



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ANA PAULA TAVARES SANTOS

**TRIAGEM COMPORTAMENTAL DE UM NOVO ANTAGONISTA DO
RECEPTOR NMDA EM CAMUNDONGOS – ESTUDANDO O BIII277CL**

Araranguá

2023

ANA PAULA TAVARES SANTOS

**TRIAGEM COMPORTAMENTAL DE UM NOVO ANTAGONISTA DO
RECEPTOR NMDA EM CAMUNDONGOS – ESTUDANDO O BIII277CL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada para conclusão do curso em Fisioterapia do centro de Saúde. Da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Júnior.

Araranguá

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas inúmeras oportunidades a mim cedidas para chegar até aqui e as pessoas que Ele colocou em minha vida. Ao professor Aderbal pela oportunidade de atuar na iniciação científica e a sua orientação, paciência e dedicação desde então. Aos meus pais e meu irmão, os maiores motivos para que eu pudesse chegar até aqui. E aos meus amigos, por toda a motivação e pela companhia, mesmo em momentos difíceis.

RESUMO

O BIII 277 CL é um novo fármaco desenvolvido pelas indústrias alemãs Boehringer-Ingelheim. Ele é um composto antagonista não competitivo dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) com grande potencial para a clínica. Os receptores NMDAs são canais iônicos glutamatérgicos expressos em grande quantidade no sistema nervoso central (SNC) e que desempenham funções importantes na transmissão sináptica excitatória, que pode causar prejuízos na memória e no controle. Nesse contexto, alguns estudos já demonstraram a eficácia do BIII 277 CL em diminuir a área de isquemia em modelos animais, porém, a inibição desses receptores acarreta prejuízos motores e comportamentais. Sendo assim, o objetivo deste estudo é encontrar uma dose segura deste novo fármaco que não cause prejuízos motores e cognitivos relacionados ao bloqueio dos receptores NMDA. Para isso, serão estudadas três doses diferentes deste fármaco (0,1; 0,01 e 1 mg/kg), bem como do seu controle BIII 25 CL, em camundongos *Swiss* adultos machos e fêmeas. Todos os animais receberão o tratamento via subcutânea e serão submetidos 5 minutos depois aos testes de campo aberto, força de preensão, labirinto de Barnes, step down, labirinto em cruz elevada e rotarod para análise de parâmetros locomotores e cognitivos. Dessa forma, este estudo contribuirá para o desenvolvimento de novas perspectivas farmacológicas para pacientes com déficit da transmissão sináptica excitatória com envolvimento do receptor NMDA.

Palavras-chave: NMDA, BIII 277 CL, B 25 CL, isquemia, doença de Parkinson, AVC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Campo aberto. Fonte: autor.....	5
Figura 2. Teste de força de prensão. Fonte: autor	5
Figura 3. Rotarod. Fonte: autor.	6
Figura 4. Step Down. Fonte: autor	7
Figura 5. Labirinto em Cruz elevada. Fonte: autor.	8
Figura 6. Labirinto Barnes. Fonte: autor.	10
Figura 7. Teste de força de prensão.	11
Figura 8. Campo aberto.....	12
Figura 9. Campo aberto - número de levantamentos.....	13
Figura 10. Rotarod - latência no primeiro e segundo dias.....	14
Figura 11. Step Down – latência..	15
Figura 12. Cruz elevada – tempo braço fechado 1º dia.....	16
Figura 13. Labirinto de Cruz elevada.....	16
Figura 14. Labirinto Barnes- Latência primária e secundária, primeiro dia..	17
Figura 15. Labirinto Barnes - latência primária e secundária, segundo dia..	18
Figura 16. Labirinto Barnes - latência primária e secundária, segundo dia. o.	18
Figura 17. Labirinto Barnes - latência, dia teste.....	18
Figura 18. Labirinto Barnes - latência, dia teste.....	18
Figura 19. Labirinto Barnes - tipos de estratégias.....	19
Figura 20. Labirinto Barnes - tipos de estratégias.....	19
Figura 21. Labirinto Barnes - Tipos de estratégias, mapa de calor.	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
	2.1 Objetivo Geral.....	3
	2.2 Objetivos Específicos.....	3
3	METÓDOS.....	3
	3.1 Animais.....	3
	3.2 BIII 277 CL.....	4
	3.3 Teste de Campo Aberto.....	4
	3.4 Teste de força de preensão.....	5
	3.5 Rotarod	6
	3.6 Step Down	7
	3.7 Labirinto em Cruz Elevada.....	8
	3.8 Labirinto de Barnes	9
	3.9 Análise estatística.....	10
4	RESULTADOS.....	10
5	DISCUSSÃO.....	22
	5.1 Efeitos motores do BIII 277 CL.....	22
	5.2. Efeitos ansiolíticos e amnésicos do BIII 277 CL	23
6	CONCLUSÃO.....	23
7	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que no Brasil, no período entre 2010 e 2020, as internações por doenças neurodegenerativas totalizaram cerca de 51 mil casos, configurando aproximadamente 570 dias de permanência no hospital e mais de 3 mil registros de óbitos (PAZ *et al.*, 2021). Dessa forma, fica evidente a necessidade da busca de novos tratamentos para estes indivíduos, uma vez que, um tratamento adequado pode auxiliar a reduzir os gastos relacionados a essas enfermidades, além de minimizar as sequelas envolvidas, permitindo o máximo da manutenção da função do indivíduo e a realização de suas atividades na sociedade (ELBAZ; MOISAN, 2008). Nesse contexto, um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia de lesões cerebrais e processos degenerativos de grande interesse atual é o bloqueio do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA).

Os neurotransmissores são substâncias químicas responsáveis por transportarem informações entre neurônios, células nervosas e células do corpo, sendo essenciais para um bom funcionamento do nosso sistema nervoso (HYMAN, 2005). Dentre eles, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e seu produto, GABA, o principal neurotransmissor inibitório (ROSNAN; BROSNAN, 2012). Para que as respostas neuronais sejam efetivadas, é necessário que haja uma comunicação entre o neurotransmissor e seu respectivo receptor e, nesse contexto, o NMDA é um subtipo de receptor glutamatérgico importante para a modulação da atividade sináptica do sistema nervoso central (CNS) (REYNOLDS *et al.*, 1988). Contudo, os mesmos receptores de neurotransmissores excitatórios que medeiam a atividade sináptica podem ser responsáveis por causar injúria neural, podendo levar à morte de neurônios (ROTHMAN *et al.*, 1987). Evidências mostram, que em modelo animal, grandes quantidades de glutamato são liberadas durante o processo de isquemia, levando a apoptose e perda neuronal. Outros estudos relataram que o aumento da expressão do receptor NMDA extrassináptico está associado à citotoxicidade, levando à perda de neurônios dopaminérgicos na substância nigra e resultando nos sintomas da DP (BEZARD *et al.*, 2001). Sendo assim, a utilização de antagonistas do receptor NMDA em seres humanos poderia garantir neuroproteção após AVE, prevenindo morte celular e os danos associados à função motora e perda de memória que ocorrem na DP.

Neste contexto, deu-se início a uma série de pesquisas experimentais voltadas à investigação do antagonismo do receptor NMDA. Dentre os estudos, o antagonista Memantina causou uma leve neutralização da bradicinesia e do tremor de repouso em pacientes com DP, acarretando melhora da marcha. Entretanto, os efeitos colaterais, principalmente sonolência e

náusea ocorreram em todos os participantes (OLIVARES, et al. 2012). Outros estudos focados na citotoxicidade mediada pelo glutamato durante uma isquemia verificaram que o alto influxo de cálcio mediado pelo receptor NMDA durante um evento isquêmico está associado ao AVC e, por isso, medicamentos visando esse bloqueio de cálcio poderiam auxiliar na neuroproteção celular, minimizando os danos causados pela lesão e preservando a área de penumbra (CHOI, 1995). Neste sentido, a cetamina, um anestésico geral dissociativo, auxilia no evento de neuroproteção celular, a partir de um bloqueio da superexcitação do NMDAr em modelos animais (ROTHMAN et al., 1987). Outro fármaco que tem sido amplamente estudado é o MK801, potente e seletivo antagonista do receptor NMDA que atua diminuindo a morte neuronal isquêmica/anôxica *in vitro* e *in vivo* (FOSTER; WONG, 1987; GILL; FOSTER; WOODRUFF, 1987). Esses estudos demonstram o grande potencial do antagonismo do receptor NMDA no tratamento de danos isquêmicos e para neuroproteção neuronal. Contudo, os efeitos colaterais advindos do bloqueio desse receptor impedem o sucesso clínico, justificando a necessidade do estudo de novos fármacos (W.OLNEY *et al.*, 1989).

