos, o efeito de doses baixas de benzodiazepínicos sobre a memória podem variar de acordo com o grau de ansiedade do indivíduo. Assim, enquanto sujeitos com baixo grau de ansiedade teriam a memória prejudicada pelos benzodiazepínicos, em indivíduos mais ansiosos estes fármacos poderiam facilitar o processo de memorização (Desai et al., 1983). Este efeito pode ser explicado da seguinte forma: uma vez que a ansiedade tem um efeito deletério sobre a memória (Eysenck, 1977, citado por Desai, 1983), o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos em indivíduos ansiosos poderia resultar em melhora no aprendizado (Desai et al., 1983). Estes elementos poderiam servir como base para uma possível interpretação dos nossos resultados descritos acima: de acordo com o grau de ansiedade do animal no momento da realização da tarefa comportamental, a dose de 0,2 mg/kg de diazepam poderia ter atuado de forma distinta sobre a memória, sendo que o efeito observado no conjunto dos animais foi de facilitação, mas com uma grande dispersão de dados.

Nos ratos jovens, no entanto, a dose de 0,2 mg/kg prejudicou a memória da tarefa tanto quanto as doses mais altas (Gráfico 2). Já se observa, portanto, um efeito idade-dependente do diazepam, pois a sensibilidade da memória desta tarefa aos efeitos deste fármaco parece ser maior em ratos jovens, uma vez que uma dose mais baixa foi suficiente para causar um efeito amnésico.

5.2 - ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Os resultados destes experimentos mostram que, em ratos adultos, o diazepam prejudicou a memória nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, enquanto a dose de 0,2 mg/kg não apresentou nenhum efeito sobre o desempenho na tarefa (Gráfico 3). Já nos ratos jovens, nenhuma das doses utilizadas afetou o desempenho (Gráfico 4), sugerindo que, nesta idade, a memória da tarefa de Esquiva Ativa não é sensível à modulação pelo diazepam.

5.3 - HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

Nestes experimentos, o padrão de resultados foi semelhante para ratos jovens e adultos (Gráficos 5 e 6) A dose mais alta (5,0 mg/kg) mostrou-se inadequada para o estudo dos efeitos do diazepam sobre a memória, pois afetou a performance na sessão de treino. O aumento do número de cruzamentos na sessão de treino (Tabela I) indica que o diazepam induziu um aumento na atividade locomotora dos animais, resultado que está de acordo com dados anteriores da literatura (Castellano et al., 1984).

A partir dos resultados descritos acima, podemos sugerir, a respeito dos efeitos idade-dependentes do diazepam, que: (1) a memória da tarefa de Esquiva Inibitória parece ser mais sensível à modulação pelo diazepam em ratos de 30 dias do que em adultos; (2) a memória da tarefa de Esquiva Ativa, em ratos de 30 dias, não apresenta sensibilidade à ação modulatória do diazepam (nas doses utilizadas neste trabalho), ao contrário do que acontece em adultos; (3) ratos de 30 dias e adultos respondem de maneira semelhante ao diazepam, no que se refere ao desempenho na tarefa de Habituação.

Dada a especificidade da ação do diazepam, bem como os dados apresentados na introdução, pode-se sugerir que os efeitos idade-dependentes provavelmente devem-se a diferenças entre ratos jovens e adultos quanto à organização do sistema GABAérgico, mais especificamente no que se refere aos receptores GABA-A/BZD. Como visto anteriormente, diferentes tipos de memória são processados por vias distintas no SNC. (Izquierdo, 1993; Izquierdo et al., 1992). Assim, é possível supor que, em ratos de 30 dias de idade, as vias neurais responsáveis pelo processamento das memórias das tarefas de esquiva (aversivas) apresentem, em comparação com animais adultos, diferenças quanto à densidade e distribuição dos receptores GABA-A/BZD, bem como quanto a afinidade destes receptores pelos benzodiazepínicos. Por outro lado, nas vias neurais envolvidas com a Habituação, os receptores GABA-A/BZD poderiam apresentar, já aos 30 dias de idade, um padrão de funcionamento similar ao dos animais adultos.

