

Láise Figueiredo de Oliveira

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CETAMINA E ISOFLURANO A LONGO E MÉDIO PRAZO EM MODELOS ANIMAIS

Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, orientada por Professor Doutor Frederico Pereira e apresentada por Serviço de Higiene e Medicina Social da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Setembro/2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



• U • C •

FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

LAÍSE FIGUEIREDO DE OLIVEIRA

Avaliação do efeito da Cetamina e Isoflurano a longo e médio prazo em modelos animais

Dissertação de Mestrado em Saúde Pública apresentada ao Serviço de Higiene e Medicina Social da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, sob orientação do Prof. Dr. Frederico Pereira (Universidade de Coimbra) e Prof. Dra. Carla Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina), como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde Pública.

Coimbra, 2015

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre dirigir meus passos.

A minha família maravilhosa. Meus pais Marcos Rolo e Rosângela Velez, minhas irmãs Louise Figueiredo e Laísa Figueiredo (*in memoriam*), meu cunhado Vitor Hugo Alves e minha sobrinha Laura Renucci, pelo amor a mim dedicados, pelo incentivo diário mas principalmente, pela inspiração. Ao meu querido, Nielsen Andrade pela força, incentivo, amor, paciência e por sua grande ajuda.

Aos meus tios Darcísio Ludwig e M^a Irene Rolo de Oliveira Ludwig, minha prima Fátima Ludwig por terem me recebido em seu lar. Um agradecimento mais que especial a minha tia Irene, que me contagia todos os dias com sua força, sua torcida e inteligência admirável. Sem a Senhora eu jamais teria conseguido.

A minha amiga Gisseila Garcia pela companhia, incentivo e carinho.

A minha orientadora, Dra. Carla Inês Tasca, pela oportunidade e pela paciência, por ter aberto as portas da UFSC à mim.

Ao meu orientador Dr. Frederico Pereira, pela paciência, por ter apostado em mim, pela simpatia e toda a atenção dedicados durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha “pra sempre” orientadora Clarice Cunha Taveira e Pollyana Farias pelo indispensável incentivo inicial.

Um agradecimento mais que especial ao meu primo Dr. Fernando Ludwig. Nada é mais contagioso que o exemplo!

A todos os colegas do Laboratório de Neuroquímica 4, pela paciência e ajuda. Por terem tornado tão agradável os meus momentos de estudo. Em especial a minha amiga Dra. Leandra Costa Constantino pela incrível paciência e didática, muito obrigada! A Tharine Dal-Cim, Luísa B. Binder, Fabiana K. Ludka, Carine Bropp, Flávia Lopes, Gabriela Poluceno, Karen Oliveira, Ana Paula Costa e Wagner Carbolin pela companhia e por toda a ajuda nos experimentos e nas discussões deste trabalho.

Ao Professor Dr. Rui Prediger pela oportunidade de colaboração e contribuição na discussão dos resultados dos testes comportamentais. A Tuane Bazanella Sampaio pelo auxílio e por representar tão bem o LEXDON.

RESUMO

Introdução: apesar de haver escassa informação sobre a segurança na utilização de anestésicos gerais para o sistema nervoso central em desenvolvimento, a sua utilização em pacientes pediátricos é generalizada. Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito neurotóxico e subsequente compromisso cognitivo imposto pela administração de dois medicamentos anestésicos gerais: a cetamina, representante da classe dos antagonistas dos receptores de N- metil-D-aspartato (NMDA); isoflurano, representante da classe dos agonistas dos receptores ácido gama-aminobutírico (GABA).

Materiais e métodos: avaliaremos o efeito agudo (24h) e a longo prazo (60 dias) da exposição de ratos Wistar com 7 dias de vida (ratos jovens) a estes dois anestésicos gerais. Avaliaremos, em particular, a viabilidade celular e a morte celular no hipocampo e córtex frontal, nos dois tempos indicados. Avaliaremos também o perfil comportamental (actividade locomotora, memória declarativa e comportamento do tipo depressivo) 60 dias após a exposição a ambos os fármacos.

Resultados: a exposição de ratos wistar com 7 dias de vida a cetamina (20 mg/kg sc) induziu uma diminuição transitória da viabilidade celular sem provocar morte celular em nenhum dos tempos estudados, no hipocampo de ratos Wistar. Por outro lado, a cetamina não pareceu produzir neurotoxicidade no córtex frontal destes animais. Os animais jovens expostos durante duas horas a isoflurano a 3% não exibiram nem diminuição da viabilidade celular nem morte neuronal nas mesmas regiões cerebrais nos mesmos tempos estudados. Contudo os dois anestésicos gerais produziram uma redução na memória declarativa, 60 dias após a sua administração.

Conclusão: a exposição dos animais jovens a estes dois anestésicos gerais produziu perturbações na memória declarativa na idade adulta. Isto é sugestivo de que os fármacos tenham imposto alterações funcionais e/ou estruturais no hipocampo de animais jovens que permanecem no tempo. No entanto, mais estudos têm que ser feitos para esclarecer qual o mecanismo responsável por estas alterações cognitivas.

Palavras-chave: anestesia geral, pacientes pediátricos, cetamina, isoflurano, neurotoxicidade, hipocampo, córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Abstract: although there is little information about the safety use of general anesthetics for the central nervous system in development, use in pediatric patients is widespread. This study aims to evaluate the neurotoxic effect and subsequent cognitive compromise imposed by the administration of two general anesthetic drugs: ketamine, representative of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists receptors class; isoflurane, representative of gamma-aminobutyric acid (GABA) agonist receptors class.

Methods and materials: evaluate the acute (24h) and the long-dated (60 days) effects on 7 days old Wistar rats (young mice) to these two general anesthetics. Evaluate, in particular, the cell viability and cell death in the hippocampus and frontal cortex, by these indicated periods. Also evaluate the behavioral profile (locomotor activity, declarative memory and depressive-like behavior), 60 days after exposure to both drugs.

Results: exposure of 7 days old Wistar rats on ketamine (20mg/kg sc) induced a transient decrease in cell viability without causing cell death in the hippocampus of Wistar rats by any of the studied periods. However, ketamine did not seem to produce neurotoxicity in the frontal cortex of the animals. Young animals exposed on two hours at 3% of isoflurane did not showed nor decrease in cell viability, nor neuronal death in the same brain regions studied at the same period. Although the both general anesthetics induced a decrease on declarative memory, 60 days after the exposure.

Conclusion: the exposure of young animals to these general anesthetics produced disturbances in declarative memory in adulthood. This suggests that the drugs had imposed functional and structural changes which remains over the time in the hippocampus of young animals. However, more studies have to be done, in order to clarify the mechanism responsible for these cognitive changes.

Keywords: general anesthetics, pediatric patients, ketamine, isoflurane, neurotoxicity, hippocampus, prefrontal cortex.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HBSS	Solução tempão de Hank
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etanosulfônico
ISO	Isoflurano
PI	Iodeto de Propídeo
INAL	Via Inalatória
KET	Ketamine
KRB	Krebs Ringer Bicarbonato
MK-801	Maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de sódio/potássio ATPase
NMDA	N-metil-D-aspartato
PI	Iodeto de Propídeo
SNC	Sistema nervoso central
sc	Subcutânea
VHC	Veículo

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I – Cetamina

<u>Figura 1</u>	Neurônios corticais dos animais submetidos à Cetamina.....	15
<u>Figura 2</u>	Foto microscópica retirada após 24 horas da anestesia.....	15
<u>Figura 3</u>	MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 1.....	17
<u>Figura 4</u>	MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 1	18
<u>Figura 5</u>	MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 2.....	19
<u>Figura 6</u>	MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 2.....	19
<u>Figura 7</u>	PI em fatias de hipocampo do GRUPO 2.....	20
<u>Figura 8</u>	PI em fatias de hipocampo do GRUPO 2.....	20
<u>Figura 9</u>	Efeito da cetamina na atividade locomotora e exploratória dos ratos.....	22
<u>Figura 10</u>	Efeito da cetamina no teste de reconhecimento de um objecto novo.....	22
<u>Figura 11</u>	Efeito da cetamina no tempo de latência para quedas do cilindro rotativo.....	22
<u>Figura 12</u>	Efeito da cetamina no comportamento do tipo depressivo.....	23

Capítulo II – Isoflurano

<u>Figura 13</u>	MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 1.....	25
<u>Figura 14</u>	MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 1.....	25
<u>Figura 15</u>	MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 2.....	26
<u>Figura 16</u>	MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 2.....	26
<u>Figura 17</u>	PI em fatias de hipocampo do GRUPO 2.....	27
<u>Figura 18</u>	PI com fatias do córtex frontal do GRUPO 2.....	27
<u>Figura 19</u>	Efeito do isoflurano na atividade locomotora e exploratória dos ratos.....	29
<u>Figura 20</u>	Efeito do isoflurano no teste de reconhecimento de um objecto novo	30
<u>Figura 21</u>	Efeito do isoflurano na latência para quedas do cilindro rotativo	30

ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJECTIVO GERAL	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 ANIMAIS	10
3.2 FÁRMACOS	10
3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	11
3.3.1 <i>MTT (BROMETO DE 3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENIL-TETRAZÓLIO)</i>	11
3.4 ENSAIOS DE MORTE CELULAR	12
3.4.1 <i>IODETO DE PROPÍDEO</i>	12
3.5 TESTES DE COMPORTAMENTO	12
3.5.1 <i>CAMPO ABERTO</i>	12
3.5.2 <i>NADO FORÇADO</i>	13
3.5.3 <i>ROTAROD</i>	13
3.5.4 <i>RECONHECIMENTO DE OBJECTO</i>	13
4 RESULTADOS	14
CAPÍTULO I	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 RESULTADOS	17
CAPÍTULO II	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	31



1 INTRODUÇÃO

A anestesia geral é uma técnica que tem por objetivo reduzir a sensação de dor por meio de distintos mecanismos farmacológicos que deprimem reversivelmente a atividade do Sistema Nervoso Central (SNC). A anestesia geral é necessária em cirurgias complexas e de grande porte, para que os pacientes fiquem inconscientes. De facto, durante a anestesia geral, o paciente tem seus reflexos abolidos, amnésia, paralisia muscular e inconsciência, visto que os fármacos utilizados são os mais potentes depressores do Sistema Nervoso Central, (Goodman e Gilman, 2011).

Os anestésicos gerais mais usados atualmente são divididos em duas classes: aqueles que têm por mecanismos de ação a potenciação da inibição dos receptores α do ácido gama-aminobutírico (GABA) ou seja, são moduladores alostéricos desses receptores como por exemplo os benzodiazepínicos, barbitúricos, propofol, etomidato, isoflurano, enflurano e halotano. Dentre eles os mais usados são Isoflurano, Propofol e Etomidato. O outro mecanismo de ação é o antagonismo dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) como a Cetamina, Óxido Nitroso (N₂O) e Xenon. Destes, a Cetamina é o mais utilizado. No entanto, os medicamentos anestésicos gerais têm sido usados em pacientes pediátricos sem que se conheçam os feitos a longo prazo no Sistema Nervoso Central. Há um número crescente de estudos pré-clínicos em animais jovens (roedores e primatas não-humanos) que sugerem que anestésicos gerais podem provocar neurodegenerescência e apoptose neuronal generalizada com possíveis sequelas cognitivas (Rappaport *et al.*, 2007). Para alcançar o estado anestésico, esses medicamentos não são usados individualmente. É necessária uma combinação de medicamentos, um anestésico geral de uso parenteral, um anestésico geral de uso inalatório para manter a inconsciência, um analgésico intravenoso e um bloqueador neuromuscular (Rang *et al.*, 2008). O isoflurano, óxido nitroso, midazolam e a cetamina são os mais comumente usados em cirurgias pediátricas. Os dois últimos são usados como pré-anestésicos em cirurgias pediátricas devido a sua baixa toxicidade. Contudo, a sua segurança em pacientes pediátricos ainda é mal conhecida (Remadevi *et al.*, 2009). Estes estudos sublinham a crescente preocupação sobre o uso desses medicamentos em jovens doentes que estão em desenvolvimento cognitivo.

2 OBJECTIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito neurotóxico e subsequente compromisso cognitivo imposto pela administração de dois medicamentos anestésicos gerais: a cetamina, representante da classe dos antagonistas dos receptores de N- metil-D-aspartato (NMDA); isoflurano, representante da classe dos agonistas dos receptores ácido gama-aminobutírico (GABA). Avaliaremos o efeito agudo (24h) e a longo prazo (60 dias) da exposição de ratos Wistar com 7 dias de vida (ratos jovens) a estes dois anestésicos gerais. Avaliaremos, em particular, a viabilidade celular e, a morte celular no hipocampo e córtex frontal, nos dois tempos indicados. Avaliaremos também o perfil comportamental (actividade locomotora, memória declarativa e comportamento do tipo depressivo) 60 dias após a exposição a ambos os fármacos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 7 dias de vida provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos a uma temperatura de 22 °C, submetidos a um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (5 animais por caixa) e tiveram à sua disposição água e ração *ad libitum*. Todas as experiências foram aprovadas pelo Comitê de Ética Institucional local para Pesquisa Animal (CEUA/UFSC PP0551). Os protocolos da CEUA para experimentação animal prevê a redução do sofrimento dos animais. As experiências foram realizadas entre as 9:00 – 16:00 horas,

3.2 Fármacos

Foram utilizados os seguintes fármacos:

- Cetamina, Ketamine Hydrochloride (*RS*)-2-(2-chlorophenyl)-2-methylamino-cyclohexan-1-one da Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA). O medicamento foi diluído em soro fisiológico (NaCl 0,9%). A administração do fármaco foi feita por via subcutânea (20 mg/kg).

- Isoflurano, Isoforine 100% (1 mL/mL) fabricação por laboratório Cristália. A administração foi feita por via inalatória na concentração 3 vol %, por um período de 2 horas, utilizando-se um vaporizador calibrado da Bonther (Registro 10261120016 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA).

Os animais dos grupos 1 e 2 foram utilizados para ensaios de viabilidade celular e morte celular. As regiões analisadas foram o hipocampo e o córtex frontal.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

3.3.1 MTT (*Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio*)

O ensaio de MTT é utilizado para determinar a viabilidade celular (Mosman, 1983). Baseia-se na avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Com efeito, o MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água que é convertido a um formazan púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson e Fowler, 1999). A redução do MTT em formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular e será avaliada por espectrofotometria. Os animais foram sacrificados por decapitação e os seus hipocampos e córtex frontais foram rapidamente dissecados. Foram subsequentemente fatiados (0,4 mm de espessura) por um fatiador de tecidos Chopper. As fatias foram colocadas em placas de ELISA com 96 poços com 200 µl de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbox (95% O₂ - 5% CO₂); pH 7,4) durante 30 minutos. Em seguida, as fatias foram expostas a glutamato (10mM) (200 uL) durante 1 hora. Após este período, as fatias foram incubadas por mais 4 horas a 37 °C (estufa) no seguinte meio: 50% de Krebs-Ringer, 50% de meio de cultura (Dubelco's-MEM), 20 mM de HEPES (pH 7,4) e 100 g/ml de gentamicina. Após esse período, o meio foi substituído por uma solução de 0,5 mg/ml de MTT (200 uL). O sal de formazan formado foi solubilizado pela adição do mesmo

volume de dimetil-sulfóxido (DMSO). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida num leitor de Elisa (540 nm).

3.4 Ensaios de morte celular

3.4.1 Iodeto de Propídeo

A morte neuronal foi determinada através da incorporação de iodeto de propídio. O iodeto é um composto capaz de se intercalar na molécula de DNA (corante de ácidos nucleicos), produzindo fluorescência vermelha, quando excitado a 495 nm. Visto que o iodeto de propídio não penetra na membrana de células viáveis, este método permite avaliar a integridade de membrana. Essas características tornam o ensaio de Iodeto de Propídeo um bom indicativo de morte celular na sequência da ruptura da membrana celular (Macklis e Madison, 1990). As fatias de hipocampo e de córtex frontal foram expostas ao iodeto de propídio (200 µl) por uma hora.; a morte celular foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm (leitor de Elisa).

3.5 Testes de Comportamento

Os animais do GRUPO 2 foram submetidos aos testes de comportamento aproximadamente 60 dias após serem tratado com cetamina.

3.5.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto permite avaliar a atividade estimulante ou depressora de um medicamento. A arena, feita de madeira e fórmica, é formada por um chão de cor branca (100 x 100 cm), dividida em 25 quadrantes de 20 x 20 cm, com paredes brancas de 40 cm de altura. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto, sendo que um sistema de câmara de vídeo captou as imagens do aparato. Entre a exposição de cada um dos animais, a arena foi higienizada com solução de etanol (30%). A atividade exploratória dos animais foi medida durante 5 minutos e considerou os seguintes parâmetros: a distância total percorrida; a velocidade média; o nº de cruzamentos com as 4 patas das linhas desenhadas na base; o nº de entradas no centro do campo aberto e o

tempo passado no centro. Os dados foram expressos como média \pm S.E.M. (erro-padrão da média).

