

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BÁRBARA MACHADO NASPOLINI MACARINI

**EFEITOS DE DIFERENTES AGENTES ANESTÉSICOS SOB
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
NO MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO PELO PEPTÍDEO**

βA_{1-42}

CRICIÚMA

2021

BÁRBARA MACHADO NASPOLINI MACARINI

**EFEITOS DE DIFERENTES AGENTES ANESTÉSICOS SOB
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
NO MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO PELO PEPTÍDEO
 βA_{1-42}**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni

CRICIÚMA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M115e Macarini, Bárbara Machado Napolini.

Efeitos de diferentes agentes anestésicos sob parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo no modelo animal de demência induzido pelo peptídeo βA_{1-42} / Bárbara Machado Napolini Macarini. - 2021.

80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.
Orientação: Josiane Budni.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Anestésicos - Efeito fisiológico. 3. Dano cognitivo. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 615.781

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

A dissertação foi elaborada seguindo o sistema autor-número e apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico essa Dissertação a minha Vó Soni, meu anjo de alegria, que com certeza está vibrando muito de orgulho lá de cima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais pelos ensinamentos, por incentivarem a sempre dar o melhor de mim. Ao meu esposo que há 12 anos está presente em todas as etapas importantes da minha vida, sempre me dando suporte, me acalmando com toda sua paciência e amor. A minha irmã que me apoia e me surpreende todos os dias.

A minha colega Duda, um ser de luz que apareceu em minha vida durante essa estrada do Mestrado, que me ensinou demais e me fez amar ainda mais a ciência, obrigada pela amizade e parceria, você me inspira.

A todos os colegas de pós-graduação e os alunos de iniciação científica, que dedicaram parte do seu tempo para executarmos essa intensa pesquisa, sem vocês, não seria possível encarar esses inúmeros comportamentos, grupos e protocolos.

A minha orientadora, Josiane Budni, por todo conhecimento compartilhado sobre a neurociência, e por ter topado desenvolver essa pesquisa comigo.

E por fim agradeço a Deus, por ter me dado forças para encarar mais este desafio e ter colocado essas pessoas em minha vida.

Só levo alegria e gratidão!