Visando minimizar os efeitos adversos da administração de fármacos antagonistas no NMDAR, as indústrias Boehringer Ingelheim desenvolveram o fármaco BIII 277 CL, um antagonista não competitivo de alta afinidade e de alta especificidade do receptor NMDA (CARTER *et al.*, 1995). Existem duas vantagens que fazem com que este fármaco se sobressaia, mostrando seu alto potencial terapêutico. Primeiro, um composto antagonista não competitivo de alta afinidade não precisa competir com o agonista endógeno durante um evento de AVE, em que ocorre uma superestimulação glutamatérgica. Além disso, não é necessário um aumento gradual do fármaco para garantir um efeito efetivo em determinada região do cérebro danificada devido sua alta especificidade com a região do cérebro em que está ocorrendo a superestimulação (GRAUERT et al., 1997). Nesse contexto, um estudo de 1995 destacou o potencial terapêutico do fármaco BIII- 277CL em diferentes doses. Como resultado, foi observada a redução de 50% da letalidade induzida por NMDA. Contudo, nesse primeiro ensaio foram verificados distúrbios da coordenação motora em doses altas de 1 mg/kg, mesmo com a redução da área de infarto cortical por oclusão da artéria cerebral média (CARTER *et al.*, 1995). Mais à frente, foi comprovado que o BIII 277-CL apresentou efeitos neuroprotetores em doses baixas, como 0,1mg/kg por via subcutânea administrada entre 5 a 10 minutos após a isquemia, com uma duração de até 1 hora de efeito (PSCHORN; CARTER, 1996).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é investigar 3 doses diferentes do BIII 277-CL, bem como do seu controle BIII 25 CL em camundongos *Swiss* machos e fêmeas. Todos os animais serão submetidos aos testes de campo aberto, teste de força de preensão, labirinto de

barnes, step down, labirinto em cruz elevada e rotarod, para análise de parâmetros locomotores e cognitivos. Este estudo visa investigar uma dose segura do fármaco BIII277CL que não cause prejuízos cognitivos e motores, contribuindo para o tratamento de pacientes com déficit da transmissão sináptica excitatória, como ocorre na isquemia cerebral, acidente vascular cerebral ou trauma cerebral e em doenças neurodegenerativas, como a de Parkinson.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a dose/ resposta do fármaco BIII 277 CL em relação aos efeitos cognitivos e motores em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos da administração do BIII27CL nos testes:

- Força de preensão;
- Step down;
- Labirinto de Barnes
- Rotarod
- Labirinto de cruz elevada
- Teste Campo aberto

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Serão utilizados camundongos adultos *Swiss* machos, com 8 semanas de idade do Biotério Central da UFSC. Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos distintos, sendo grupo controle e grupo experimental. Além disso, eles serão alocados em gaiolas coletivas com 12 animais por caixa e alocados no LABIOEX (Laboratório de biologia do exercício físico/UFSC/ Araranguá), em temperatura de 22°C, ciclo claro/escuro de 12 horas com luzes acessas às 7h da manhã e umidade monitorada. Todos os animais terão livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos executados seguirão a RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 33 DE 18 DE NOVEMBRO DE 2016 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEUA. O Projeto foi submetido ao CEUA e aprovado, sendo o número de protocolo 3244200722. Todos os experimentos listados serão realizados no mesmo laboratório respeitando o ciclo circadiano dos animais, bem como seu bem-estar.

3.2 Administração dos fármacos BIII 277 CL e BIII 25 CL fármaco BIII 277 CL

Trata-se de um fármaco antagonista não competitivo do complexo receptor NMDA, desenvolvido pelas indústrias Boehringer Ingelheim que tem como objetivo atenuar a hiperexcitação glutamatérgica presente em eventos isquêmicos e associados a disfunção da memória. Ele vem acompanhado do seu controle negativo BIII 25-CL, uma grande diferença deste fármaco, que permite uma maior qualidade dos resultados relacionados aos experimentos comportamentais. As doses estudadas neste projeto são de 1mg/kg, 0,1 mg/kg e 0,01 mg/kg que serão administradas por via subcutânea em camundongos machos e fêmeas separados em diferentes grupos, 5 minutos antes da realização dos testes. Nesse contexto, a dose de 1mg/kg será utilizada para que se possa elaborar um gráfico dose/resposta, visando comparar os resultados obtidos de acordo com a dosagem, uma vez que, embora seja comprovada as alterações motoras na dose de 1mg/kg, os efeitos na ansiedade e memória não estão registrados, o que justifica a análise desta dosagem. A administração e as dosagens utilizadas neste estudo são baseadas em estudos preliminares e na literatura (CARTER *et al.*, 1995; PSCHORN; CARTER, 1996). Com base nesses estudos, a dose de 1mg/kg será utilizada, uma vez que, na ansiedade e memória, ainda não registrados, o que justifica o uso desta dosagem.

3.3 Campo aberto

Trata-se de uma plataforma aberta amplamente utilizada para avaliar o comportamento dos animais no que tange sua atividade locomotora e exploração vertical, fornecendo uma variedade de informações que vão desde o deslocamento geral, até dados mais específicos, como distância, velocidade média, número de levantamentos, deslocamentos e Grooming (NAKAGAWA; MATSUNAGA; ISHIWATA, 2020). Para a realização deste teste, serão administradas as doses de 1, 0,1 e 0,01 mg/kg, todas por via subcutânea, cinco minutos antes da realização do campo aberto, no qual serão observados durante um período de 5 minutos. Para realizar o teste, os animais serão posicionados no centro de uma área circular transparente com uma base de acrílico de diâmetro de 60 cm sob uma plataforma de 70 x 70 cm e altura de 50 cm da marca Bonther (figura 1). Os animais serão gravados durante 5 minutos, durante os quais serão livres para explorar toda plataforma. Posteriormente, os resultados gravados serão analisados a partir do software AnyMaze (SHOJI; MIYAKAWA, 2019) e, a partir dele serão analisados o deslocamento total em metros, número de cruzamentos (NC) e de levantamentos (NL), tempo de permanência no centro (TPC) e na periferia (TPP), distância média percorrida em metros, velocidade máxima e média (cm/s) e, por fim, a contagem do

número de fezes também será realizada como forma de observar o nível de ansiedade dos animais Nesta etapa serão 12 camundongos machos distribuídos nos grupos: Biii 277-CL 1mg/kg (N=3); Biii 277- Cl (N=3); Biii 277-CL (N=3) e Biii 25 CL (N=3).



Figura 1. Campo aberto. Fonte: autor

3.4 Teste de força de preensão:

Este teste é amplamente utilizado para verificar a função do músculo esquelético em roedores (TAKESHITA et al., 2017). Nele, se utiliza uma grade horizontal que é apertada pelo camundongo para medir a força máxima realizada em determinado período de tempo (figura 2) (DUNNETT; TORRES; ANNETT, 1998). Nesta etapa serão utilizados os mesmos animais do teste anterior.



Figura 2. Teste de força de preensão. Fonte: autor

3.5 Rotarod

O teste de rotarod é amplamente utilizado para analisar a coordenação analisar a coordenação motora em roedores, principalmente na detecção de disfunção cerebelar (SHIOTSUKI et al., 2010). Neste teste, a coordenação motora é avaliada colocando um camundongo em uma haste horizontal que gira em torno do seu próprio eixo, sendo que a velocidade, bem como o número de rotações por minutos são controladas externamente (DEACON, 2013). Os animais passarão por uma habituação a 0 rpm durante 30 segundos, passando para 5 rpm por 90 seg. Posteriormente, será realizado o teste durante 5 minutos, alcançando até 30 rpm (JIANG *et al.*, 2004). Serão analisados a latência até a primeira queda e o tempo de permanência do animal no aparelho. A força motora também pode ser avaliada, uma vez que o teste requer força, principalmente, dos membros anteriores para se manterem no eixo de rotação do aparelho (DEACON, 2013). Nesta etapa serão utilizados os mesmos animais do teste anterior.



Figura 3. Rotarod. Fonte: autor.