3.5.2 *Nado forçado*

O estado emocional do tipo depressivo dos animais foi avaliado com o auxílio do teste da natação forçada, descrito por (Porsolt *et al.*, 1978). Os ratos foram colocados em cilindros de plástico individuais (40 cm de altura e 17 cm de diâmetro) contendo água (até a marca de 30 cm; $25 \pm$ °C). Duas sessões de natação foram realizadas (uma sessão de treino de 15 minutos e, 24 horas depois, uma sessão de teste de 5 minutos). A duração total de imobilidade foi manualmente marcada durante os 5 minutos.

3.5.3 *Rotarod*

O teste Rotarod avalia a coordenação motora dos animais (Hole *et al.*, 1990). O aparato Rotarod é uma caixa acrílica dividida em quatro compartimentos com um eixo giratório entre eles. Este eixo pode girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. Abaixo do eixo, localiza-se um sistema fotoelétrico, que permite o registro de queda do animal e a aplicação de um choque de 0 a 1 mA. Os ratos foram submetidos a três sessões de treino no aparelho do rotarod, sob aceleração contínua (1 rpm/s) durante 90 segundos. Sempre que houve uma queda, os animais foram submetidos a um choque de 0,3 mA. O parâmetro avaliado no teste de Rotarod incluiu o tempo de latência para quedas (ou de resistência para queda).

3.5.4 *Reconhecimento de objecto*

O teste de reconhecimento de objetos baseia-se na tendência natural do animal em explorar mais o objecto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. Assim, é um teste comportamental utilizado para avaliar a memória declarativa em roedores. Os animais do GRUPO 2 foram submetidos à sessão de treino por 10 minutos na arena de campo aberto com dois objetos de tamanho e forma iguais. A arena utilizada nesse teste foi a mesma utilizada no teste do Campo Aberto. Durante as experiências, cada rato foi colocado no centro do campo aberto, e um sistema de câmara de vídeo

captou as imagens do aparato. Entre a exposição de cada um dos animais, a arena foi higienizada com solução de etanol (30%). Cronometrou-se o tempo gasto explorando os objectos. A sessão de teste foi realizada 30 minutos após a sessão de treino. Nesta sessão, um dos objectos foi trocado por outro com uma forma diferente mas do mesmo tamanho. Espera-se que o animal passe mais tempo explorando o novo objecto.

Análise estatística

As análises estatísticas nos estudos bioquímicos foram realizadas utilizando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni entre grupos seleccionados. Os testes de comportamento foram analisados pelo software ANY-Maze. As comparações entre os grupos de testes comportamentais foi realizada através do teste-t de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em dois capítulos:

Capítulo I: Cetamina.

Capítulo II: Isoflurano.

CAPÍTULO I

Cetamina

Este capítulo apresenta os resultados relacionados a administração de Cetamina. Os animais foram separados em dois grupos. Os animais do primeiro grupo GRUPO 1 (n=4 animais para cetamina e solução salina) foram sacrificados 24 horas após o tratamento; os animais do segundo grupo GRUPO 2 (n=10 animais para Cetamina e n=7 animais para solução salina) foram submetidos a testes comportamentais e posteriormente sacrificados 60 dias após a administração de cetamina. Os resultados relativos a cada grupo estão representados nas figuras 1-12.

1 INTRODUÇÃO

A cetamina é um antagonista não competitivo dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Um dos primeiros estudos pré-clínicos a indicar que os antagonistas dos receptores NMDA causavam neurotoxicidade no SNC em desenvolvimento foi publicado em 1999 por Ikomidou *et al.* Estes autores submeteram ratos machos e fêmeas com 7 dias de vida a dizocilpina (MK801; um antagonista não seletivo dos receptores de NMDA). A neurodegenerescência observada neste estudo, incluindo apoptose, foi dependente da dose. Young *et al.*, (2005) demonstraram que a cetamina (20-40 mg/kg s.c) produziu apoptose no neo-córtex e nos gânglios da base em ratos de ambos os sexos e recém-nascidos. Adicionalmente foi sugerido que o bloqueio dos receptores NMDA pode influenciar a proliferação e diferenciação de células progenitoras e a migração das células neuronais, uma vez que estes os receptores são expressos nos primeiros estágios de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.

Wang *et al.*, (2006) estudaram culturas celulares preparadas a partir do córtex frontal de macacos-rhesus (fêmeas e machos) submetidos a cetamina (20 mg/kg, i.m.) quando tinham 3 dias de vida. Estes autores observaram que a cetamina causou fragmentação do DNA de forma dependente da concentração. Histologicamente as culturas celulares dos animais tratados com cetamina mostraram indícios de apoptose neuronal (Figura 1). Este estudo é relevante atendendo ao papel do córtex frontal na função cognitiva. Slikker *et al.*, (2007) demonstraram que 20-50 mg/kg cetamina produziram neurodegenerescência. Além disso, foi observado que houve uma queda na frequência cardíaca, na frequência respiratória e na pressão sanguínea bem como um aumento na concentração de expiração de CO₂ nos macacos tratados com cetamina em relação aos animais que não foram tratados com esse medicamento.



Figura 1. Os neurônios corticais dos animais submetidos à Cetamina exibem sinais de apoptose. Fonte: Wang *et al.*, 2006.

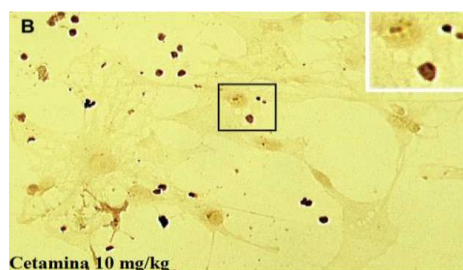


Figura 2. Foto microscópica retirada após 24 horas da anestesia. Cultura da região do córtex dos animais que receberam Cetamina 10 mg/kg. Os pontos pretos indicam apoptose neuronal. Fonte: Wang *et al.*, 2006.

Este estudo pretende avaliar o impacto da exposição de cetamina em ratos jovens na neurotoxicidade no hipocampo e no córtex frontal e na memória.

2 RESULTADOS

As figuras 3-6 ilustram a avaliação da viabilidade celular (ensaio de MTT) em fatias do hipocampo (figs. 3 e 5) e de córtex pré-frontal (figs. 4 e 6) de rato, 24h (grupo 1; figs. 3 e 4) e 60 dias (grupo 2; figs. 5 e 6) após administração de cetamina (20 mg/kg).

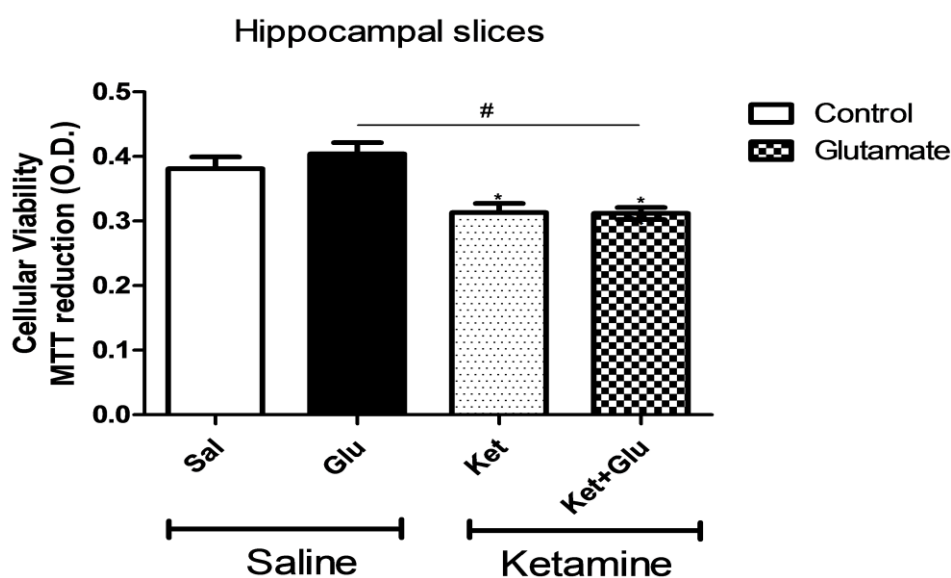


Figura 3. Ensaio de MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 1. As fatias de hipocampo foram mantidas em KRB (controle) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média ± EPM (n=4). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados. *p<0.05 vs Sal (100%); #p<0.05 Glu vs Ket+Glu.

A cetamina induziu diminuição de viabilidade celular em fatias de hipocampo, 24 horas após a sua administração (Fig. 3). Este efeito neurotóxico não foi agravado pelo glutamato. No entanto, a cetamina não produziu perda de viabilidade celular em fatias de córtex frontal mantidas nas duas condições experimentais testadas (Fig. 4).