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que conduz à demência. Muitos modelos animais de demência são utilizados para estudar a DA. O modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β -amilóide₁₋₄₂ (β A₁₋₄₂) é muito utilizado, mas os animais precisam ser anestesiados, entretanto não é avaliado qual a melhor protocolo anestésico. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos comportamentais e nos parâmetros do estresse oxidativo da exposição a diferentes agentes anestésicos em um modelo animal da demência induzido pelo β A₁₋₄₂. Foram utilizados camundongos Balb-C com 3 meses de idade, anestesiados com diferentes fármacos de acordo com o protocolo. Protocolo 1: (1) Oxigênio 100% (controle isoflurano); (2) fluido cérebroespinal artificial (ACSF) + isoflurano; (3) β A₁₋₄₂ + isoflurano. Protocolo 2: (1) salina; (2) ACSF + cetamina + xilazina; (3) ACSF + cetamina + dexmedetomidina; (4) β A₁₋₄₂ + cetamina + xilazina; (5) β A₁₋₄₂ + cetamina + dexmedetomidina. Protocolo 3: (1) salina; (2) ACSF + propofol; (3) β A₁₋₄₂ + propofol. Ao receberem os diferentes protocolos, foram submetidos à injeção dos agregados β A₁₋₄₂, e após 13 dias submetidos aos testes comportamentais de labirinto Y-maze, *plus maze*, habituação ao campo aberto e suspensão pela cauda. No 18º dia após injeção, os animais foram submetidos a eutanásia, para coleta do hipocampo, para avaliações dos parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados sugerem que o protocolo 1 resultou em dano de memória de curto prazo em fêmeas e efeito ansiolítico em machos e fêmeas, além de aumento do conteúdo de sulfidril em machos. O protocolo 2 induziu dano de memória de curto prazo em machos, dano de memória de habituação em fêmeas, efeito ansiolítico e antidepressivo, além de aumento dos níveis de 2',7' diclorodi-hidrofluoresceína (DCF) em fêmeas e redução dos níveis de níveis de glutatona (GSH) em machos. E com relação ao protocolo 3, pode-se encontrar efeito ansiolítico do propofol em machos e aumento dos níveis de DCF em machos e fêmeas, aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) em machos e redução nas fêmeas e aumento do conteúdo de sulfidril em machos. Com estes resultados, conclui-se que o propofol interfere menos nos efeitos comportamentais, mas o isoflurano influencia menos nos parâmetros de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; dano cognitivo; anestesia; memória; dano oxidativo.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that leads to dementia. Many animal models of dementia are used to study AD. The animal model of dementia induced by the peptide β -amyloid₁₋₄₂ (β A₁₋₄₂) is widely used, but the animals need to be anesthetized, however the best anesthetic protocol is not evaluated. The aim of this study was to evaluate the behavioral and oxidative stress parameters effects of exposure to different anesthetic agents in an animal model of β A₁₋₄₂ induced dementia. Balb-C mice at 3 months of age, anesthetized with different drugs according to the protocol, were used. Protocol 1: (1) 100% oxygen (isoflurane control); (2) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) + isoflurane; (3) β A₁₋₄₂ + isoflurane. Protocol 2: (1) saline; (2) ACSF + ketamine + xylazine; (3) ACSF + ketamine + dexmedetomidine; (4) β A₁₋₄₂ + ketamine + xylazine; (5) β A₁₋₄₂ + ketamine + dexmedetomidine. Protocol 3: (1) saline; (2) ACSF + propofol; (3) β A₁₋₄₂ + propofol. Upon receiving the different protocols, they were injected with β A₁₋₄₂ aggregates, and after 13 days submitted to behavioral tests of Y-maze, plus maze, open field habituation and tail suspension. On the 18th day after injection, the animals were euthanized to collect the hippocampus to assess oxidative stress parameters. The results suggest that protocol 1 resulted in short-term memory damage in females and anxiolytic effect in males and females, in addition to increased sulfhydryl content in males. Protocol 2 induced short-term memory impairment in males, habituation memory impairment in females, anxiolytic and antidepressant effect, as well as increased 2',7' dichlorodihydrofluorescein (DCF) levels in females and reduced levels of glutathione (GSH) levels in males. And with respect to protocol 3, one can find anxiolytic effect of propofol in males and increased levels of DCF in males and females, increased superoxide dismutase (SOD) activity in males and reduction in females and increased sulfhydryl content in males. With these results, it can be concluded that propofol interferes less in the behavioral effects, but isoflurane influences less in the oxidative stress parameters.

Key words: Alzheimer's Disease; cognitive damage; anesthesia; memory; oxidative damage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estresse oxidativo.....	14
Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental dos animais submetidos a exposição dos diferentes agentes anestésicos.....	29
Figura 3. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental do labirinto em Y.....	34
Figura 4. Camundongos fêmeas submetidas ao teste comportamental do labirinto em Y.....	36
Figura 5. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam anestesia com isoflurano.....	37
Figura 6. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam anestesia com isoflurano.....	38
Figura 7. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto que receberam o protocolo anestésico de xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina.....	39
Figura 8. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam o protocolo anestésico de xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina.....	40
Figura 9. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto que receberam anestesia com propofol.....	41
Figura 10. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam anestesia com propofol.....	42
Figura 11. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de suspensão pela cauda.....	43
Figura 12. Camundongos fêmeas submetidas ao teste comportamental de suspensão pela cauda.....	44
Figura 13. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com isoflurano.....	45
Figura 14. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com isoflurano.....	45
Figura 15. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina.....	46

Figura 16. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina.....	47
Figura 17. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia propofol.....	48
Figura 18. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com propofol.....	49
Figura 19. Níveis de DCF em hipocampo de camundongos machos.....	50
Figura 20. Níveis de DCF em hipocampo de camundongos fêmeas.....	51
Figura 21. Níveis de GSH em hipocampo de camundongos machos.....	52
Figura 22. Níveis de GSH em hipocampo de camundongos fêmeas.....	53
Figura 23. Níveis de SOD em hipocampo de camundongos machos.....	54
Figura 24. Níveis de SOD em hipocampo de camundongos fêmeas.....	55
Figura 25. Níveis de sulfidril em hipocampo de camundongos machos.....	56
Figura 26. Níveis de sulfidril em hipocampo de camundongos fêmeas.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – microgramas

ACSF – fluido cérebroespinal artificial – do inglês: *artificial cerebrospinal fluid*

AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

APP – proteína precursora amiloide

ATP – adenosina trifosfato

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro – do inglês: *brain-derived neurotrophic factor*

CAT – atividade da catalase

CEUA – comissão de ética para uso de animais

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CONCEA – conselho nacional de controle de experimentação animal

DA – doença de Alzheimer

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic ácido)

EROs – espécies reativas de oxigênio

GABAA – ácido gama-aminobutírico A – do inglês: *gamma aminobutyric acid-A*

GBD – *Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias*

GPx – glutationa peroxidase

GR – glutationa redutase

GSH – níveis de glutationa

GSSG – glutationa dissulfeto

H₂DCF – 2',7' diclorodi-hidrofluoresceína

H₂DCFH-DA, – 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IL – interleucina

im – intramuscular

ip – intraperitoneal

kg – quilogramas

MDA - malondialdeído

mg – miligramas

NaNO₂ – nitrito de sódio

NMDA – n-metil-d-aspartato

NO – oxido nitroso

O₂ – oxigênio

O₂^{•-} – ânions superóxido

OH – radical hidroxila

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido desmutase

Tg2576 – transgênico 2576

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa – do inglês: *Tumor Necrosis Factor alpha*

βA₁₋₄₂ – peptídeo beta amilóide fração 1-42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos gerais	24
2.2 Objetivos específicos	24
3.MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	26
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	26
3.3 FÁRMACOS OU SUBSTÂNCIAS UTILIZADOS	26
3.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DEMÊNCIA	27
3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
3.5.1 Protocolo 1: Animais machos e fêmeas com 3 meses de idade anestesiados com isoflurano.	27
3.5.2 Protocolo 2: Animais machos e fêmeas com 3 meses de idade anestesiados com cetamina e xilazina ou cetamina e dexmedetomidina.	28
3.5.3 Protocolo 3: Animais machos e fêmeas com 3 meses de idade anestesiados com propofol.	28
3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	29
3.5 EUTANÁSIA	31
3.6 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	31
3.6.1 DCFH-DA:.....	31
3.6.2 Carbonilação de Proteínas:	31
3.6.3 Conteúdo de Sulfidril:	31
3.6.4 Atividade da SOD:	32
3.6.5 Níveis de GSH:	32
3.6.6 Conteúdo de Proteínas:.....	32
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A	80

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, a forma mais comum de demência, sendo responsável por cerca de 60 % destes casos. Com o crescente aumento da população idosa, com idade igual ou maior de 65 anos, sendo esta a faixa etária mais afetada pela doença, estima-se que os casos de DA dupliquem para 36 milhões de pessoas no mundo, até 2025 (Qiu et al., 2009; Robsinson et al., 2017). De acordo com estudo do *Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias* (GBD) entre 1990 e 2016, o número de casos de demência aumentou em 117%, de 20,2 milhões em 1990 para 43,8 milhões em 2016, sendo o Brasil o segundo país com maior prevalência (GBD et al., 2019).

Devido a degeneração causada no cérebro, na DA, importantes áreas são afetadas, como córtex e hipocampo, as quais são responsáveis pela cognição e memória, levando a demência. Essa degeneração é caracterizada pela deposição de agregados de peptídeo beta amilóide (βA), formando placas, denominadas placas senis, e pela formação progressiva de emaranhados neurofibrilares intracelulares, formados principalmente pela proteína tau hiperfosforilada. Dentre as características patológicas dessa doença, pode-se citar, uma atrofia cortical difusa, degeneração vascular, além de perdas neuronais e sinápticas (Falco et al., 2016; Strooper e Karran, 2016).

O peptídeo βA , principal peptídeo das placas βA , é formado pelo resultado do processamento da proteína precursora amiloide (APP). Duas secretases, a gama-secretase e beta-secretase, clivam a APP em diferentes lugares originando fragmentos de βA de diferentes tamanhos, liberando fragmentos insolúveis, dentre eles, os mais importantes, para o processo fisiopatológico da DA, são o βA_{1-42} e βA_{1-40} . Estes são capazes de se agregar e originar fibrilas, e por fim, a formação de placas senis. Ao formar essas placas senis, há a indução do processo inflamatório, que leva a excitotoxicidade, contribuindo para uma disfunção mitocondrial, presença de radicais livres, resultando em estresse oxidativo, culminando com morte celular (McGeer, 2001; Craft, 2006; de Oliveira et al., 2021).