Pode-se pensar ainda que, no caso de haver um sistema fisiológico de modulação da memória por benzodiazepínicos endógenos, como sugerem vários estudos (Izquierdo et al., 1990)), este sistema poderia desempenhar um papel diferenciado, de acordo com o estágio de desenvolvimento, na modulação de vários tipos de aprendizado.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - Em ratos adultos, os efeitos do diazepam sobre a memória de Esquiva Inibitória foram os seguintes: houve prejuízo do desempenho quando utilizadas as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, sugerindo déficit de memória. A dose de 0,2 mg/kg facilitou a memória. Ratos de 30 dias responderam ao diazepam de maneira distinta dos ratos adultos quanto aos efeitos da dose de 0,2 mg/kg, que foi amnésica nesta idade.

6.2 - Em Esquiva Ativa, o diazepam prejudicou a memória de ratos adultos nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg. A dose de 0,2 mg/kg não apresentou efeito. Já em ratos de 30 dias, o diazepam não apresentou efeito sobre o desempenho na tarefa.

6.3 - Na tarefa de Habituação, o diazepam prejudicou o desempenho de ratos de 60 dias em todas as doses utilizadas. As doses de 1,0 e 5,0 mg/kg de diazepam induziram um aumento na atividade locomotora, que pode ser avaliado pelo aumento no número de cruzamentos na sessão de treino da tarefa de Habituação. Os efeitos sobre os ratos de 30 dias foram semelhantes aos observados em animais adultos.

REFERÊNCIAS

- AGRANOFF, B.W. (1989) "Learning and memory". IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B. Basic Neurochemistry, 4 ed., Raven Press, New York, p. 915-927.
- BALDESSARINI, R.J. (1985) "Drugs and the treatment of psychiatric disorders". IN: Goodman, L.S.; Gilman, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7 ed., MacMillan Publishing Company, New York, p. 387-445.
- BEN-ARY, Y.; ANIKSZTEJN, L.; BREGESTOVSKI, P. (1992) "Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction". Trends In Neuroscience, 15: 333-339.
- BLISS, T.V.P.; COLINGRIDGE, G.L. (1993) "A synaptic model of memory: long-term potentiation in hippocampus". Nature, 361: 31-39.
- BOVOLIN, P.; SANTI, M.R.; MEMO, M.; COSTA, E.; GRAYSON, D.R. (1992) Distinct developmental patterns of expression of rat $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\gamma 2s$, and $\gamma 2l$ γ -aminobutyric acid-A receptor subunit mRNAs in vivo and in vitro". Journal of Neurochemistry, 59: 62-72.
- BOWERY, N. (1989) "GABA-B receptors and their significance in mammalian pharmacology". Trends In Pharmacological Sciences, 10: 401-407.
- BRAESTRUP, C.; ALBRECHTSEN, R.; SQUIRES, R.F. (1977) "High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas". Nature, 269: 702-704.
- BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M. (1978) "Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat brain". Brain Research, 147: 170-173.
- BREEN, R.A.; MCGAUGH, J.L. (1961) "Facilitation of maze learning with posttrial injections of picrotoxin". The Journal of Comparative Physiology and Psychology, 54: 495-501.
- BRILEY, M.S.; LANGER, S.Z. (1978) "Influence of GABA receptor agonists and antagonists on the binding of 3H-diazepam to the benzodiazepine receptor". European Journal of Pharmacology, 52: 129-132.
- BRIONI, J.D.; DECKER, M.W.; GAMBOA, L.P.; IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. (1990) "Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning". Brain Research, 522: 227-234.
- BRIONI, J.D.; IZQUIERDO, I. (1988) "Retention enhancement by pre-test β -endorphin

and oxotremorine and its reversal by scopolamine". Behavioral and Neural Biology, 50: 251-254.