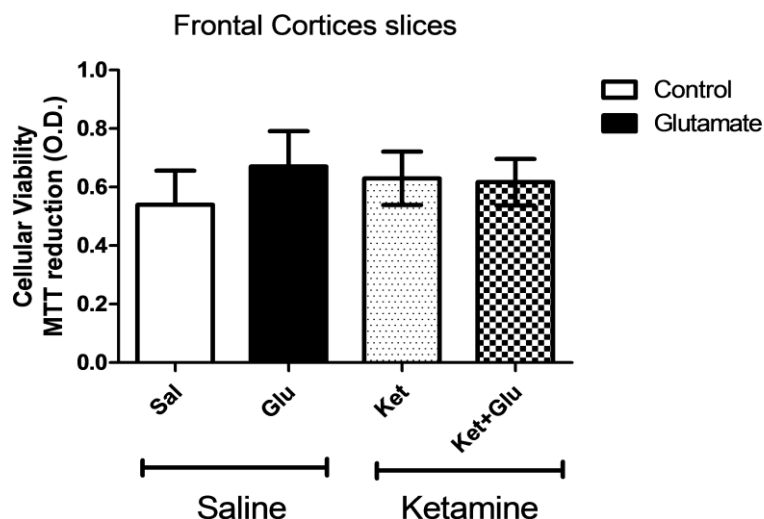


Figura 4. Ensaio de MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 1. As fatias foram mantidas em KRB (controle) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média ± EPM (n=4). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados.

A diminuição da viabilidade celular imposta pela cetamina no hipocampo é transitória. Na verdade, 60 dias após a administração de cetamina a viabilidade celular de fatias de hipocampo mantidas em KRB é normal (Fig. 5). No entanto, o glutamato diminuiu a viabilidade celular em fatias de hipocampo dos grupo Sal e Ket. (Fig. 5). Este fármaco também não perturbou a viabilidade celular em fatias de córtex frontal mantidas nas duas condições experintais, 60 dias após a administração deste anestésico (Fig. 6).

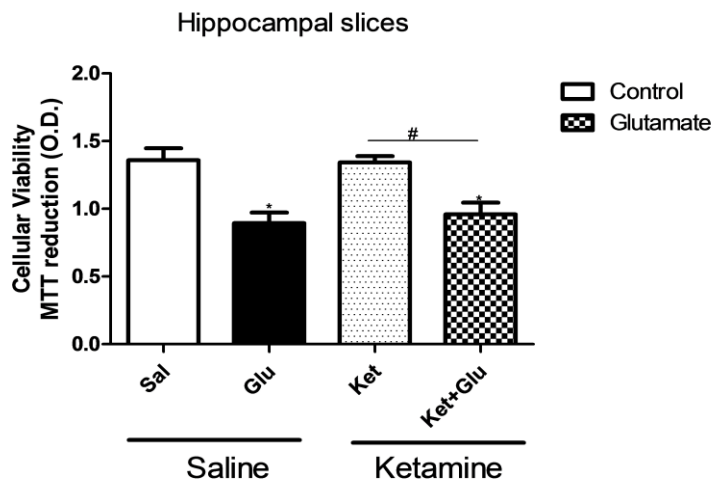


Figura 5. Ensaio de MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 2. As fatias foram mantidas em KRB (controle) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média ± EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados. *p<0,05 vs Sal; #p<0,05 Ket vs Ket +Glu indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%) e grupo KET+Glu; P <0,05.

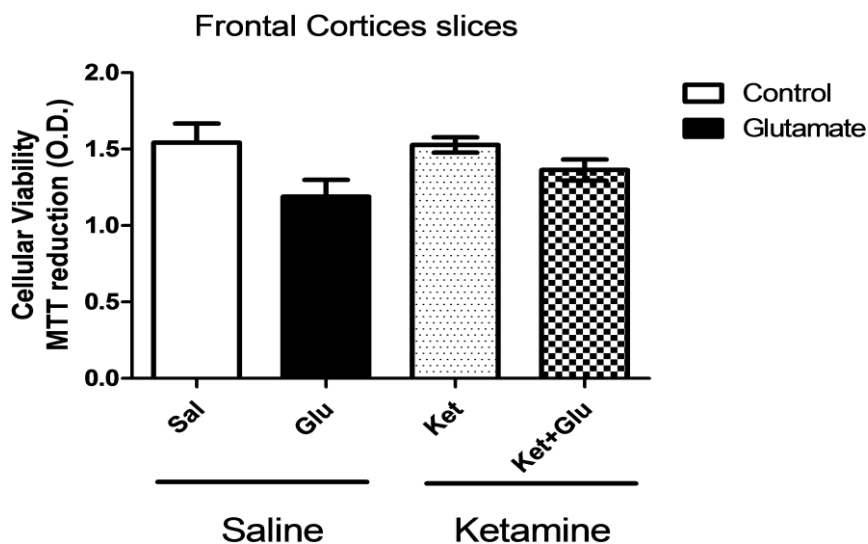


Figura 6. Ensaio de MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 2. As fatias foram mantidas em KRB (controle) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional

à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados.

Como é possível observar nos gráficos 7 e 8, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos no teste de incorporação do Iodeto de Propídeo (IP), sugerindo que a cetamina (20 mg/Kg, sc) não produziu morte celular em fatias de hipocampo e córtex frontal, 60 dias após a sua administração .

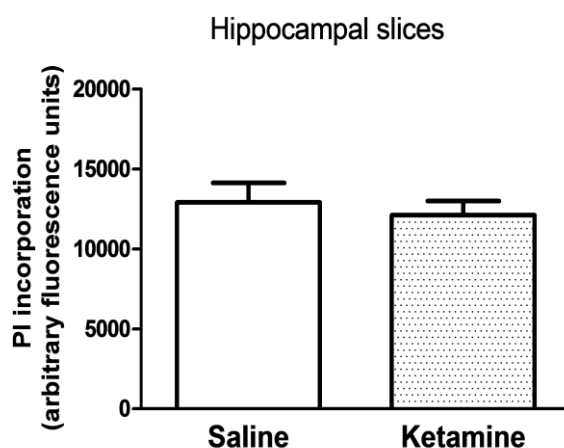


Figura 7. Ensaio de PI em fatias de hipocampo do GRUPO 2. As fatias de hipocampo foram expostas a 200 μ l iodeto de propídeo (PI) durante 1 hora; em seguida a morte celular foi quantificada por meio de leitura da absorbância (540 nm).. Os valores são representados pela média \pm EPM (n=5) (t-test).

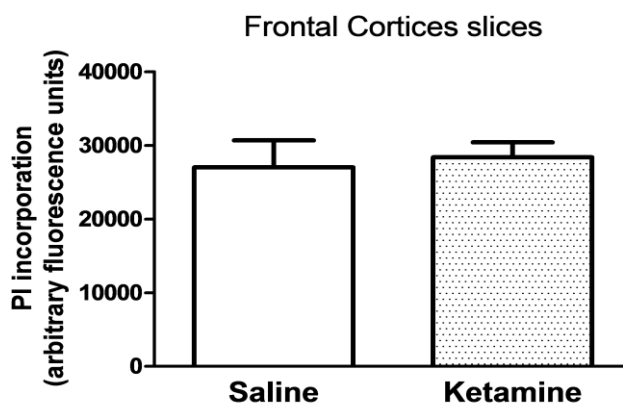
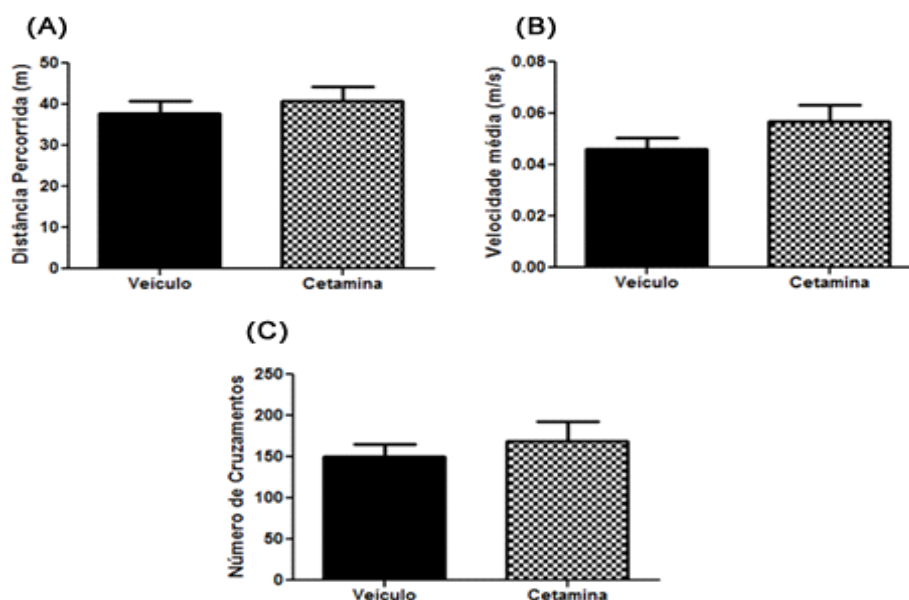


Figura 8. Ensaio de PI em fatias de córtex frontal do GRUPO 2. As fatias foram expostas a 200 μ l iodeto de propídeo (PI) durante 1 hora; em seguida a morte celular foi quantificada por meio de leitura da absorbância (540 nm). Os valores são representados pela média \pm EPM (n=5) (t-test).