A formação dos emaranhados neurofibrilares pela proteína tau hiperfosforilada, também é característica patológica da DA. Em situação normal, essa proteína é responsável por organizar os microtúbulos, mantendo-os estáveis,

desta forma, o axônio consegue transportar nutrientes do corpo em direção ao terminal e vice-versa, promovendo a nutrição do neurônio. Na DA essa proteína é hiperfosforilada, desligando-se dos microtúbulos e formando emaranhados ou massas fibrilares, os quais impedem o fluxo de nutrientes no neurônio, resultando em morte celular (Wang, 2008; Attems et al., 2012; Crary et al., 2014).

O papel da neuroinflamação na DA, na última década, passou de uma resposta simples às características neuropatológicas bem estabelecidas, a uma principal contribuinte na progressão da doença. Dentre as hipóteses que justificam a neuroinflamação na DA, a mais provável é que, a formação da patologia amiloide resulte em uma reação inflamatória local seguida de mudanças nos neurônios circundantes. Assim, como todo processo inflamatório, a neuroinflamação, é uma reação que ocorre quando há infecção ou lesão no tecido do sistema nervoso central (SNC), e o seu objetivo é eliminar o agente infeccioso ou reparar o dano causado. Para isso, uma série de reações e consequente liberação de substâncias acontece (Tang et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Dandekar et al., 2016; de Oliveira et al., 2021).

No cérebro, diante de uma lesão no tecido, neste caso a deposição de peptídeo β A, as células da glia, especialmente microglia e astrócitos, são ativados. Como consequência dessa ativação, ocorre a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1β (IL-1 β), IL-10, IL-4 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando a neurotoxicidade (Shaw et al., 2007; de Oliveira et al., 2021). De acordo com Swardfager et al. (2010), as concentrações sanguíneas de vários mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α , IL-6 e IL-1 β estão aumentadas em pacientes com DA.

Diante de uma inflamação crônica, o que é encontrado na DA, devido sua progressão, tem-se uma depuração comprometida de β A e seu acúmulo no cérebro. Ou seja, a microglia perde progressivamente a capacidade de eliminar β A, mas mantém a produção de citocinas pró-inflamatórias exacerbando a neuroinflamação, aumentando a patologia amiloide, e assim, alimenta-se um ciclo vicioso preservado pelas próprias citocinas pró-inflamatórias (Kinney et al., 2018; Cervellati et al., 2020; de Oliveira et al., 2021).

Nos processos fisiológicos que incluem o envelhecimento, há maior susceptibilidade a processos fisiopatológicos como doenças neurodegenerativas, câncer e outras doenças inflamatórias. Nestes casos, os radicais livres têm

importante papel. Estes fazem parte de um processo contínuo e fisiológico que em proporções adequadas atuam na formação de ATP e em mecanismos de defesas. Entretanto, quando há uma produção elevada desses radicais, pode conduzir a danos oxidativos. Esses radicais livres são basicamente o que se forma a partir de uma redução parcial de oxigênio (O_2), onde são produzidos ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), os quais são potencialmente perigosos, por serem muito reativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Jones, 2008; Sies, 2015; Sies, 2020).

Conceitualmente, o estresse oxidativo foi definido em 1985 por Sies que define como um desbalanço entre agentes oxidantes e antioxidantes, em favor dos agentes oxidantes, levando a uma disfunção da sinalização redox e disfunção do controle do dano celular (Sies, 1985; Sies, 2018; Sies 2020). Basicamente, quando há desvio do equilíbrio redox, inicia-se a resposta ao estresse, o que culmina com patogênese, como é o caso de doenças neurodegenerativas e câncer (Figura 1) (Sharifi-Rad et al., 2020).