3.6 Step Down

O teste é definido como uma tarefa de esquiva que avalia a memória de longo prazo. Nele um camundongo é colocado em uma plataforma localizada acima de uma grade de barra de aço paralelas (figura 4) (EBRAHIMI-GHIRI; SHAHINI; ZARRINDAST, 2021). O

teste será realizado 5 minutos após a administração por via subcutânea do fármaco Biii 277-Cl nas doses 1, 0,1 e 0,01 mg/kg. Os animais passarão por sessões de treinamento, nas quais após descenderem da grade, receberão um choque de 2 s e intensidade de 2 mA. O teste será realizado novamente 24 horas depois para verificar se houve um aprendizado nos roedores. Nele um camundongo é colocado em uma plataforma localizada acima de uma grade de barra de aço paralelas (EBRAHIMI-GHIRI; SHAHINI; ZARRINDAST, 2021). O teste será realizado 5 minutos após a administração por via subcutânea do fármaco Biii 277-Cl nas doses 1, 0,1 e 0,01 mg/kg. Os animais passarão por sessões de treinamento, nas quais após descenderem da grade, receberão um choque de 2 s e intensidade de 0,2 mA. O teste será realizado novamente 24 horas depois para verificar se houve um aprendizado nos roedores. Os animais utilizados neste teste serão os mesmos utilizados no teste anterior.



Figura 4. Step Down. Fonte: autor

3.7 Labirinto em Cruz Elevada

O labirinto de cruz elevado (LCE) é um teste comportamental que avalia a ansiedade do roedor, envolvendo um conflito entre o desejo do roedor de explorar um ambiente novo e o medo da exposição que é condicionado pela elevação da plataforma e uma área aberta desconhecida (RODRIGUES *et al.*, 2011). O labirinto consiste em dois braços abertos e dois fechados perpendiculares entre si e com um espaço central aberto, sendo que os braços abertos e fechados ficam situados um a frente do outro (figura 5). Nele, os animais são colocados no centro podem se mover e explorar o aparato livremente durante 5 minutos (EBRAHIMI-GHIRI; SHAHINI; ZARRINDAST, 2021). Os animais serão submetidos ao teste após 5 minutos da aplicação das doses 1, 0,1 e 0,01 mg/kg por via subcutânea. Os parâmetros avaliados neste teste são: número de entradas no braço aberto, bem como o tempo gasto neste espaço; além disso, é contabilizado o número total de entradas total nos braços fechados, o tempo de permanência no espaço central do labirinto e, por fim, o primeiro braço escolhido pelo animal, se aberto ou

fechado (PINTO et al.,2012). Os animais utilizados neste teste serão os mesmos utilizados nos testes anteriores.



Figura 5. Labirinto em Cruz elevada. Fonte: autor.

3.8 Labirinto de Barnes

O labirinto de Barnes é um método valioso utilizado para avaliar a aprendizagem espacial e a memória de roedores que foi desenvolvido por Carol Barnes a partir do estudo da memória espacial em ratos (BARNES, 1979). Posteriormente este teste foi adaptado para camundongos a partir de um condicionamento contextual do medo, tarefa também dependente do hipocampo (BACH et al., 1995). A configuração do labirinto de Barnes consiste em uma plataforma circular de diâmetro de 122cm contendo 20 buracos igualmente espaçados entre si com um diâmetro de 5 cm (figura 6). Um aparato de acrílico e cor preta é encaixado abaixo de um dos orifícios, ficando os demais livres. Nesse contexto, a luz e os espaços abertos são aversivos aos roedores e servem como fatores motivadores para encontrarem a caixa de fuga que é escura. Além disso, são adicionadas nas paredes pistas visuais de figuras geométricas para também servir como motivadores espaciais aos animais (PITTS, 2018). O equipamento será montado em uma sala de experimentos bem iluminada com cerca de 1.000 lux e uma sala de espera localizado ao lado desta, por onde são monitorados. O experimento ocorre durante 4

dias, em que, no primeiro dia, os animais passam por uma habituação em que são colocados durante 1 minuto na caixa de fuga e depois podem explorar o equipamento durante 5 minutos. Caso durante esse período o camundongo não entre dentro da caixa de fuga ele é guiado e colocado gentilmente dentro do aparato, onde fica por mais 1 minuto. Entre os dias 2 e 3 os animais passam pelo treinamento de aquisição. Antes do início do teste os animais ficam pelo menos 1 hora em habituação na sala de experimento com temperatura, ruídos e iluminação controlados. Os animais serão transportados até a plataforma dentro de um recipiente escuro e colocados aleatoriamente no centro de um dos quatro quadrantes da plataforma após a administração por via subcutânea do fármaco Biii 277CL 1, 0,1 e 0,01 mg/kg e terão livre acesso a plataforma durante 3 minutos, durante os quais serão gravados. O teste finaliza quando o camundongo entra na caixa de fuga ou quando os 3 minutos se esgotam, caso o roedor não encontre o aparato de fuga ele é gentilmente guiado e colocado e ali deixado durante 30 segundos antes da remoção. Tanto a plataforma, como os aparatos serão limpos com álcool 20% entre um teste e outro.

Além disso, cada animal possui 2 tentativas que ocorrem num intervalo de uma hora e, em cada tentativa, vários parâmetros são analisados. Dentre eles tem-se a latência primária que é o tempo (em segundos) que o animal leva até localizar o espaço que detém a caixa de fuga e a latência secundária ou total, que é o tempo que ele leva até entrar dentro da caixa de escape. Ademais, são avaliados o número de erros, que é definido como a verificação de qualquer outro buraco que não contenha a caixa de fuga, o número de acertos o qual consiste no número de vezes que o animal visita o espaço que contém a caixa de escape e a distância total percorrida durante a realização do teste. Por fim, o tipo de estratégia que o animal utiliza para encontrar a caixa de fuga pode ser classificado de três maneiras; em série, aleatória e direta. Na estratégia em série o animal percorre todo o circuito do sentido horário ou anti-horário verificando no mínimo três buracos consecutivos. Na estratégia aleatória não ocorre essa verificação consecutiva ou os animais não conseguem encontrar o espaço correto. Por fim, na estratégia direta o animal sai do aparato em que é transportado e vai diretamente até o buraco que contém a caixa de fuga. No sétimo dia de fuga é removida do aparelho e a estratégia utilizada é analisada, bem como se o animal consegue localizar o espaço que havia a caixa de fuga e o tempo que leva para isso (PITTS, 2018; BACH et al., 1995). Nesta etapa será utilizada a mesma quantidade de animais das demais.



Figura 6. Labirinto Barnes. Fonte: autor.

3.9 Análise estatística

Os resultados serão descritos como média \pm erro padrão da média (EPM). A inferência será realizada através de análise da variância (ANOVA) de uma via, com fator repetição e teste post hoc de Bonferroni quando aplicável. Valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos, sendo que o n amostral utilizado foi de 3 animais por dose.

4 RESULTADOS

Este estudo foi realizado com amostra de 72 camundongos swiss, machos, de 60 dias de idade, com massa corporal de $36,9 \pm 0,2$ gramas, com as doses 1 mg/kg, 0.1 mg/kg e 0.01 mg/kg. Os animais foram submetidos à tarefa do Campo Aberto, ao Teste de força de preensão, ao Rotarod, ao Step Down, ao Labirinto em Cruz elevada e ao Labirinto de Barnes.

No teste de força de preensão apenas o grupo com 1 mg/kg diminuiu a força com relação ao grupo controle ($[3,8] = 4,074$, $P = 0,0498$, $p < 0,05$, fig 7), os outros grupos não apresentaram significância estatística.

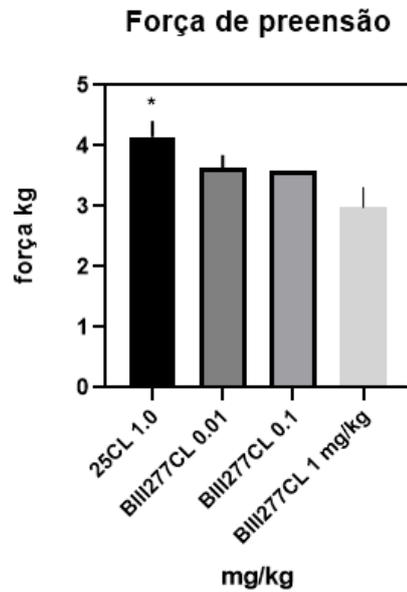


Figura 7. Teste de força de preensão. Realizado com 12 animais divididos de acordo com as doses. O asterisco remonta a variância significativa observada na diminuição da força de preensão do grupo 1 mg/kg em relação ao grupo controle

Já na tarefa do campo aberto, o grupo 0.1 mg/kg apresentou uma menor distância percorrida em relação ao controle, enquanto o grupo BIII 277 CL 1 mg/kg percorreu uma distância maior em relação ao grupo controle ($[F(3,8) = 18,78, P = 0,0006, p < 0,05, \text{fig } 8]$), os demais grupos não apresentaram variações estatisticamente significantes.