A figura 9 demonstra que os animais administrados com cetamina tiveram um comportamento locomotor e exploratório semelhante aos animais controlo no teste de Campo Aberto, 60 dias após a administração do fármaco. Com efeito, todos os parâmetros medidos incluindo a distância total percorrida (A), a velocidade média (B), o nº de cruzamentos (C), o nº de entradas no centro do campo aberto (D) e o tempo passado no centro (E) não são significativamente diferentes entre os dois grupos ($p>0,05$). No período treino, os dois grupos passaram 50% do tempo a explorar cada um dos objetos (Fig. 10). Os animais administrados com cetamina apresentaram dificuldade em reconhecer o novo objecto durante o período teste. Esses resultados sugerem que a administração de 20 mg/kg de cetamina afetou a memória declarativa dos animais, 60 dias decorrentes a sua administração (Fig. 10). Os animais tratados com cetamina permaneceram mais tempo no cilindro rotativo do que os animais controlo, 60 dias após a sua administração (Fig. 11). Esse resultado sugere melhor coordenação motora dos animais que receberam 20 mg/kg sc de cetamina. Os dois grupos experimentais apresentaram o mesmo comportamento nos 3 parâmetros medidos no teste do nado forçado: (A) tempo de imobilidade; (B) tempo de escalada e (C) tempo de nado (Fig. 10). Isto sugere que a cetamina não induziu um comportamento do tipo depressivo nos animais, 60 dias após sua administração.



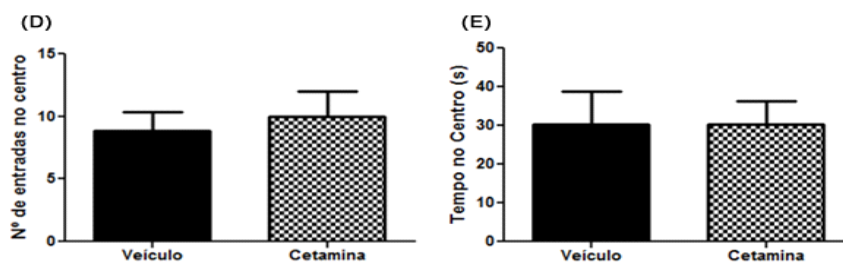


Figura 9. Efeito da cetamina na atividade locomotora e exploratória dos ratos, 60 dias pós-administração - teste de campo aberto. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: (A) a distância total percorrida; a (B) velocidade média (B); (C) o nº de cruzamentos; (D) o nº de entradas no centro do campo aberto; (E) o tempo passado no centro do campo aberto. Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test .

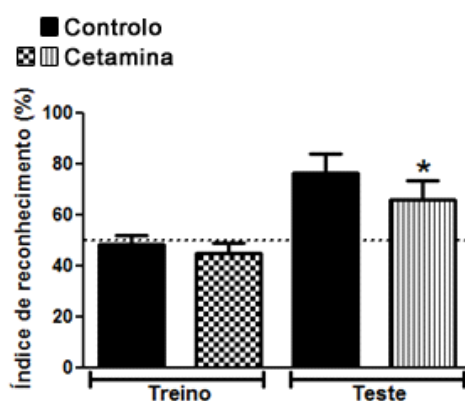


Figura 10. Efeito da cetamina no teste de reconhecimento de um objecto novo (60 dias pós-administração). As colunas representam as avaliações no treino e no teste. Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test. * $p < 0,05$ vs %50 de índice de reconhecimento do novo objecto.

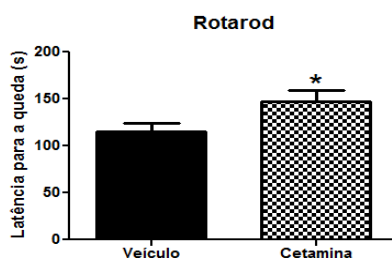


Figura 11. Efeito da cetamina no tempo de latência para quedas do cilindro rotativo (Rotarod) 60 dias pós-administração. Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test. * $p < 0,05$ vs veículo.

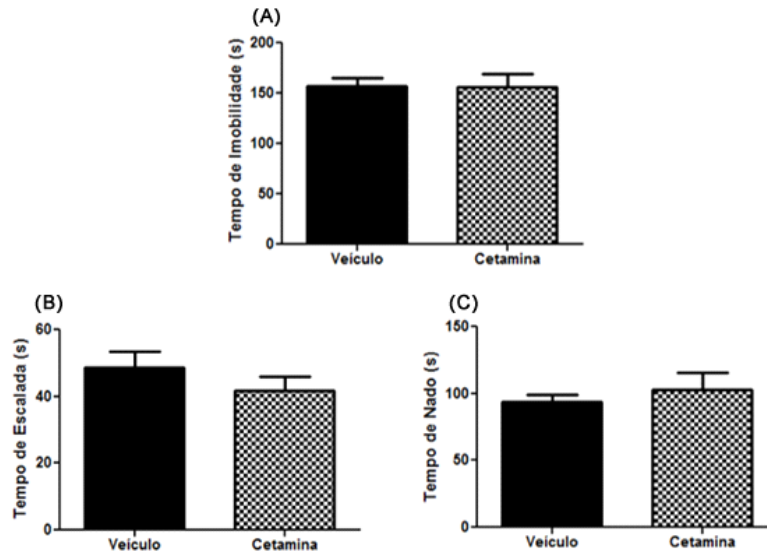


Figura 12. Efeito da cetamina no comportamento do tipo depressivo (teste do nado forçado) (60 dias pós-administração). A figura ilustra (A) o tempo de imobilidade; (B) o tempo de escalada e (C) o tempo de nado. Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test.

CAPÍTULO II

Isoflurano

Este capítulo apresenta os resultados relacionados com o isoflurano. Os animais foram divididos em dois grupos. Os animais do grupo 1 (n=4 para isoflurano e veículo) foram sacrificados 24 horas depois. O Grupo 2 (n=9 para isoflurano; n=8 para veículo) é formado por animais que foram submetidos ao testes comportamentais 60 dias depois da administração de isoflurano. Os resultados relativos a cada grupo estão representados nas figuras 13-21.

1 INTRODUÇÃO

O isoflurano é um anestésico volátil usado pela via inalatória (Goodman e Gilman, 2011). Apesar do seu mecanismo de ação ser mal compreendido, aceita-se que este anestésico potencie as ações do GABA. Segundo (Loepke *et al.*, 2006) o isoflurano confere ação neuroprotetora à isquemia e hipóxia. Por outro lado, há estudos que mostram que uma exposição longa a este medicamento pode produzir degeneração neuronal na sequência de um quadro de hipoglicemia e acidose metabólica (Lee *et al.*, 2015).

Stratmann *et al.*, (2009a) demonstraram que o isoflurano produziu uma diminuição da neurogênese e das funções neurocognitivas em ratos macho com 7 dias de vida, dependente da dose. Stratmann *et al.*, (2009b) administraram isoflurano a 3 vol % em crias de rato, machos e fêmeas. Estes autores constataram que o isoflurano produziu apoptose neuronal na região do hipocampo quando a anestesia durou mais do que 2 horas. Estes autores sugeriram que o aumento de gás carbônico no sangue arterial foi responsável por esta apoptose.

O nosso estudo pretende avaliar um possível efeito neurotóxico do isoflurano em ratos jovens.

2 RESULTADOS

As figuras 13-16 ilustram a avaliação da viabilidade celular (ensaio de MTT) em fatias do hipocampo (figs. 13 e 15) e de córtex frontal (figs. 14 e 16) de rato, 24h (grupo 1; figs. 13 e 14) e 60 dias (grupo 2; figs. 15 e 16) após administração de isoflurano (3 vol %). O isoflurano não alterou a viabilidade celular em fatias de hipocampo e córtex frontal, em nenhum dos tempos estudados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos no teste de incorporação do Iodeto de Propídeo (IP). Isto sugere que o isoflurano (3 vol %) não produziu morte celular em fatias de hipocampo e córtex frontal, 60 dias após a sua administração (Figs. 17,18).