- BRIONI, J.D.; MCGAUGH, J.L. (1988) "Posttraining administration of GABAergic antagonists enhance retention of aversive motivated tasks". Psychopharmacology, 96: 505-510.
- BRIONI, J.D.; NAGAHARA, A.H.; MCGAUGH, J.L. (1989) "Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage". Brain Research, 487: 105-112.
- BROWN, J.; LEWIS, V.; BROWN, M. HORN, G.; BOWES, J.B. (1982) "A comparison between transient amnesias induced by two drugs (diazepam or lorazepam) and amnesia of organic origin". Neuropsychologia, 20: 55-77.
- CASTELLANO, C.; FILIBECK, U.; PAVONE, F. (1984) "Naltrexone reversible effects of flunitrazepam on locomotor activity and passive avoidance behaviour in mice". European Journal of Pharmacology, 104: 111-116.
- CASTELLANO, C.; INTROINI-COLLISON, I.B.; PAVONE, F.; MCGAUGH, J.L. (1989) "Effects of naloxone and naltrexone on memory consolidation in CD1 mice: Involvement of GABAergic mechanisms". Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 32: 563-567.
- CASTELLANO, C.; MCGAUGH, J.L. (1990) "Effects of post-training bicuculline and muscimol on retention: lack of state dependency". Behavioral and Neural Biology, 54: 156-164.
- CHERUBINI, E.; GAIARSA, J.L.; BEN-ARI, Y. (1991) "GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life". Trends In Neurosciences, 14: 515-519.
- CHROBAK, J.J.; STACKMAN, R.W.; WALSH, T.J. (1989) "Intraseptal administration of muscimol produces dose-dependent memory impairments in the rat". Behavioral and Neural Biology, 52: 357-369.
- CLARKE, P.R.F.; ECCERSLEY, P.S.; FRISBY, J.P.; THORNTON, J.A. (1970) "The amnesic effect of diazepam (valium)". British Journal of Anaesthesiology, 42: 690-697.
- COSTA, T.; RODBARD, D. (1979) "Is the benzodiazepine receptor coupled to a chloride anion channel?". Nature, 277: 315-317.
- CUOMO, V. (1987) "Perinatal neurotoxicology of psychotropic drugs". Trends In Pharmacological Sciences, 8: 346-350.

- DELOREY, T.M.; OLSEN, R.W.; (1994) "GABA and glycine". IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B. Basic Neurochemistry, 5 ed., Raven Press, New York, p. 389-399.
- DESAI, N.; TAYLOR-DAVIES, A.; BARNETT, D.B. (1983) "The effects of diazepam and oxprenolol on short term memory in individuals of high and low state anxiety". British Journal of Clinical Pharmacology, 15: 197-202.
- DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C.J. (1994) "Excitatory amino acid transmitters". IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B. Basic Neurochemistry, 5 ed., Raven Press, New York, p. 367-387.
- DUNDEE, J.W.; PANDITT, S.K. (1972) "Anterograde amnesic effects of pethidine, hyoscine and diazepam in adults". British Journal of Pharmacology, 44:140-144.
- ERULKAR, S.D. (1989) "Chemically Mediated Synaptic Transmission: An Overview". IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B. Basic Neurochemistry, Raven Press, New York, p. 151-182.
- FILE, S.E.; PELLOW, S. (1988) "Low and high doses of benzodiazepine receptor inverse agonists respectively improve and impair performance in passive avoidance but do not affect habituation". Behavioral Brain Research, 30: 31-36.
- GAMZU, E.R. (1987) "The role of benzodiazepines in amnesia: laboratory predictors." JCP Monograph, 5: 8-13.
- GAMZU, E.R. (1988) "Animal model studies of benzodiazepine-induced amnesia". Psychopharmacology Series, 6: 218-229.
- GAMZU, E.R.; PERRONE, L.; SALSITZ, B. (1979) "An animal model for drug induced amnesia". Bull. Psychonomic Soc., 12: 253.
- GENTIL, V.; GORENSTEIN, C.; CAMARGO, C.H.P.; SINGER, J.M. (1989) "Effects of flunitrazepam on memory and their reversal by two antagonists" Journal of Clinical Psychopharmacology, 9: 191-197.
- GOLD, P.E.; ZORNETZER, S.T. (1983) "The mnemon and its juices: neuromodulation of memory processes". Behavioral and Neural Biology, 38: 151-189.
- HEISE, G.A.; MCCONNELL, H. (1961) "Differences between chlordiazepoxide-type and chlorpromazine-type action in 'trace avoidance'. Proceedings of the 3rd. World Congress of Psychiatry, Montreal, 2: 917.
- HENINGER, C.; SAITO, N.; TALLMAN, S.F.; GARRETT, K.M.; VITEK, M.P.; DUMAN, R.S.; GALLAGER, D.W. (1990) "Effect of continuous diazepam administration on GABA-A subunit mRNA in rat brain". Journal of Molecular