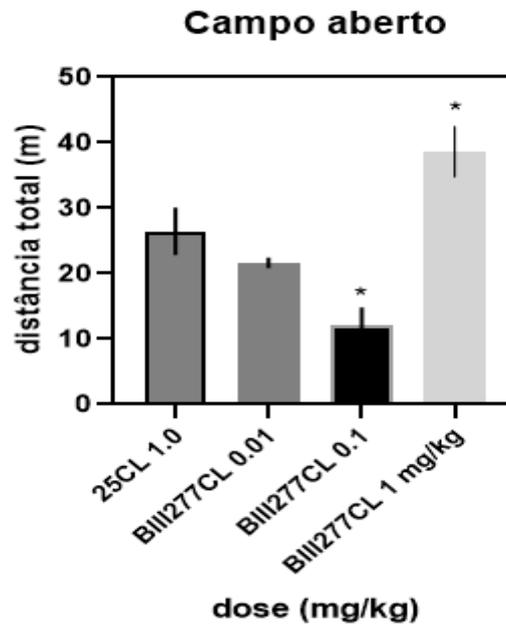


Figura 8. Campo aberto, realizado com 12 animais divididos em 4 grupos de 3 animais, no qual pode-se observar uma variação da distância percorrida pelos animais, sendo que o grupo BIII 277 CL percorreu uma distância maior em relação ao grupo controle, enquanto o grupo 0.1 mg/kg percorreu uma distância menor em relação ao grupo controle

Ainda no campo aberto, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, houve diferença no número de levantamentos, sendo que o grupo BIII 277 CL 1mg/kg apresentou um maior número em relação ao grupo controle ($P= 0,0214$, $p < 0,05$, fig 9).

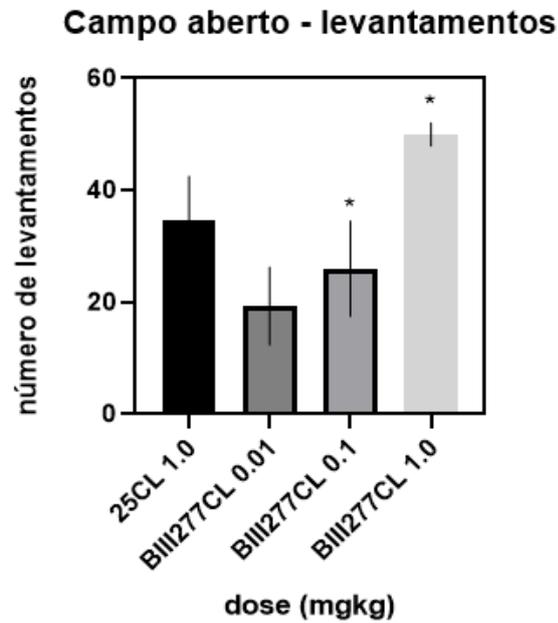


Figura 9. Campo aberto - número de levantamentos. O teste foi realizado com 12 animais divididos em 4 grupos, nele pode-se observar que o grupo BIII 277 CL apresentou um maior número de levantamentos quando comparado ao grupo controle.

Na análise da latência, no Rotarod, no primeiro dia de teste, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($F(3,8) = 2,166$, $P=0,1700$, $p>0,05$, fig 10). No entanto, no segundo dia de teste, o grupo 1 mg/kg apresentou uma menor latência comparado ao grupo controle [$F(3,8) = 8,677$, $P= 0,0068$, $p < 0,05$, fig 10], demonstrando um déficit motor.

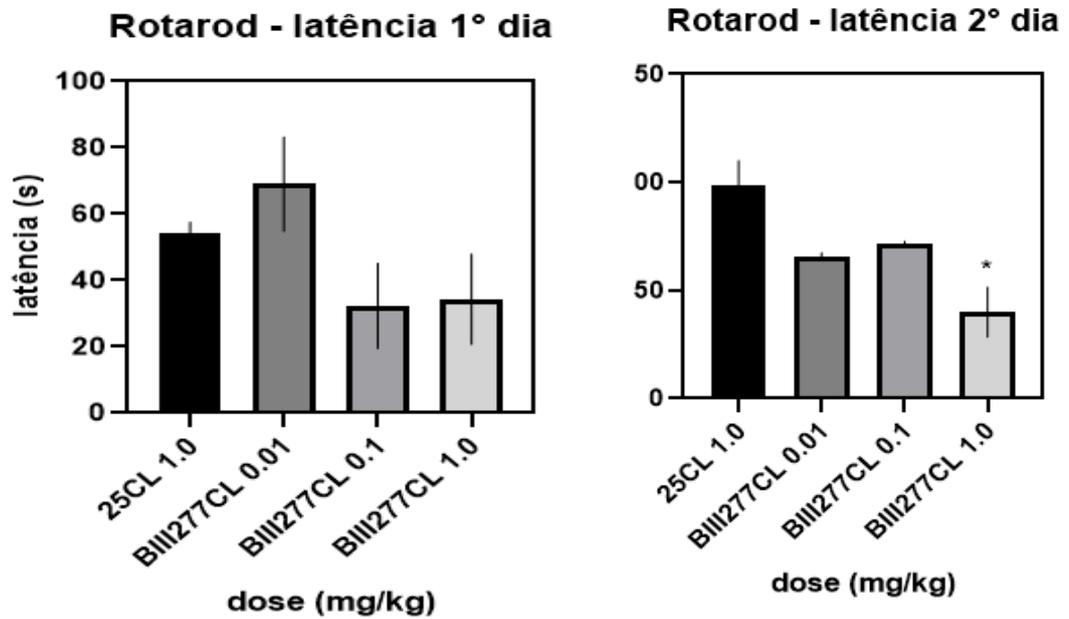


Figura 10. Rotarod - latência no primeiro e segundo dias. É possível observar que, no primeiro dia, não se obteve diferenças significativas entre os grupos. No segundo dia, o grupo BIII 277 CL apresentou uma latência diminuída quando comparado ao grupo controle, que pode ser representada pelo asterisco.

Foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa também quanto à latência, sendo que, no segundo dia, quando comparado ao primeiro, os grupos 1 mg/kg, 0.1 mg e 0.01 mg/kg demonstraram uma latência menor em relação ao grupo controle [(F 3,8) = 5,383, P=0,0254, $p < 0,05$, fig 11).

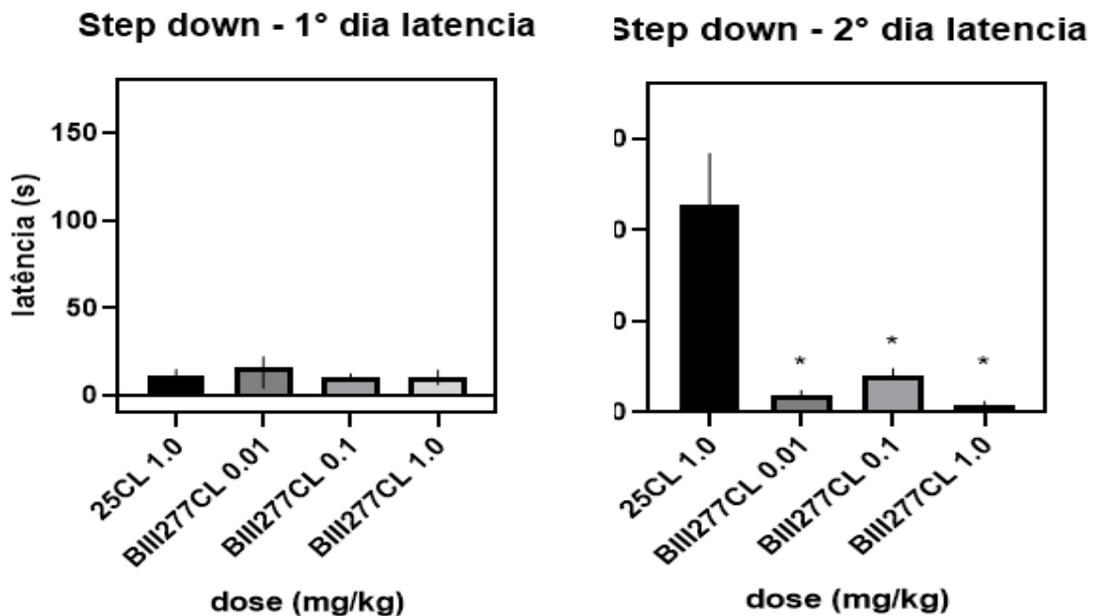


Figura 11. Step Down – latência. No segundo dia, observa-se uma latência diminuída nos grupos BIII 277 CL 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg e 1 mg/kg, representada pelo asterisco.