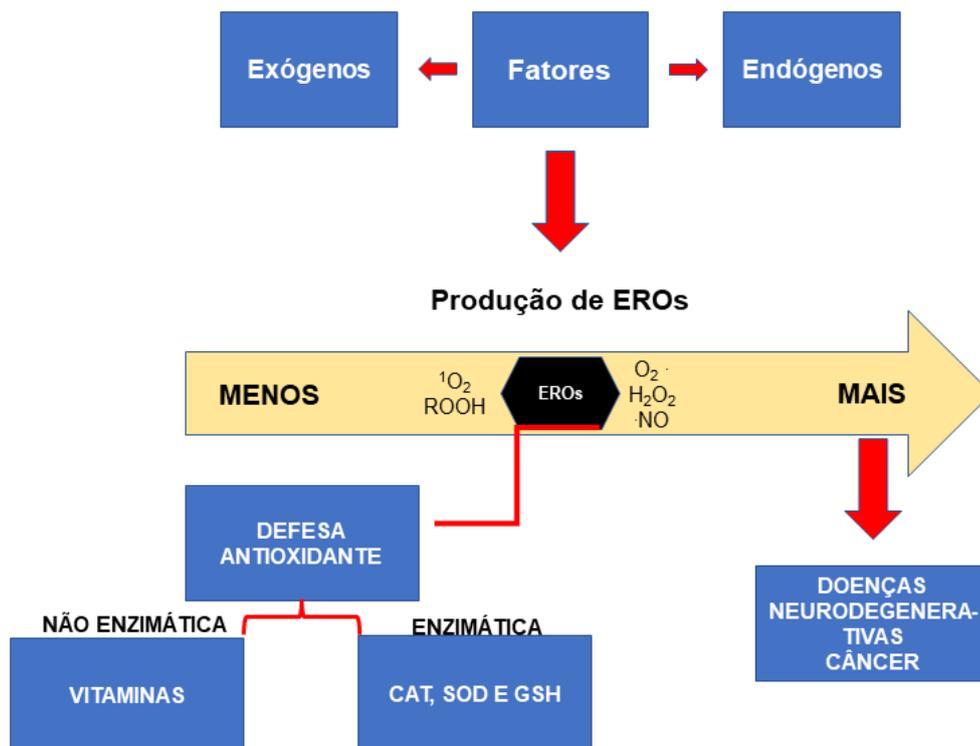


Figura 1. Estresse oxidativo. Este fenômeno é gerado através de fatores exógenos ou endógenos, os quais favorecem a formação de espécies reativas. Quando há baixa exposição a essas espécies, desencadeia-se uma sinalização redox (defesa antioxidante), podendo ser enzimática, através de CAT, SOD ou GSH, por exemplo, ou não enzimática no caso de vitaminas, o qual é fisiológico e culmina com saúde. Na alta exposição a essas espécies, quando a defesa antioxidante é insuficiente, tem-se sinalização redox interrompida e como resultado um processo fisiopatológico/doença (Adaptado de Sharifi-Rad et al., 2020).

Desta forma o estresse oxidativo torna-se outro processo fisiopatológico importante para avaliação na DA, o qual é decorrente de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesas antioxidantes. Ou seja, EROs, sem estabilidade, acabam buscando esta estabilidade, por exemplo, na membrana das células, podendo atingir o DNA, levando a uma mutação. Para que danos não sejam gerados, existe o sistema antioxidante, composto por substâncias endógenas e exógenas, as quais atuam por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres, por exemplo. As substâncias endógenas são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e redutase; já as substâncias exógenas incluem principalmente vitamina C e vitamina E (Shami, 2004; Sies, 2015; Forrester et al., 2018).

O sistema antioxidante enzimático é representado pelas enzimas SOD, CAT e GPx, as quais fazem parte de um sistema que previne a formação de radicais livres e acúmulo de H_2O_2 . A SOD tem por objetivo catalisar a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), convertendo este em O_2 e H_2O_2 . Já a CAT faz parte de um sistema mais simples, o qual atua na dismutação do H_2O_2 em oxigênio e água (Barbosa et al., 2006; Barreiros et al., 2006). A enzima GPx tem sua ação dependente da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio da oxidação da glutathione reduzida (GSH) ao dímero GSSG, sendo este processo complementado pela enzima glutathione redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Assim, através dessa reação, remove o H_2O_2 . Desta forma, a dosagem de SOD, CAT, GSH são importantes marcadores de defesa antioxidante, que aumentam, quando há presença de EROs, na tentativa de eliminá-las, ou até mesmo diminuem quando o sistema antioxidante não é mais capaz de realizar sua função. Diante do exposto, salienta-se a importância de que haja um equilíbrio perfeito entre essas espécies e o sistema antioxidante, visto que não há uma defesa enzimática especializada para tal (Bianchi e Antunes, 1999; Bridi et al., 2005; Sies, 2015).