- HINRICHS, J.V.; MEWALDT, S.P.; GHONEIM, M.M.; BERIE, J.L. (1982) "Diazepam and learning: assesment of acquisition deficits". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 17: 165-170.
- HUNKELER, W.; MOHLER, H.; PIERI, POLC, P.; BONETTI, E.P.; CUMIN, R.; SCHAFFNER, R.; HAEFELY, W. (1981) "Selective antagonists of benzodiazepines". *Nature*, 290: 514-516.
- IZQUIERDO, I. (1982) "The role of an endogenous amnesic mechanism mediated by brain β -endorphin in memory modulation". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 15: 119-134.
- IZQUIERDO, I. (1988) *Organizacao, Consolidacao, Construcao e Reconstrucao da Memoria*, Editora da UFRJ, Rio de Janeiro, p. 7-69.
- IZQUIERDO, I. (1989a) "Aprendizaje y memoria". IN: Houssay, B.A. *Fisiologia Humana*, El Ateneo, Buenos Aires, p. 311-326.
- IZQUIERDO, I. (1989b) "Different forms of post-training memory processing". *Behavioral and Neural Biology*, 51: 171-202.
- IZQUIERDO, I. (1992) "The neurobiology of memory consolidation". *Neurosciences*, 18: 1-11.
- IZQUIERDO, I. (1994) "Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory". *Learning and Memory*, submetido.
- IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; MEDINA, J. (1990) "Endogenous benzodiazepine modulation of memory processes". *Neuroscience and Biobehavior Reviews*, 14: 419-424.
- IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C. (1992) "Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amigdala, medial septum and hippocampus of rats". *Behavioral and Neural Biology*, 58: 16-26.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. (1993) "Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26: 573-589.
- IZQUIERDO, I.; NETTO, C.A. (1985) "The brain β -endorphin system and behavior: the modulation of consecutively and simultaneously processed memories". *Behavioral and Neural Biology*, 44: 249-265.

- IZQUIERDO, I.; NETTO, C.A.; CARRASCO, M.A.; DIAS, R.D.; VOLKMER, N. (1985) "The course of the decrease of hypothalamic β -endorphin induced by training, and the development of the effect of β -endorphin on the retrieval of inhibitory avoidance in rats". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18: 391-395.
- JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M.B.C.; WALZ, R., DA SILVA, R.C.; BIANCHIN, M.; RUSCHEL, R.; MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. (1992) "Amnesia by infusion of glutamate receptor blockers into the amigdala, hippocampus and entorhinal cortex". *Behavioral and Neural Biology*, 58: 76-80.
- JONES, D.M.; LEW, M.J.; SPRIGGS, T.L.B. (1978) "The effects of low doses of diazepam on human performance in group administered tasks". *British Journal of Clinical Pharmacology*, 6: 333-337.
- KANTO, J.; ALLONEN, H. (1983) "Pharmacokinetics and the sedative effect of midazolam". *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 21: 460-463.
- KAROBATH, M.; PLACHETA, P.; LIPPITSCH, M. (1979) "Is stimulation of benzodiazepine receptor binding mediated by a novel GABA receptor?". *Nature*, 278: 748-749.
- KAROBATH, M.; SPERK, G. (1979) "Stimulation of benzodiazepine receptor binding by γ -aminobutyric acid". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1004-1006.
- KESNER, R.P.; NOVAK, J.M. (1982) "Serial position curve in rats: Role of the dorsal hippocampus". *Science*, 218: 173-175.
- LADER, M. (1987) "Clinical pharmacology of benzodiazepines". *Annual Review of Medicine*, 38: 19-28.
- LAL, H.; KUMAR, B.; FORSTER, M.J. (1988) "Enhancement of learning and memory in mice by a benzodiazepine antagonist". *FASEB Journal*, 2: 2707-2711.
- LANIUS, R.A.; PASQUALOTTO, B.A.; SHAW, C.A. (1993) "Agedependent expression, phosphorylation and function of neurotransmitter receptors: pharmacological implications". *Trends In Pharmacological Sciences*, 14: 403-408.
- LAURIE, D.J.; WISDEN, W.; SEEBURG, P.H. (1992) "The distribution of Thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development" *The Journal of Neuroscience*, 12: 4151-4172.
- LEVITAN, E.S.; SCHOFIELD, P.R.; BURT, D.R.; RHEE, L.M.; WISDEN, W.,