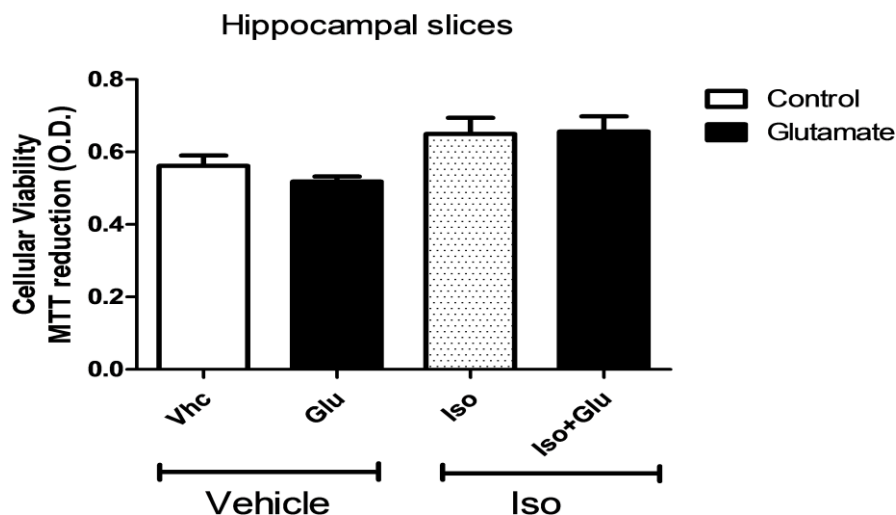


Figura 13. Ensaio de MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 1. As fatias de hipocampo foram mantidas em KRB (controle) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média ± EPM (n=4). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados.

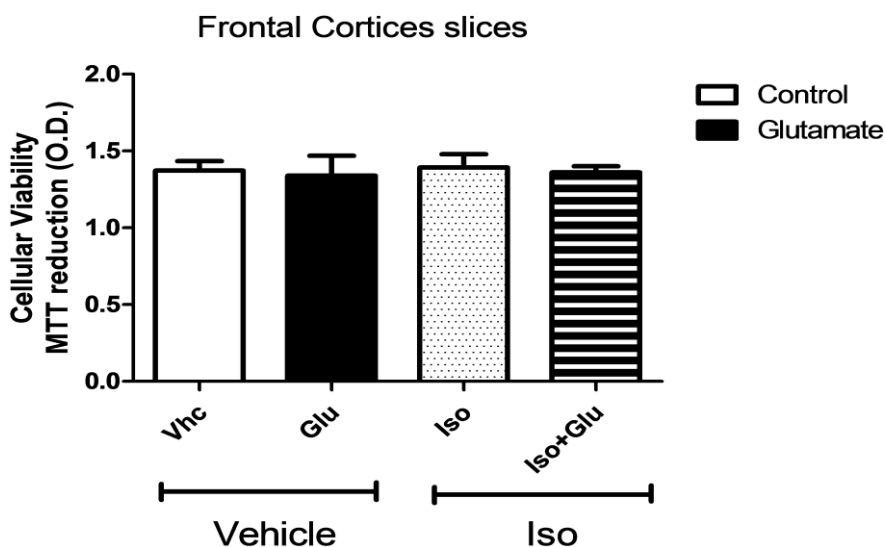


Figura 14. Ensaio de MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 1. As fatias foram mantidas em KRB (controlo) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a

média \pm EPM (n=4). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados.

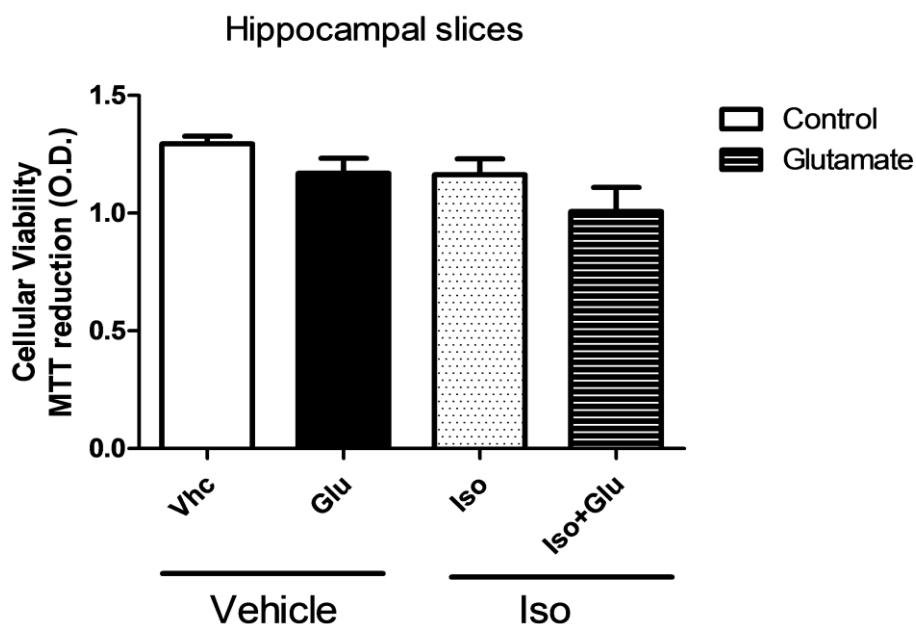


Figura 15. Ensaio de MTT em fatias de hipocampo do GRUPO 2. As fatias de hipocampo foram mantidas em KRB (controle) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média \pm EPM (n=4). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados.

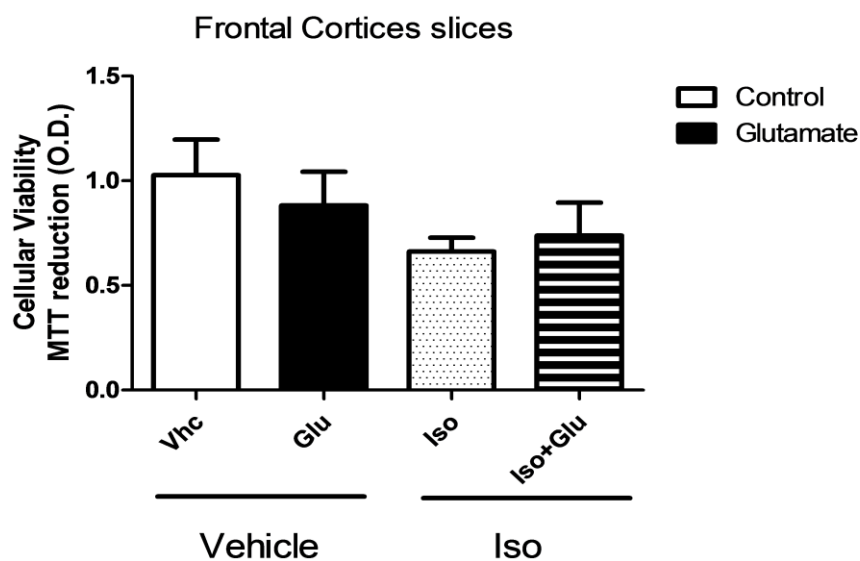


Figura 16. Ensaio de MTT em fatias de córtex frontal do GRUPO 2. As fatias foram mantidas em KRB (controlo) por 30min, e metade das fatias forma posteriormente incubadas com glutamato (10 mM) em KRB durante 1 hora; o meio foi trocado por

meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas à 37 °C em estufa. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) (incubação durante 20 minutos a 37° C). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm). Os valores representam a média ± EPM (n=4). A análise estatística foi realizada fazendo-se o teste ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni entre grupos seleccionados.

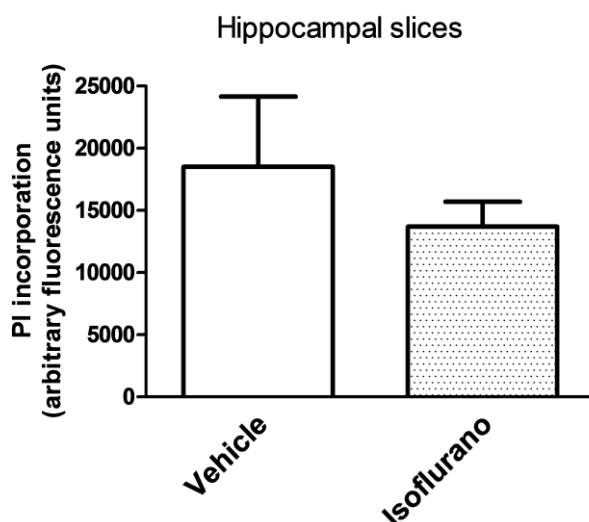


Figura 17. Ensaio de PI em fatias de hipocampo do GRUPO 2. As fatias de hipocampo foram expostas a 200 µl iodeto de propídio (PI) durante 1 hora; em seguida a morte celular foi quantificada por meio de leitura da absorbância em leitor de Elisa a 540 nm.. Os valores são representados pela média ± EPM (n=5) (t-test).