Quando o sistema antioxidante não consegue superar a produção de radicais livres e/ou ERO, é favorecida a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. Então, para que o estresse oxidativo seja avaliado, pode-se além de avaliar a atividade de enzimas do sistema antioxidante, avaliar também a presença de dano oxidativo através da formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína

diacetato ($H_2DCFH-DA$). O $H_2DCFH-DA$ difunde-se nas células e é desacetilado pelas esterasas celulares para formar 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína (H_2DCF) (Yang et al., 2014). Após reação com EROs, como o exemplo de H_2O_2 , o H_2DCF não fluorescente é transformado em DCF, um produto altamente fluorescente, que pode ser medido e indicativo de estresse oxidativo (Wrona e Wardman, 2006). E existem outros marcadores de dano oxidativo que incluem conteúdo de proteínas oxidadas, conteúdo de sulfidrilas e carbonilação de proteínas (Antunes et al., 2008; Barbosa et al., 2010; Halliwell e Whiteman, 2004).

Existem diversas fontes de radicais livres no cérebro, que são importantes na DA, além do peptídeo βA , íons metálicos redox, inflamação e ativação de micróglia (Zhao et al., 2003; Del Villar et al., 2004). A presença de dano oxidativo em lipídeos e proteínas neuronais tem importante contribuição na patogênese e progressão da DA. Este papel pode ser justificado principalmente pela deposição de peptídeo βA , a qual é capaz de causar alterações na resposta inflamatória, enzimas presentes na membrana e transporte de proteínas. Assim, pode acontecer um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes devido a uma maior produção de EROs ou redução da atividade das enzimas responsáveis pela degradação das EROs, levando a danos oxidativos nas biomoléculas (Butterfield et al., 2001; Cheignon et al., 2018; Nam et al., 2018). Essa oxidação de proteínas vai acontecer em regiões com abundante acúmulo de peptídeo βA , mas principalmente no lobo parietal inferior, córtex e hipocampo (Hensley et al., 1995).

De acordo com Sultana et al. (2006), o qual concentrou-se na identificação de alvos específicos de oxidação de proteína na DA, mostrou que uma série de proteínas, como a fosfato triose isomerase, α -enolase, mutase fosfoglicerato 1 e ubiquitina C-terminal hidrolase-L1, foram identificadas como significativamente oxidadas e com atividade enzimática reduzida, no hipocampo de pacientes diagnosticados com DA. Em outra pesquisa, a qual estudou os níveis de EROs usando DCF, encontraram um aumento significativo nos níveis de fluorescência de DCF em fibroblastos de pacientes com DA, evidenciando assim um aumento significativo de EROs (Pérez et al., 2017).

Existem diversas hipóteses de causas e fatores que podem influenciar no aparecimento da DA. Dentre estes pode-se citar, fatores genéticos, ambientais, como exposição a metais tóxicos, pesticidas e até mesmo a exposição de agentes anestésicos. O uso desses agentes anestésicos e sedativos, tem sido avaliado com

relação a contribuição para o surgimento ou agravamento da DA, devido a prevalência de distúrbios cognitivos no pós-operatório, principalmente em pacientes idosos, juntamente com o crescimento de evidências *in vitro*, celulares e animais (Tang et al., 2012; Evered et al., 2018)

Atualmente, existem diversos estudos desenvolvendo terapias, em busca de controle para amenizar os sintomas da DA, mas ainda segue sem muito sucesso. Para que estas pesquisas relacionadas a DA sejam realizadas, modelos animais são utilizados. Assim como as pesquisas clínicas são muito importantes para buscar estratégias terapêuticas efetivas para a DA, as pesquisas em modelos animais são essenciais para avaliar a toxicidade e possível neuroproteção (Takeda et al., 2009). Os modelos animais são ferramentas importantíssimas para que um fármaco possa chegar nos estudos clínicos, ou quando o fármaco que está no mercado, com outra finalidade terapêutica, pode ser testado para a DA (Hardy e Selko, 2002).