- KOHLER, M.; FUJITA, N.; RODRIGUEZ, H.F.; STEPHENSON, A.; DARLINSON, M.G.; BARNARD, E.A.; SEEBURG, P.H. (1988) "Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity". *Nature*, 335: 76-79.
- LIPPA, A.S.; BEER, B.; SANO, M.C.; VOGEL, R.A.; MEYERSON, L.R. (1981) "Differential ontogeny of type 1 and type 2 benzodiazepine receptors". *Life Sciences*, 28: 2342-2347.
- LYNCH, G.; BAUDRY, M. (1984) "The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis". *Science*, 224: 1057-1063.
- MACDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. (1994) "GABA-A receptor channels". *Annual Review of Neuroscience*, 17: 569-602.
- MACLENNAN, A.J.; BRECHA, N.; KHRESTCHATISKY, M.; STERNINI, C.; TILLAKARATNE, N.J.K.; CHIANG, M.Y.; ANDERSON, K.; LAI, M.; TOBIN, A.J. (1991) "Independent cellular and ontogenetic expression of mRNAs encoding three α polypeptides of the rat GABA-A receptor". *Neuroscience*, 43: 369-380.
- MAJEWSKA, M.D.; HARRISON, N.L.; SCHWARTZ, R.D.; BARKER, J.L.; PAUL, S.M. (1986) "Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor". *Science*, 232: 1004-1007.
- MALENKA, R.C.; HAMBLIN, M.W.; BARCHAS, J.D. (1989) "Biochemical hypotheses of affective disorders and anxiety". IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B. *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York, p. 877-892.
- MARSHALL, B.E.; WOLLMAN, H. (1985) "General anesthetics". IN: Goodman, L.S.; Gilman, A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7 ed.; MacMillan Publishing Company, New York, p. 276-301.
- MCGAUGH, J.L. (1989) "Dissociation learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage". *Brain Research Bulletin*, 23: 339-345.
- MCGAUGH, J.L.; LIANG, K.C.; BENNETT, C.; STERNBERG, D.B. (1984) "Adrenergic influences on memory storage: Interaction of peripheral and central systems". IN: Lynch, G.; McGaugh, J.L.; Weinberger, N.M. *Neurobiology of Learning and Memory*, Guilford Press, New York, p. 313-332.
- MCGEER, P.L.; MCGEER, E.G. (1989) "Amino acid neurotransmitters". IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B. *Basic Neurochemistry*, 4 ed., Raven Press, New York, p. 311-332.
- MCNAMARA, R.K.; SKELTON, R.W. (1991) "Diazepam impairs acquisition but not

performance in the morris water maze". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 38: 651-658.

MILLER, L.G.; WOOLVERTON, S.; GREENBLATT, D.J.; LOPEZ, F.; ROY, R.B.; SHADER, R.I. (1989) "Chronic benzodiazepine administration. IV. Rapid development of tolerance and receptor downregulation associated with alprazolam administration". *Biochemical Pharmacology*, 38: 3773-3777.

MOHLER, H.; OKADA, T. (1977a) "GABA receptor binding with 3H(+)bicuculine-methiodide in rat CNS". *Nature*, 267: 65-67.

MOHLER, H.; OKADA, T. (1977b) "Benzodiazepine receptor: demonstration in the Central Nervous System". *Science*, 198: 849-851.

MONTPIED, P.; MARTIN, B.M.; COTTINGHAM, S.L.; STUBBLEFIELD, B.K.; GINNS, E.I.; PAUL, S.M. (1988) "Regional distribution of the GABA-A/benzodiazepine receptor (α subunit) mRNA in rat brain". *Journal of Neurochemistry*, 51: 1651-1654.

NAGAHARA, A.H.; MCGAUGH, J.L. (1992) "Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not shortterm memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks". *Brain Research*, 591: 54-61.