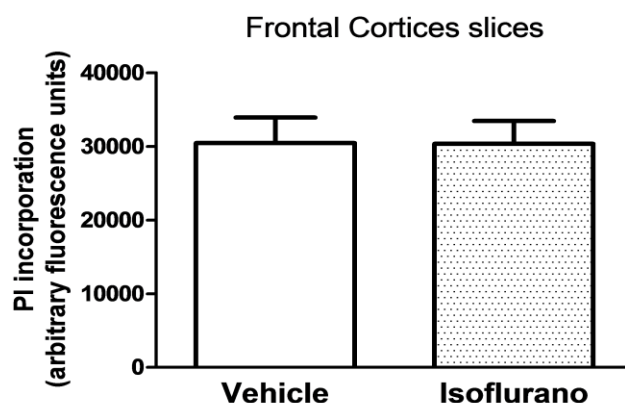


Figura 18. Ensaio de PI com fatias do córtex frontal do GRUPO 2. As fatias de hipocampais e foram expostas a 200 µl iodeto de propídio (PI) – por 1 hora, e em seguida morte celular quantificada por meio de leitura da absorbância em leitor de Elisa a 540 nm. Os valores representam a média ± EPM (n=5) (t-test).

O teste de campo aberto demonstrou que não houve alterações significativas entre os dois grupos, 60 dias após a administração de isoflurano. A figura 19 ilustra que a distância total percorrida (A), a velocidade média (B); o nº de cruzamentos (C); o nº

de entradas no centro do campo aberto (D) e o tempo passado no centro do campo aberto (E) foram semelhantes entre os dois grupos. Isto sugere que o isoflurano não alterou a actividade locomotora e a atividade exploratória dos ratos wistar, 2 meses após a exposição ao isoflurano.

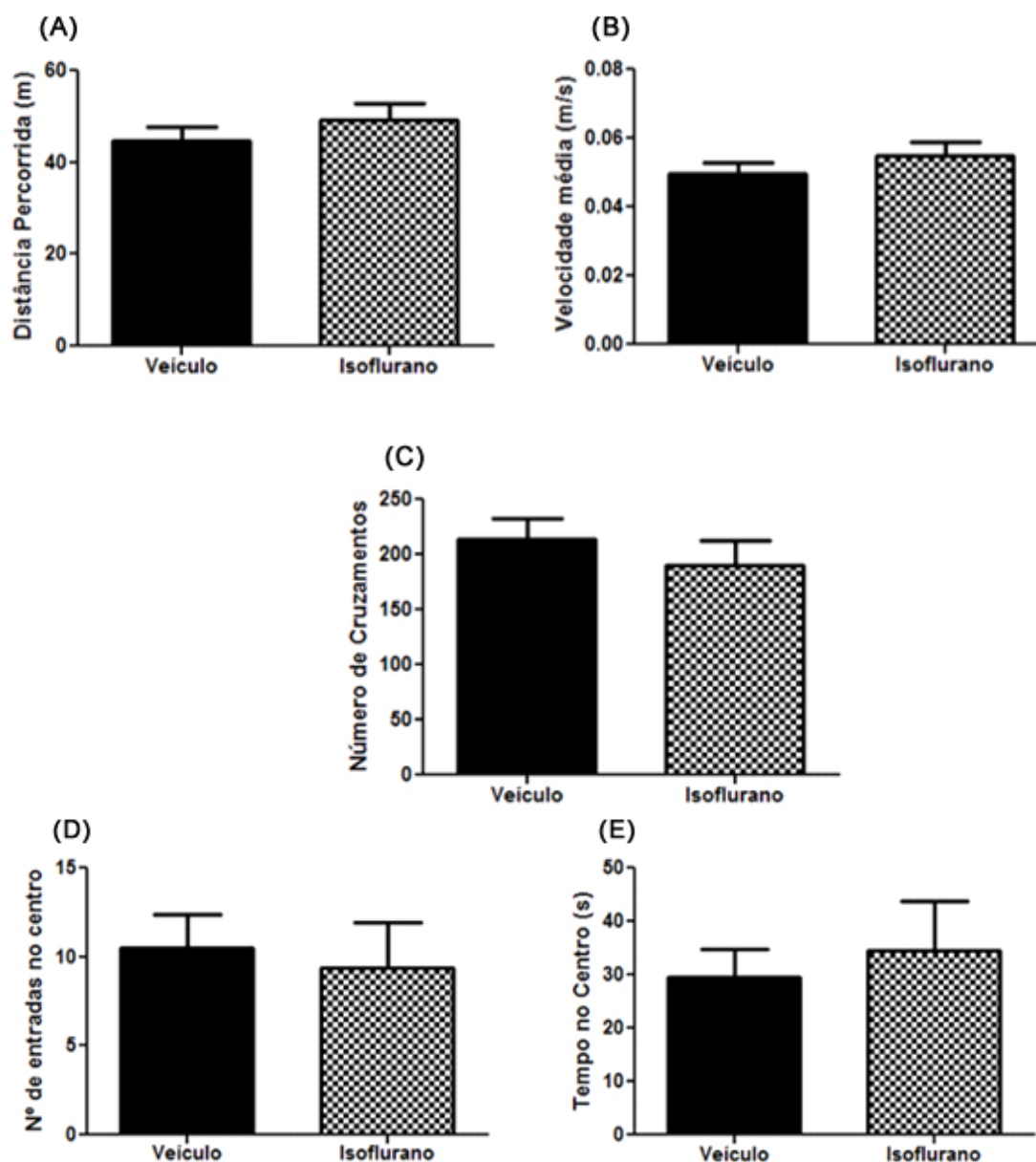


Figura 19. Efeito do isoflurano na atividade locomotora e exploratória dos ratos, 60 dias pós-administração - teste de campo aberto. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: (A) a distância total percorrida; a (B) velocidade média (B); (C) o nº de cruzamentos; (D) o nº de entradas no centro do campo aberto; (E) o tempo passado no centro do campo aberto. Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test .

No teste de reconhecimento de objecto, os animais que foram submetidos à administração de Isoflurano 3 vol % apresentaram uma dificuldade de reconhecer o novo objecto em relação ao grupo veículo (representado pela coluna preta) (Fig. 20). Esses resultados sugerem que a administração do isoflurano afetou a memória declarativa dos animais, 60 dias após a sua administração.

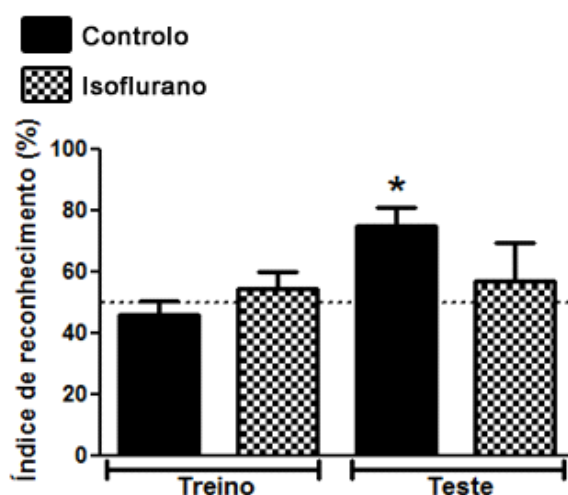


Figura 20. Efeito do isoflurano no teste de reconhecimento de um objecto novo (60 dias pós-administração). As colunas representam as avaliações no treino e no teste. Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test. *p<0,05 vs %50 de índice de reconhecimento do novo objecto.

No teste Rotarod, o tempo que os animais submetidos a isoflurano permaneceram no cilindro rotativo não foi significativamente diferente do tempo dos animais controlo (Fig. 21). Isto sugere que não houve alteração da coordenação motora, 60 dias após a administração do isoflurano,

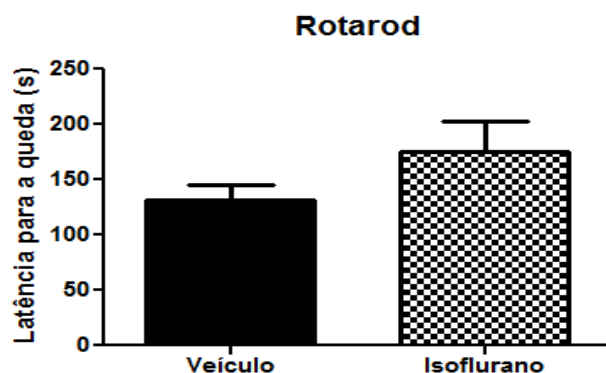


Figura 21. Efeito do isoflurano na latência para quedas do cilindro rotativo (Rotarod) (60 dias pós-administração). Os valores representam a média \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada fazendo-se o t-test.