Para que se possa avaliar a utilidade de um modelo animal, utiliza-se a validade de modelos, a qual obedece a três critérios: a validade aparente ou de face, validade de constructo e validade preditiva. A validade de face é o quão bem um modelo animal pode mimetizar os sintomas da doença ou condição clínica; a validade de constructo é a habilidade de se reproduzir aspectos fisiopatológicos da doença em um modelo animal; e a validade preditiva é a capacidade de demonstrar a resposta terapêutica. No caso da DA, são utilizados modelos animais de demência, pois não há um modelo específico para essa doença, já que tem características fisiopatológicas que são compartilhadas por muitas outras demências (Nunes e Hallak, 2014; Campos et al., 2013).

Atualmente, o modelo animal mais utilizado é com roedores, os quais apresentam semelhanças genéticas e fisiológicas, e essas semelhanças já foram comprovadas em diferentes estudos (Morse, 2007; Waterston, 2002; Perlman, 2016). O modelo de demência induzido pela injeção intracerebroventricular do peptídeo βA_{1-42} , mimetiza a doença através da deposição dos agregados deste peptídeo, formando as placas senis, e suas conseqüentes respostas neuroquímicas. De acordo com McLarnon e Ryu (2008), este modelo pode-se equivaler a um lento período de desenvolvimento da DA, mas num espaço de tempo muito menor. A validade de face pode ser identificada neste modelo, devido estudos já realizados, mostrando que os animais após a injeção do peptídeo, exibem comportamentos alterados ao serem avaliados quanto a sua memória. Desta forma, pode-se

comparar aos danos de memória na DA (Sipos et al., 2007). A validade constructo também pode ser encontrada, pois respostas fisiopatológicas de deposição de agregados β A, formação de placas senis, neuroinflamação e estresse oxidativo, são processo encontrados após injeção do peptídeo, e estes também são evidenciados em exames *post-mortem* de paciente acometidos pela DA (Singh-Bains et al., 2019). E por fim, a validade preditiva, a qual em pesquisas investigando a eficácia terapêutica de diferentes fármacos são realizadas neste modelo, como por exemplo, o uso da memantina na DA. Contudo, sabe-se que os fármacos para a DA não revertem os sintomas da DA, mas nos modelos animais revertem (Kishi, 2017; Matsunaga, 2015).

Dentre os modelos animais, pode-se citar o modelo genético, o qual é amplamente utilizado nas pesquisas e é aquele em que o animal está geneticamente alterado com o intuito de desenvolver a doença. Por exemplo, animais com mutações na APP, acabam desenvolvendo a doença, devido a posterior deposição das placas senis no cérebro de acordo com o avanço da idade (Shepherd, 2016). Ainda assim, o modelo animal de demência induzido pela injeção do peptídeo β A torna-se uma forma mais próxima de mimetizar a doença, visto que os modelos genéticos, os quais carecem de validade de constructo e preditiva, representam a doença de início precoce, a qual corresponde a menos que 10% da população com DA (Rocchi et al., 2003; Lucatelli et al., 2009).

Ainda, uma característica importante que deve ser levada em consideração nestes modelos animais é a diferença entre machos e fêmeas. O ciclo estral das fêmeas pode induzir alterações tanto comportamentais quanto neuroquímicas, as quais podem interferir no resultado da pesquisa (Li e Singh, 2014). Os hormônios sexuais podem alterar o estado de aprendizado e memória, influenciando diretamente na resposta aos tratamentos empregados. De acordo com pesquisas já realizadas, há predisposição de doenças para homens, e de outras para mulheres, por exemplo, homens tendem a desenvolver mais o autismo, assim como na DA, o número maior de pacientes diagnosticados são mulheres (Ramtekkar et al., 2010; Shoukouhi et al., 2019). É importante salientar as diferenças farmacológicas com relação ao sexo, ou seja, pois o que difere em estado fisiológico, pode influenciar diretamente na absorção e metabolização de uma substância medicamentosa. Na DA, pesquisas relacionadas a mulheres, mostram que a neurodegeneração mais rápida do que em homens, pode ser justificada pelas alterações hormonais

posteriores a menopausa (Barha et al., 2010; Beiko et al., 2004). Um estudo mostrou que o uso de 17β -estradiol aumentou a neurogênese em ratas adultas, e que isto melhorou significativamente a memória espacial. Com esses resultados pode-se notar como os estrogênios influenciam diferencialmente o cérebro e o comportamento (McClure et al., 2013). Desta forma, torna-se importante que a pesquisa seja realizada em ambos os sexos, visto que atualmente os dois gêneros são amplamente utilizados.