O'DONNELL, P.; PAZO, J.H. (1989) "Bases biológicas de la generación y transmisión del impulso nervioso". IN: Houssay, B.A. *Fisiología Humana*, 6 ed., El Ateneo, Buenos Aires, p. 1-25.

OISHI, H.; IWAHARA, S.; YANG, K.; YOGI, A. (1972) "Effects of chlordiazepoxide on passive avoidance responses in rats". *Psychopharmacologia*, 23: 373-385.

OLSEN, R.W.; TOBIN, A.J. (1990) "Molecular biology of GABA-A receptors". *FASEB Journal*, 4: 1469-1480.

OWEN, R.T.; TYRER, P. (1983) "Benzodiazepine dependence: a review of evidence". *Drugs*, 25: 385-398.

PACKARD, M.G.; MCGAUGH, J.L. (1992) "Double association of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems". *Behavioral Neuroscience*, 106: 439-446.

PALACIOS, J.M.; NIEHOFF, D.L.; KUCHAR, M.J. (1979) "Ontogeny of GABA and benzodiazepine receptor: effects of Triton X-100, bromide and muscimol". *Brain Research*, 179: 390-395.

- PANDITT, S.K.; DUNDEE, J.W. (1970) "Preoperative amnesia, the incidence following the intramuscular injection of commonly used premedicants". *Anaesthesia*, 25: 493-499.
- PANDITT, S.K.; DUNDEE, J.W.; KEILTY, S.R. (1971) "Amnesia studies with intravenous premedication". *Anaesthesia*, 26: 421-428.
- PATEL, J.B.; CIOFALO, V.B.; IORIO, L.C. (1979) "Benzodiazepine blockade of passive avoidance task in mice: a statedependent phenomenon". *Psychopharmacology*, 61: 25-28.
- PEREIRA, M.E.; DALMAZ, C.; ROSAT, R.; IZQUIERDO, I. (1988) "Diazepam blocks the interfering effect of posttraining behavioral manipulations on retention of a shuttle avoidance task". *Psychopharmacology*, 94: 402-404.
- PETERSEN, R.C.; GHONEIM, M.M. (1980) "Diazepam and human memory: influence on acquisition, retrieval, and state-dependent learning". *Prog. Neuro-Psychopharmacology*, 4: 81-89.
- PRITCHETT, D.B.; SONTHEIMER, H.; SHIVERS, B.D.; YMER, S.; KETTENMAN, H.; SCHOFIELD, P.R.; SEEBURG, P.H. (1989) "Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology". *Nature*, 338: 582-585.
- RANDALL, L.O.; HEISE, G.A.; SHALLEEK, W.; BAGDON, R.E.; BANZIGER, R.F.; BORIS, A.; MOE, R.A.; ABRAMS, W.E. (1961) "Pharmacological and clinical studies on valium, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class". *Curren Therapeutics Research*, 3: 405-425.
- REICHELT, R.; HOFMANN, D.; FODISCH, H.; MOHLER, H.; KNAPP, M.; HEDEBRAND, J. (1991) "Ontogeny of the benzodiazepine receptor in human brain: fluorographic, immunochemical, and reversible binding studies". *Journal of Neurochemistry*, 57: 1128-1135.
- REMENTERIA, J.L.; BHATT, K. (1977) "Withdrawal symptoms in neonates from intrauterine exposure to diazepam". *The Journal of Pediatrics*, 90: 123-126.
- REVES, J.G.; FRAGEN, R.J.; VINIK, H.R.; GREENBLATT, D.J. (1985) "Midazolam: pharmacology and uses". *Anesthesiology*, 62: 310-324.
- RICKELS, K.; CASE, W.G.; DOWNING, R.W.; WINOKUR, A. (1983) "Long-term diazepam therapy and clinical outcome". *Journal of American Medical Association*, 250: 767-771.
- ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT E.L. (1984) "Basic processes and modulatory influences in the stages of memory formation". IN: Lynch, G.; McGaugh, J.L.;

Weinberger, N.M. *Neurobiology of Learning and Memory*, Guilford Press, New York, p. 263-288.