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição de ratos wistar com 7 dias de vida a cetamina (20 mg/kg sc) induziu uma diminuição transitória da viabilidade celular sem provocar morte celular em nenhum dos tempos estudados, no hipocampo de ratos Wistar. Por outro lado, a cetamina não pareceu produzir neurotoxicidade no córtex frontal destes animais. É relevante acrescentar que a cetamina produziu uma diminuição da memória declarativa dos animais 2 meses após a exposição ao anestésico geral. Adicionalmente a cetamina pareceu melhorar a coordenação motora destes animais. Isto é sugestivo da cetamina também alterar o circuito neuronal cerebelar tal como foi sugerido por (Ordek *et al.*, 2013).

Os animais jovens expostos durante duas horas a isoflurano a 3% também evidenciaram perturbações da memória declarativa. No entanto, não houve alterações nem da viabilidade celular nem indução de morte neuronal em nenhuma das regiões estudadas, 24h e 60 dias após a exposição ao fármaco. Em suma, a exposição de animais jovens a dois anestésicos gerais produziu perturbações na memória declarativa de forma consistente com literatura recente (Wang *et al.* 2014; Lee *et al.* 2014). O presente estudo sugere que os fármacos tenham imposto alterações funcionais e/ou estruturais no hipocampo de animais jovens que permaneceram. Alterações na arborização dendrítica, na orientação axonal e na neurogénese podem estar na base das alterações permanentes de memória apresentadas neste trabalho (Erasso *et al.*, 2013; Mintz *et al.*, 2013; Platholi *et al.*, 2014).

O avanço da medicina faz com que os tratamentos para os vários tipos de patologias sejam cada vez mais bem sucedidos, a despeito de suas complexidades cirúrgicas. A utilização de anestésicos gerais como a Cetamina e o Isoflurano nesses vários procedimentos cirúrgicos buscam cumprir plenamente as condições necessárias de uma anestesia profunda. Sendo assim, é preciso preocupar-se quanto ao uso desses medicamentos, suas dosagens e suas vias de administração, a fim de elucidar completamente as condições mais seguras para a ministração dessas drogas em pacientes pediátricos, uma vez que eles estão em constante desenvolvimento cognitivo.

REFERÊNCIAS

Erasso D. M.; Camporesi E. M.; Mangar D.; Saporta S. Effects of Isoflurane or propofol on postnatal hippocampal neurogenesis in young and aged rats. *Brain Res.* v. 12. p. 1-12, sep. 2013

Goodman & Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica.* McGraw Hill: 12^o Edição.

Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal Immunol Methods* 119, 203-10, 1989.

Ikonomidou, C.; Bosch, F.; Miksa, M.; Bittigau, P.; Vöckler, J.; Dikranian, K.; Tenkova, T. I.; Stefovská, V.; Turski, L.; Olney, J. W. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science.*,v. 283, jan. 1999.

Jacobsson, S.O.; Fowler, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephalic cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. *Neurochem Int.* v. 34, p. 49-62, 1999.

Jevtovic-Todorovic, V.; Bensho, N.; Olney, J. W. Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats. *British Journal of Pharmacology.*, v. 130, n. 7, p. 1692-1698, ago. 2000.

Jevtovic-Todorovic, V.; Hartman, E. R.; Izumi, Y.; Benshoff, D. N.; Dikranian, K.; Zorumski, C. F.; Olney, J. W.; Wozniak, D. F. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 876-882, fev. 2003.

Jevtovic-Todorovic, V.; Hartman, E. R.; Izumi, Y.; Benshoff, D. N.; Dikranian, K.; Zorumski, C. F.; Olney, J. W.; Wozniak, D. F. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 876-882, fev. 2003.

Lee B. H.; Chan J. T.; Hazarika O.; Vutskits L.; Sall J. W. Early exposure to volatile anesthetics impairs long-term associative learning and recognition memory. v.10, aug. 2014

Lee Y. M.; Song B. C.; Yeum K. J. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. *Biomed Res Int.* may. 2015.

Loepke, A. W.; Mccann, J. C.; Kurth, C. D.; Mcauliffe, J. J. The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice. *Anesthesia & Analgesia.*, v. 102, n. 1, p. 75-80, jan. 2006

Macklis, J. D.; Madison, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in culture mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci. Meth*, v. 31, p. 43-46, 1990.

Mellon, R. D.; Simone, A. F.; Rappaport, B. A.; Use of anesthetic agents in neonates and young children. *Pediatric Anesthesia.*, v. 104, n. 3, march. 2007.

Mintz, C. D.; Barrett, K. M.; Smith, S. C.; Benson, D. L.; Harrison, N. L. Anesthetics interfere with axon guidance in developing mouse neocortical neurons in vitro via a γ -aminobutyric acid type A receptor mechanism. *Anesthesiology*. v. 118, p. 825-33, 2013.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* v. 65, p. 55-63, 1983

Ordek, G.; Groth, J. D.; Sahin M. Differential effects of ketamine/xylazine anesthesia on the cerebral and cerebellar cortical activities in the rat. *J Neurophysiol*. V.109, p. 1435-43, 2013

Platholi, J.; Herold, K. F.; Hemmings Jr, H. C.; Halpain, S. Isoflurane reversibly destabilizes hippocampal dendritic spines by an actin-dependent mechanism. July. 2014.

Porsolt, R. D.; Betin, A.; Jalfre, M. "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effect of imipramine. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. *Farmacologia*. Elsevier: 7^o Edição.

Remadevi, P.; Ezhilarasu, L.; Chandrasekar, L. J.; Vasudevan, A. Comparison of midazolam and ketamine as oral premedicants in pediatric patients. *The Internet Journal of Anesthesiology.*, v. 21, n. 2, nov. 2009.

Rizzi, S.; Carter, L. B.; Ori, C.; Jevtovic-Todorovic, V. Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. *Brain Pathology.*, v. 18, n. 2, p. 198-210, April. 2008.

Rosland, J. H.; Hunskaar, S.; Hole, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacol. Toxicol.*, v.66, n.5, p.382-386, 1990.

Slikker Jr, W.; Zou, X.; Hotchkiss, C. E.; Divine, R. L.; Sadovova, N.; Twaddle, N. C.; Doerge, D. R.; Scallet, A. C.; Patterson, T. A.; Hanig, J. P.; Paule, M. G.; Wang, C. Ketamine-Induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicological Sciences.*, v. 98, n. 1, p. 145–158, April. 2007.

Stratmann, G.; Sall, J. W.; May, L. D. V.; Bell, J. S.; Magnusson, K. R.; Rau, V.; Visrodia, K. H.; Alvi, R. S.; Ku, B.; Lee, M. T.; Dai, R. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *The American Society of Anesthesiology.*, v. 110, n. 4, p. 834–48, April. 2009a.



Stratmann, G.; Sall, J. W.; May, L. D. V.; Loepke, A. W.; Lee, M. T. Beyond anesthetic properties: the effects of isoflurane on brain cell death, neurogenesis, and long-term neurocognitive function. *Anesthesia & Analgesia.*, nov. 2009b.

Vutskits, L.; Gascon, E.; Kiss, J. Z. Effects of ketamine on the developing central nervous system. *Ideggyogy Sz.*, v. 60, n. 3-4, p. 109-12, march. 2007.

Wang J, Zhou M, Wang X, Yang X, Wang M, Zhang C, Zhou S, Tang N. Impact of ketamine on learning and memory function, neuronal apoptosis and its potential association with miR-214 and PTEN in adolescent rats. jun. 2014

Wang, C.; Sadovova, N.; Hotchkiss, C.; Fu, X.; Scallet, A. C.; Patterson, T. A.; Hanig, J.; Paule, M. G.; Slikker Jr, W. Blockade of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Ketamine Produces Loss of Postnatal Day 3 Monkey Frontal Cortical Neurons in Culture. *Toxicological Sciences.*, v. 91, n. 1, p. 192–201, fev. 2006.

Young, C.; Jevtovic-Todorovic, V.; Qin, Y. Q.; Tenkova, T.; Wang, H.; Labruyere, J.; Olney, J.W. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *British Journal of Pharmacology.*, v. 146, n. 2, p. 189–197, set. 2005.