A análise dos resultados no teste em cruz elevada permitiu observar uma série de variáveis. Dentre elas, o tempo em que o animal permaneceu no braço fechado. Nesta análise, o grupo 1 mg/kg permaneceu um menor tempo em relação ao grupo controle ($[3,8] = 12,97$, $P = 0,0019$, $p < 0,05$, fig 12). Já quando se observa o tempo permanecido no braço aberto, também no primeiro dia, o grupo 1mg/kg permaneceu um período maior de tempo quando comparado ao grupo controle [$F(3,8) = 8,300$, $P = 0,0077$, $p < 0,05$, fig 13). Comparando o tempo no braço aberto entre o primeiro e o segundo dia, ainda é possível observar que o grupo 1mg/kg permaneceu por mais tempo que os demais grupos [$F(3,8) = 17,86$, $P = 0,0007$, $p < 0,05$, fig 13).

Cruz elevada- Tempo braço fechado 1° dia

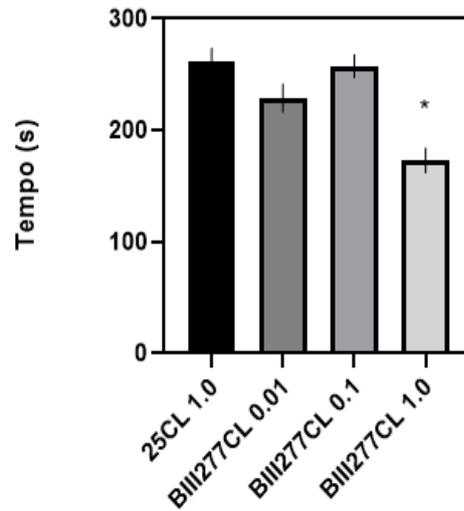
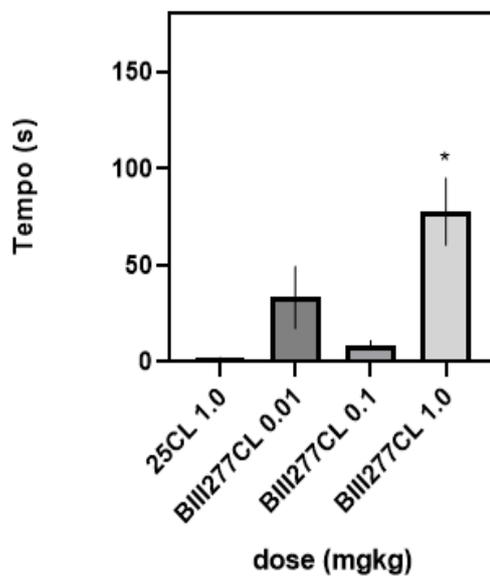


Figura 12. Cruz elevada – tempo braço fechado 1° dia. O grupo BIII 277 CL apresentou um tempo permanecido na região do braço fechado do aparato menor comparado ao grupo controle.

Cruz elevada- Tempo braço aberto 1° dia



Cruz elevada- Tempo braço aberto 2° dia

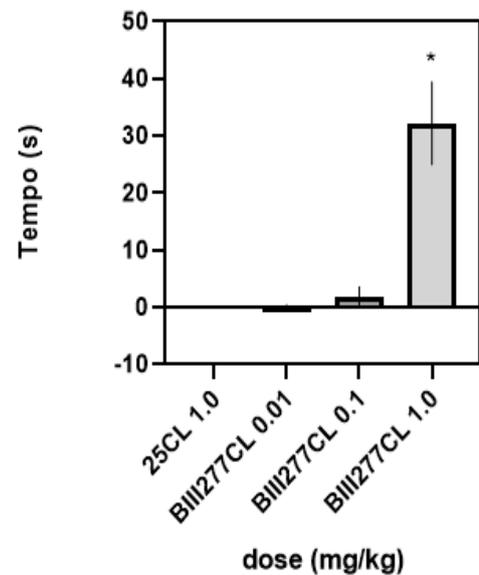


Figura 13. Labirinto de Cruz elevada. O grupo BII 277 CL apresentou um tempo permanecido na região de braço aberto do aparato maior que o grupo controle nos dois dias de experimento.

Por fim, na análise de latência primária, no primeiro dia do treinamento do Labirinto de Barnes, o grupo 1mg/kg apresentou uma maior latência quando comparado ao grupo controle ($F(3, 8) = 4,635$, $p < 0,05$, $P = 0,0368$, **fig 14**), os demais grupos não apresentaram diferenças significativas. Já em relação à latência secundária, no primeiro dia, não houveram variações estatísticas significativas entre os grupos ($F(3, 8) = 0,4271$, $p > 0,05$, $P = 0,7391$ **fig 14**). No entanto, apenas os animais do grupo 1mg/kg não entraram no esconderijo.

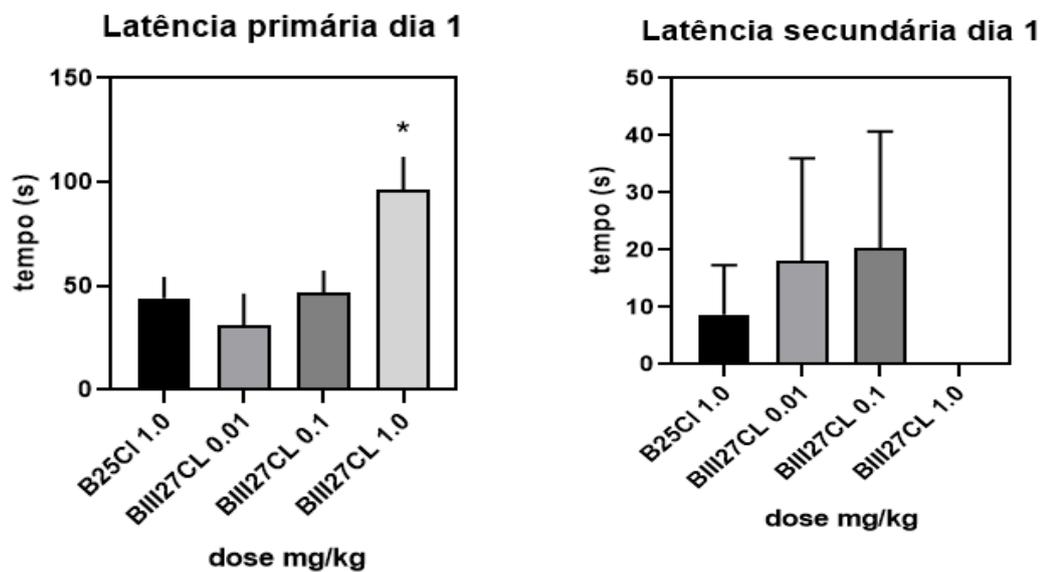


Figura 14. Labirinto Barnes- Latência primária e secundária, primeiro dia. É possível observar que o grupo BIII 1 mg/kg apresentou uma maior latência primária quando comparado ao grupo controle, ou seja, o tempo levado para encontrar o local com o esconderijo foi maior. Já em relação à latência secundária, nenhum animal do grupo 1 mg/kg entrou no esconderijo, enquanto todos os animais dos demais grupo entraram.

No segundo dia de treinamento, não houveram diferenças estatísticas entre os grupos ($F(3, 8) = 2,447$, $p > 0,05$, $P = 0,1386$, **fig 15**), em relação à latência primária. O mesmo ocorreu com a latência secundária no segundo dia de treinamento ($F(3, 8) = 1,605$, $p < 0,05$, $P = 0,2632$, **fig 15**).