- SAKMANN, B.; METHFESSEL, C.; MISHINA, M.; TAKAHASHI, T.; TAKAI, T.; KURASAKI, M.; FUKUDA, K.; NUMA, S. (1985) "Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel". *Nature*, 318: 538-543.
- SATO, T.N.; NEALE, J.H. (1989) "Type I and type II γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptors: purification and analysis of novel receptor complex from neonatal cortex". *Journal of Neurochemistry*, 52: 1114-1122.
- SCHOFIELD, P.R.; DARLINSON, M.G.; FUJITA, N.; BURT, D.R.; STEPHENSON, F.A.; RODRIGUEZ, H.; RHEE, L.M.; RAMACHANDRAN, J.; REALE, V.; GLENCORSE, T.A.; SEEBURG, P.H.; BARNARD, E.A. (1987) "Sequence and functional expression of the GABA-A receptor shows a ligand-gated receptor super-family". *Nature*, 328: 221-227.
- SHEU, F.S.; MCCABE, B.J.; HORN, G.; ROUTTENBERG, A. (1993) "Learning selectively increases protein kinase C substrate phosphorylation in specific regions of the chick brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2705-2709
- SIEGHART, W. (1989) "Multiplicity of GABA-A/benzodiazepine receptors". *Trends In Pharmacological Sciences*, 10: 407-411.
- SIEGHART, W. (1992) "GABA-A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites". *Trends In Pharmacological Sciences*, 13: 446-450
- SIEGHART, W.; DREXLER, G. (1983) "Irreversible binding of [³H]flunitrazepam to different proteins in various brain regions". *Journal of Neurochemistry*, 41: 47-55.
- SIGEL, E.; BARNARD, E.A. (1984) "A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex". *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 7219-7223.
- SIGEL, E.; STEPHENSON, F.A.; MAMALAKI, C.; BARNARD, E.A. (1983) "A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. Purification and partial characterization". *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 6965-6971.
- SMITH, T.C.; WOLLMAN, H. (1985) "History and principles of anesthesiology". IN: Goodman, L.S.; Gilman, A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7 ed., MacMillan Publishing Company, New York, p. 260-275.
- SOUBRIE, P.; SIMON, P.; BOISSER, J. (1976) "An amnesic effect of benzodiazepines in rats". *Experientia*, 32: 359-360.

- SQUIRES, R.F.; BRAESTRUP, C. (1977) "Benzodiazepine receptors in rat brain". *Nature*, 266: 732-734.
- STEPHENSON, F.A. (1988) "Understanding the GABA-A receptor: a chemically gated ion channel." *Biochemical Journal*, 249, 21-32.
- TALLMAN, J.F.; THOMAS, J.W.; GALLAGER, D.W. (1978) "GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity". *Nature*, 274: 383-385.
- TWYMAN, R.E.; MACDONALD, R.L. (1992) "Neurosteroid regulation of GABA-A receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture". *Journal of Physiology*, 456: 215-245.
- VENAULT, P.; CHAPOUTHIER, G.; PRADO DE CARVALHO, L.; SIMIAND, J. MORRE, M.; DODD, R.H.; ROSSIER, J. (1986) "Benzodiazepine impairs and β -carboline enhances performance in learning and memory tasks". *Nature*, 321: 864-866.
- VITORICA, J.; PARK, D.; CHIN, G., DE BLAS, A.L. (1990) "Characterization with antibodies of the γ -aminobutyric acid-A/benzodiazepine receptor complex during development of the rat brain". *Journal of Neurochemistry*, 54: 187-194.
- WISDEN, W.; LAURIE, D.J.; MONYER, H.; SEEBURG, P.H. (1992) "The distribution of 13 GABA-A receptor subunit mRNAs in the rat brain I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon". *Journal of Neuroscience*, 12: 1041-1062.
- YOUNG III, W.S.; KUCHAR, M.J. (1979) "Autoradiographic localisation of benzodiazepine receptors in the brains of humans and animals". *Nature*, 280: 393-395.
- ZHANG, J.H.; SATO, M.; TOHYAMA, M. (1991) "Different postnatal development profiles of neurons containing distinct GABA-A receptor β subunits (β 1, β 2, and β 3) in the rat forebrain". *The Journal of Comparative Neurology*, 308: 586-613.
- ZOLA-MORGAN, S; SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G.; SUZUKI, W. (1989) "Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amigdala and hippocampal formation produce severe memory impairment". *Journal of Neuroscience*, 9: 4355-4370.