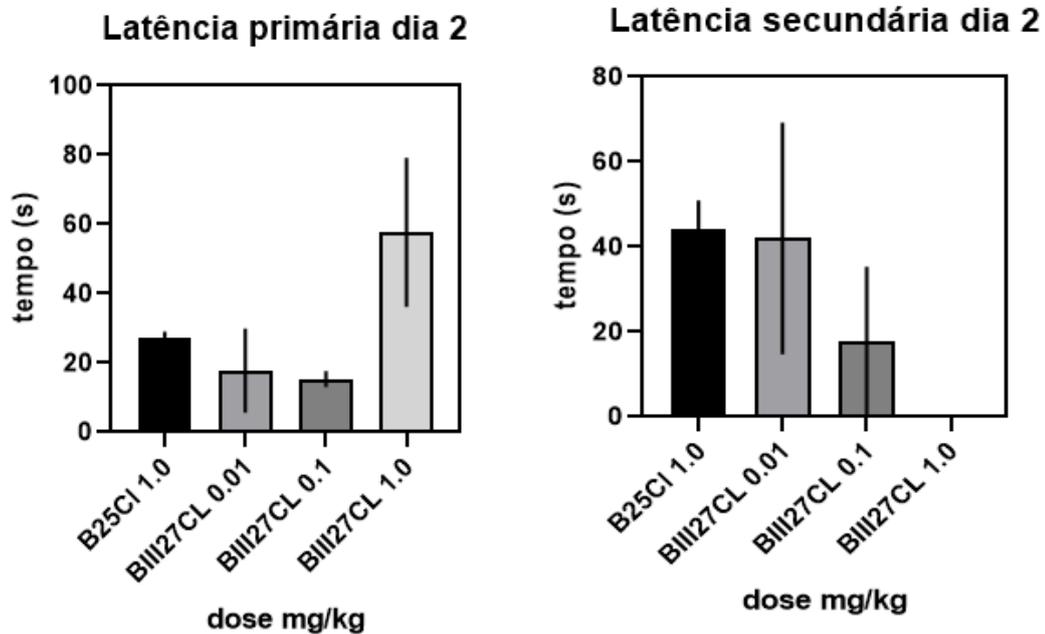


Figura 15. Labirinto Barnes - latência primária e secundária, segundo dia. No segundo dia, é possível observar que os animais do grupo 1 mg/kg permaneceram com uma latência primária elevada, quando comparados ao grupo controle. Enquanto isso, os animais deste grupo, foram os únicos que não entraram no esconderijo.

No dia do teste e último dia de experimento, o grupo 1 mg/kg apresentou uma latência aumentada em relação ao grupo controle ($F(3, 7) = 5,524$, $p < 0,05$, $P=0,0291$, fig 16), não houve variações estatisticamente significativas entre os demais grupos.

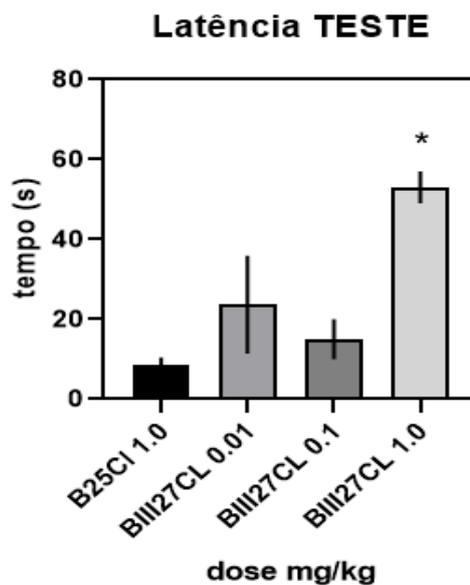


Figura 17. Labirinto Barnes - latência, dia teste. No último dia do experimento, os animais do grupo 1 mg/kg permaneceram com uma latência primária elevada quando comparados aos animais do grupo controle.

Uma última análise possível é em relação ao tipo de estratégia utilizada. Neste contexto, foi possível observar que os animais, ao longo dos treinamentos até o dia teste, migraram de uma estratégia aleatória para a direta, exceto o grupo 1mg/kg (fig 17).

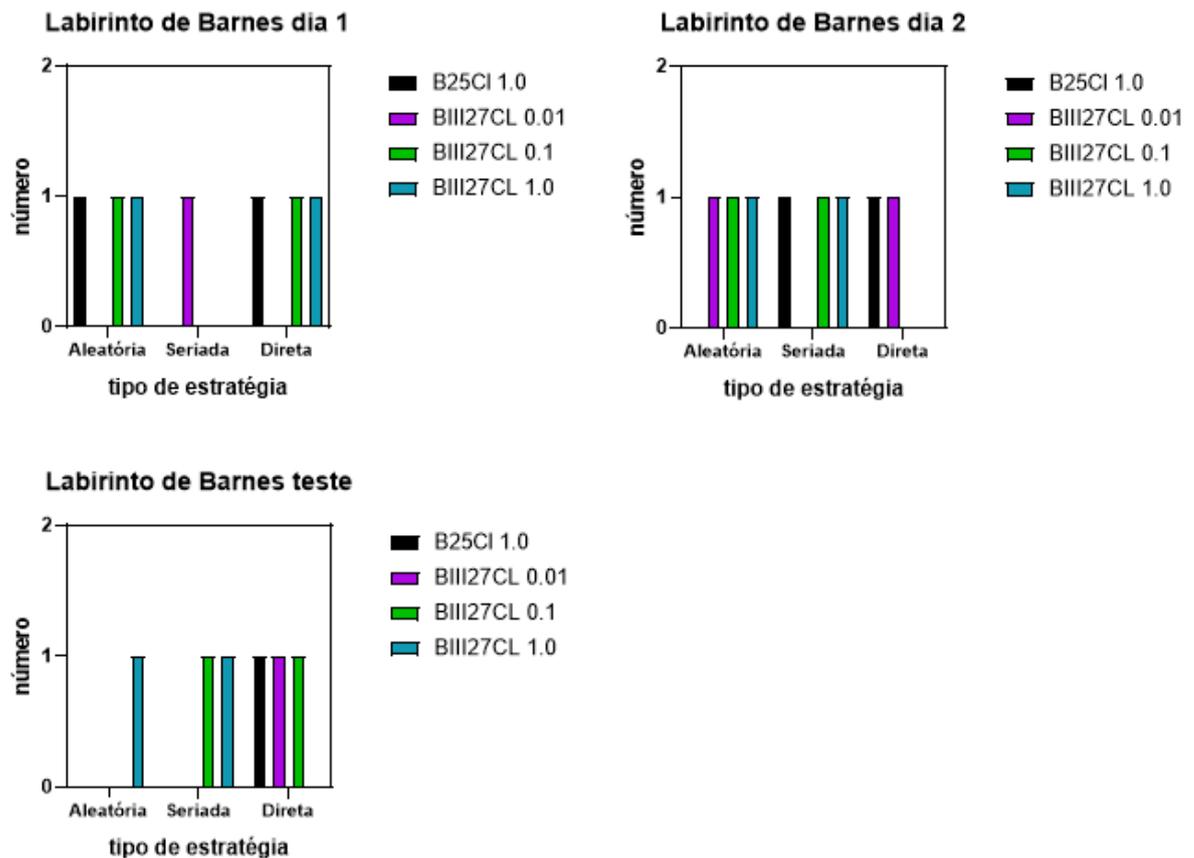


Figura 19. Labirinto Barnes - tipos de estratégias. Observa-se que todos os animais migram para o tipo de estratégia direta, o esperado em situações normais. No entanto, os animais do grupo 1 mg/kg, representados pela cor azul são os únicos que não utilizam da estratégia direta, permanecendo nas estratégias aleatória e seriada.

A utilização das estratégias para encontrar o esconderijo podem ser bem observadas, também, por meio de mapa de calor que demonstra o deslocamento do animal, além dos locais em que ele permaneceu. Ao se analisar esses mapas, é possível observar que os grupos 25 CL, 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg possuem um deslocamento que se inicia na região central da plataforma, onde são colocados para o teste e finaliza no local correto, previamente demarcado. Entretanto, os animais do grupo 1 mg/kg apresenta um deslocamento variado, o que resulta da sua dificuldade em encontrar o local demarcado. Esses resultados refletem o

melhor os efeitos do antagonista BIII 277-CL nos animais tratados com doses distintas, que apresentaram um prejuízo motor, efeito amnésico e ansiolítico.

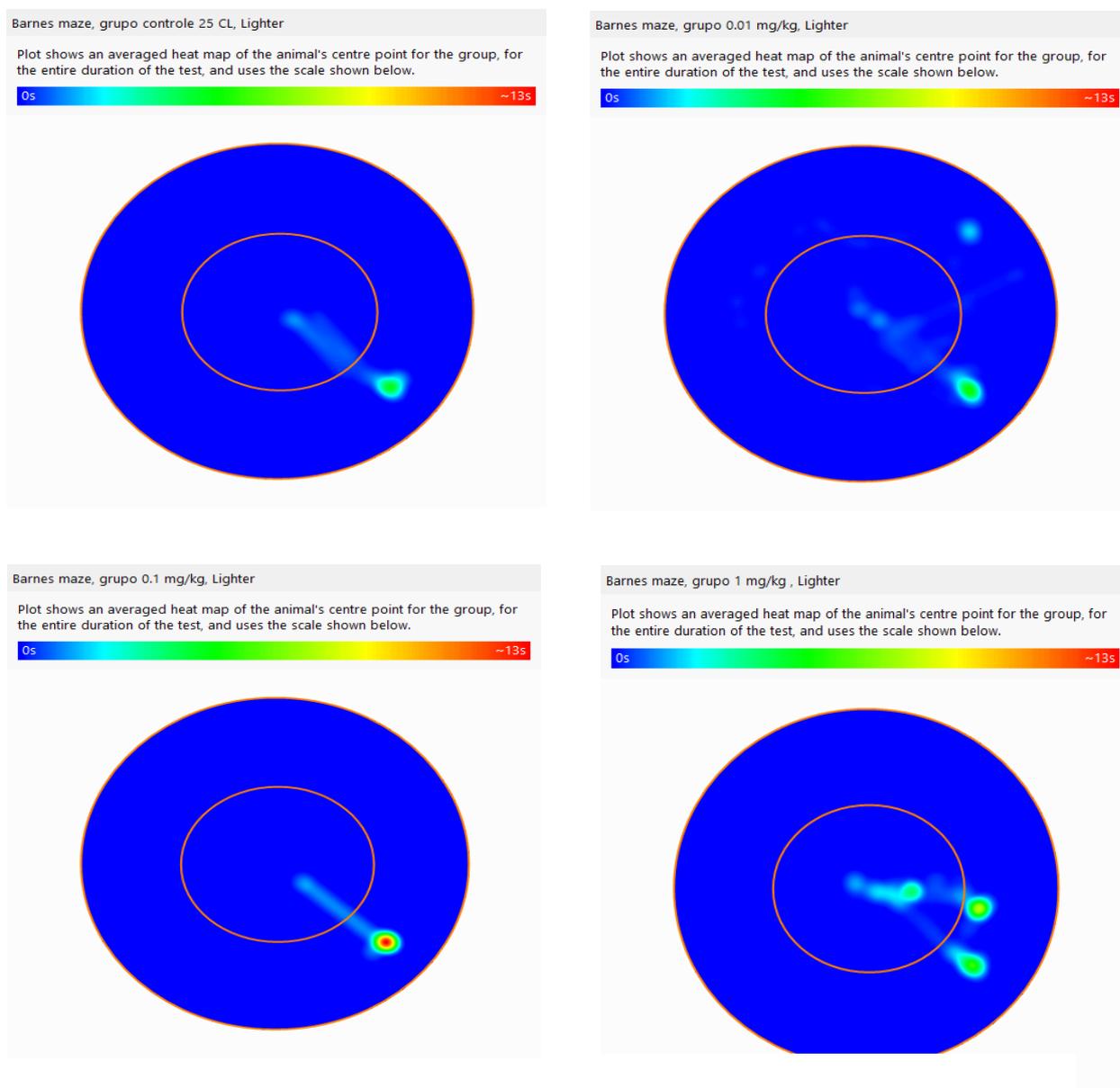


Figura 21. Labirinto Barnes - Tipos de estratégias, mapa de calor. Por meio dele, pode-se observar o tipo de estratégia e o deslocamento do animal no dia teste. Pode-se observar que os animais do grupo controle, 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg apresentaram um deslocamento direcionado do centro ao local demarcado, enquanto os animais do grupo 1 mg/kg apresentaram um deslocamento distinto, não permanecendo no local demarcado.

5 DISCUSSÃO

Este projeto foi desenvolvido com o objetivo de estudar os efeitos do antagonista não competitivo do receptor NMDA, BIII 277-CL. Os estudos a respeito deste fármaco na literatura concluíram um prejuízo motor em altas doses, mas não discorreram sobre possíveis prejuízos na memória e efeitos comportamentais. Com isso, este estudo foi embasado nas doses e tempo de ação descritos no estudo de (CARTER *et al.*, 1996) (PSCHORN; CARTER, 1996).

5.1. Efeitos motores do BIII 277-CL

Em nosso projeto, o grupo experimental recebeu administração via subcutânea das doses: 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg e 1 mg/kg e o grupo controle recebeu uma dose de 25 CL 1 mg/kg 5 minutos antes dos testes. Neste contexto, o grupo 1 mg/kg apresentou prejuízo motor em relação aos demais grupos na tarefa rotarod, principalmente, no segundo dia (figura 10). Esse resultado demonstra o prejuízo na coordenação motora causado quando doses mais altas foram utilizadas. Resultados semelhantes foram observados por Carter *et al.* (1996), que relatou distúrbios na coordenação motora em camundongos e ratos que foram submetidos ao teste de rotarod em diferentes intervalos em doses distintas com o intuito de observar os efeitos motores em animais.

O estudo de Carter *et al.* (1996), ainda comparou os efeitos neuroprotetores do BIII 277-CL com outro antagonista do receptor NMDA, o (+) MK801. Neste, ambos previnem a inibição dos efeitos do NMDA na síntese de proteínas e, embora os efeitos de BIII 277 CL entre 5 a 15 min após a administração serem comparáveis aos do (+) MK801, os efeitos do BIII 277 CL diminuíram mais rapidamente quando comparados com os efeitos do (+) MK801 nas mesmas condições. Os distúrbios motores, no presente estudo, podem ser observados também no teste de força de preensão, em que os grupos com altas doses de BIII 277 CL possuíram uma força menor comparado ao grupo controle (figura 7).

5.2. Efeitos amnésicos e ansiolíticos do BIII 277 CL

Um trabalho de Kugaya *et al.* (2005) a partir de estudos com ressonância magnética, obteve como resultado que pacientes com depressão apresentaram níveis corticais elevados de glutamato e reduzidos de GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC. Com isso,

fármacos que causem uma reversão dos níveis elevados de glutamato passaram a ser utilizados no tratamento antidepressivo (Kugaya *et al.* 2005). Neste contexto, antagonistas do receptor NMDA induzem um efeito antidepressivo, dentre eles, o anestésico ketamina, induz um efeito rápido sustentado por até três semanas dos sintomas depressivos Kugaya *et al.* (2005). Ademais, estudos demonstram a presença e participação de receptores do tipo NMDA em estruturas relacionadas com respostas de medo e ansiedade (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2008; RESSTEL, 2008). Em nosso estudo, efeitos ansiolíticos foram verificados nos animais nos quais foram administrados a dose de 1 mg/kg, o que pode ser observado nos testes de Cruz elevada, Campo aberto e Barnes (figuras 9, 12, 13 e 14). Nestes testes, houveram um maior número de levantamentos do grupo 1 mg/kg, ademais, os animais deste grupo permaneceram um tempo maior na região de braço aberto do labirinto de cruz elevada em relação aos demais. Nessa linha, os animais apresentaram um comportamento exploratório evidente quando comparado ao grupo controle no labirinto de Barnes, sendo que não apresentaram a ação de busca ao esconderijo, mas sim, de exploração do aparato, diferente dos outros animais.

Por fim, a Ketamina, também é utilizada como anestésico geral, sendo que pode ser acompanhado de amnésia e analgesia (FLETCHER *et al.*, 2002). O efeito amnésico foi observado no nosso estudo, ao se observar testes como o step down e labirinto de Barnes, nos quais os animais do grupo 1 mg/kg demonstraram um prejuízo da memória (fig 11,15,16 e 17). Com isso, como a literatura previamente discutiu, o BIII 277 CL se mostra mais eficaz no tratamento de isquemia focal, uma vez que por mais que conceda o efeito amnésico, sua duração é mais curta do que a da ketamina que, geralmente, é de 3 horas, além de ser contraindicada em casos de problemas psiquiátricos, insuficiência coronária e cardíaca e hipertensão intracranial (WHITE *et al.*, 1982)

6 CONCLUSÃO

Foram observadas neste estudo diferenças significativas entre o grupo BIII 277 CL 1 mg/kg e o grupo controle 25 CL 1 mg/kg na tarefa do campo aberto, no teste de força de preensão, step down, rotarod, cruz elevada e barnes. Em todos estes, o grupo BIII 277 CL obteve resultados distintos comparados ao grupo controle, evidenciando os efeitos motores, amnésicos e ansiolíticos deste fármaco. Pode-se observar que, principalmente, a dose de 1 mg/kg não é indicada para estudos posteriores por acarretar os efeitos os efeitos amnésicos e ansiolíticos

REFERÊNCIAS

GUEDES DA PAZ, E.; DE JESUS DA SILVA MENDES, D. .; NOGUEIRA BRITO, S.; OLIVEIRA BARBOSA, W. . Doenças neurodegenerativas em adultos e idosos: um estudo epidemiológico descritivo. **Revista Neurociências**, [S. l.], v. 29, p. 1–11, 2021. DOI: 10.34024/rnc.2021.v29.12348. Disponível em: <https://periodicos.unifesp.br/index.php/neurociencias/article/view/12348>. Acesso em: 17 jun. 2022.

ELBAZ, Alexis; MOISAN, Frédéric. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. **Current Opinion In Neurology**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 454-460, ago. 2008. Mensal. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/wco.0b013e3283050461>. Disponível em: https://journals.lww.com/coneurology/Fulltext/2008/08000/Update_in_the_epidemiology_of_Parkinson_s_disease.12.aspx. Acesso em: 10 jun. 2022.

ABRAMCZUK, Beatriz; VILLELA, Edlaine. A luta contra o AVC no Brasil. **ComCiência**, n. 109, p. 0-0, 2009.

HYMAN, Steven E.. Neurotransmitters. **Current Biology**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 154-158, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.037>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982205002083?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jun. 2022

ROSNAN, John T.; BROSNAN, Margaret E.. Glutamate: a truly functional Amin acid. **Amino Acids**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 413-418, 18 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-012-1280>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22526238/>. Acesso em: 05 jun. 2022

REYNOLDS, Ij *et al.* Multiple sites for the regulation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 581-584, 1 jun. 1988. Disponível em: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/33/6/581.long>. Acesso em: 17 jun. 2022.

ROTHMAN, Steven M. *et al.* Excitotoxicity and the NMDA receptor. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 299-302, jul. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90177-9](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(87)90177-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166223687901779>. Acesso em: 10 maio 2022.

BENVENISTE, Helene *et al.* Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 1369-1374, nov. 1984. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb05396.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.1984.tb05396.x>. Acesso em: 17 jun. 2022.

BEZARD, Erwan *et al.* Relationship between the Appearance of Symptoms and the Level of Nigrostriatal Degeneration in a Progressive 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Lesioned Macaque Model of Parkinson's Disease. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 21, n. 17, p. 6853-6861, 1 set. 2001. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.21-17-06853.2001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11517273/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

OLIVARES, David; DESHPANDE, Varun K.; SHI, Ying; LAHIRI, Debomoy K.; GREIG, Nigel H.; ROGERS, Jack T.; HUANG, Xudong. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. **Current Alzheimer Research**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 746-758, 1 jun. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156720512801322564>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5002349/>. Acesso em: 16 jun. 2022.

CHOI, Dennis W.. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 58-60, fev. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)80018-w](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(95)80018-w). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016622369580018W>. Acesso em: 17 jun. 2022.

ROTHMAN, S.M.; THURSTON, J.H.; HAUHART, R.e.; CLARK, G.D.; SOLOMON, J.s.. Ketamine protects hippocampal neurons from anoxia in vitro. **Neuroscience**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 673-678, jun. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90028-5](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(87)90028-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0306452287900285>. Acesso em: 10 jun. 2022.

FOSTER, Alan C.; WONG, Erik H.F.. The novel anticonvulsant MK-801 binds to the activated state of the N-methyl-d-aspartate receptor in rat brain. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 403-409, jun. 1987. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1987.tb10295.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853511/?page=1>. Acesso em: 07 jun. 2022.

GILL, R; FOSTER, Ac; WOODRUFF, Gn. Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 3343-3349, 1 out. 1987. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.07-10-03343.1987>. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/7/10/3343.short>. Acesso em: 17 jun. 2022.

W.OLNEY, John *et al.* Alterações Patológicas Induzidas em Neurônios Cerebrocorticais por Fenciclidina e Drogas Relacionadas. **Science**, [S.I.], v. 244, n. 4910, p. 1360-1362, 16 jun. 1989.

GRAUERT, Matthias; BECHTEL, Wolf Dietrich; ENSINGER, Helmut A.; MERZ, Herbert; CARTER, Adrian J.. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 6,7-Benzomorphan Derivatives as Antagonists of the NMDA Receptor–Channel Complex. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 40, n. 18, p. 2922-2930, 1 ago. 1997. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm970131>

CARTER, Adrian J. *et al.* Wolf Dietrich Bechtel: biii 277 cl is a potent and specific ionchannel blocker of the nmda receptor-channel complex.. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [S.I.], v. 275, n. 3, p. 1382-1389, 3 ago. 1995.

PSCHORN, Uwe; CARTER, Adrian J.. The influence of repeated doses, route and time of administration on the neuroprotective effects of BIII 277 CL in a rat model of focal cerebral ischemia. **Journal Of Stroke And Cerebrovascular Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 93-99, nov. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1052-3057\(96\)80010](http://dx.doi.org/10.1016/s1052-3057(96)80010).

TAKESHITA, Hikari; YAMAMOTO, Koichi; NOZATO, Satoko; INAGAKI, Tadakatsu; TSUCHIMOCHI, Hirotsugu; SHIRAI, Mikiyasu; YAMAMOTO, Ryohei; IMAIZUMI, Yuki; HONGYO, Kazuhiro; YOKOYAMA, Serina. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male

mice. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-9, 8 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep4323>.

NAKAGAWA, Hikaru; MATSUNAGA, Daisuke; ISHIWATA, Takayuki. Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. **Journal Of Thermal Biology**, [S.L.], v. 87, p. 102458, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102458>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306456519303237?via%3Dihub>. Acesso em: 23 jun. 2022.

SHOJI, Hirotaka; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57 BL /6J strain maintained under a genetic stability program. **Neuropsychopharmacology Reports**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 100-118, 27 fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/npr2.12052>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/npr2.12052>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SHIOTSUKI, Hiromi; YOSHIMI, Kenji; SHIMO, Yasushi; FUNAYAMA, Manabu; TAKAMATSU, Yukio; IKEDA, Kazutaka; TAKAHASHI, Ryosuke; KITAZAWA, Shigeru; HATTORI, Nobutaka. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal Of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 189, n. 2, p. 180-185, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20359499/>. Acesso em: 19 jun. 2022.

DEACON, Robert M.J.. Measuring Motor Coordination in Mice. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 75, p. 2609-2069, 29 maio 2013. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/2609>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3724562/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

BARNES, C. A.. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat.. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, [S.L.], v. 93, n. 1, p. 74-104, 1979. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h007757>.

PITTS, Matthew. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. **BioProtocol**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 2744-2744, 2018. Bio-Protocol, LLC. <http://dx.doi.org/10.21769/bioprotoc.2744>. Disponível em: <https://bio-protocol.org/e2744>. Acesso em: 30 jun. 2022.

RODRIGUES, David Henrique *et al.* Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S.L.], v. 69, n. 6, p. 938942, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004282x2011000700018>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/JCdmzDcnCFrGQLPfr9hD4CF/?lang=en>. Acesso em: 19 jun. 2022.

PINTO, Wladimir Bocca Vieira de Rezende; KO, Gui Mi; VALERO-LAPCHIK, Valderez Bastos; ARIZA, Carolina Batista; PORCIONATTO, Marimélia. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **R. Soc. Bras. Ci. Anim. Lab**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 102-120, dez. 2012.

JIANG, Chuantao *et al.* Dopaminergic Properties and Experimental Anti-Parkinsonian Effects of IPX750 in Rodent Models of Parkinson Disease. **Clinical Neuropharmacology**, [S.I.], v. 27, n. 2, p. 63-73, abr. 2004. Disponível em: https://journals.lww.com/clinicalneuropharm/fulltext/2004/03000/dopaminergic_properties_and_experimental.4.aspx. Acesso em: 04 jul. 2022.

LEARY, Stevem *et al.* **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition**. 2020. ed. [S.I]: Avma, 2020. 121 p. Disponível em: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2022.

ROTHMAN, Steven M.; OLNEY, John W.. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 105-111, fev. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410190202>.

IKONOMIDOU, Chrysanthy *et al.* Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. **Science**, [S.L.], v. 283, n. 5398, p. 70-74, jan. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.283.5398.70>.

CHOI, D. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 623-634, out. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90162-6](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(88)90162-6).

KOH, Jae-Young; CHOI, Dennis W.. Selective blockade of non-NMDA receptors does not block rapidly triggered glutamate-induced neuronal death. **Brain Research**, [S.L.], v.

548, n. 1-2, p. 318-321, maio 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91140-v](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)91140-v).

CHOI, Dennis W.. Excitotoxic cell death. **Journal Of Neurobiology**, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 1261-1276, nov. 1992. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/neu.480230915>.

DANYSZ, Wojciech *et al.* Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for alzheimer's disease — a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. **Neurotoxicity Research**, [S.L.], v. 2, n. 2-3, p. 85-97, jun. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03033787>.

FLETCHER, D *et al.* Ketamina. **Emc - Anestesia-Reanimación**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 1-7, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1280-4703\(02\)71819-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1280-4703(02)71819-7).

ANACORA, Gerard *et al.* Towards a glutamate hypothesis of depression. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 63-77, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.036>

KUGAYA, Akira *et al.* Beyond Monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **Cns Spectrums**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 808-819, out. 2005. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1092852900010403>.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**, v.1240, p.39-46, 2008