Para que pesquisas envolvendo o modelo animal de injeção do peptídeo β A sejam executadas, é necessário utilizar protocolos anestésicos, permitindo que esse peptídeo seja injetado intracerebroventricular ou intrahipocampal no animal. Para tanto, diferentes anestésicos são utilizados, mas não se sabe as possíveis interferências que possam apresentar à pesquisa. Desta forma, torna-se necessário avaliar diferentes fármacos, para que possamos eleger um protocolo que não influencie ou que influencie menos nos resultados das pesquisas, sendo estes comportamentais ou bioquímicos. Diversos trabalhos estão sendo realizados, principalmente com o enfoque clínico, tentando comparar com a utilização de anestesia na rotina de humanos, entretanto, os resultados não são muito esclarecedores (Gakuba et al., 2018; Silbert et al., 2011; Quiroga et al., 2014). A anestesia pode ser caracterizada por um estado de inconsciência no qual onde a sensibilidade e resposta a estímulos nocivos estão reduzidos. É indicada em procedimentos cirúrgicos ou diagnósticos nos quais é visado minimizar o sofrimento do paciente e ainda facilitar o procedimento por meio de imobilização. Para que se possa considerar uma anestesia em si, respeita-se estes três pilares: inconsciência, analgesia e relaxamento muscular (Tranquilli e Grimm, 2015). Os anestésicos induzem a este estado por meios da depressão reversível do SNC. Uma infinidade de fármacos é utilizada, dos quais podem ser administrados de acordo com a sua apresentação. Dentre as formas de anestesia normalmente empregadas, pode-se citar anestesia inalatória, injetável ou intravenosa (Flecknell e Thomas et al., 2015).

Dentre os fármacos mais empregados em pesquisas no modelo animal da DA, está o isoflurano (Baranov et al., 2009). Este fármaco é um anestésico volátil, classificado como éter halogenado, empregado na anestesia inalatória. Uma de suas características é sua solubilidade fraca no sangue, ou seja, possui baixo coeficiente de partição sangue:gás. Além disso, apresenta rápida metabolização e excreção, principalmente pelos pulmões, resultando em rápida indução e recuperação

anestésica (Pawson e Forsith, 2010; Steffey et al., 2015). Quando se fala em mecanismo de ação de anestésicos inalatórios, ainda não existem muitas pesquisas que expliquem tal ação, entretanto, acredita-se que esses atuam em diferentes locais, sendo ação principal a nível cerebral resultando em amnésia e inconsciência e na medula espinhal resultando em imobilidade, devido a inibição da resposta motora ao estímulo nociceptivo. E esses mecanismos são justificados pela inibição da transformação de energia que forma os potenciais de ação nas fibras nervosas, mais nas sinapses, devido interação com neurotransmissores (Saraiva et al., 2002).

O isoflurano é muito utilizado para que seja possível injeção do peptídeo β -amilóide, principalmente em camundongos, a fim de induzir um modelo animal de demência tipo DA, entretanto, algumas alterações já foram encontradas. De acordo com Perucho et al. (2010), que investigou os efeitos da anestesia repetida com isoflurano, em camundongos, em um modelo da DA, evidenciou que a exposição do fármaco, aumentou a mortalidade, diminuiu a capacidade de resposta após anestesia, assim como comportamento exploratório, aumentou o número de células apoptóticas, além de aumento de agregados β A. Uma segunda pesquisa, que investigou os mesmos efeitos do isoflurano, desta vez, comparado com outros fármacos, mostrou que o uso repetido deste anestésico, reduziu significativamente a deposição de agregados β A, quando comparado com o fenobarbital (Quiroga et al., 2014).

Outro anestésico amplamente utilizado, é o propofol, anestésico intravenoso, empregado desde pequenos procedimentos até cirurgias prolongadas. É extremamente lipossolúvel, assim, tem um início de ação rápido, com inconsciência ocorrendo em menos de 30 segundos. A recuperação anestésica é rápida devido a uma combinação entre redistribuição e biotransformação, sendo que seus metabólitos são excretados pela urina. Age principalmente aumentando a atividade dos receptores inibitórios GABAA, que provoca sedação e relaxamento (Berry, 2015).

Um recente estudo, em camundongos submetidos a um modelo de DA, mostrou que doses repetidas de propofol, não exacerbe a deposição de placas senis ou alterações nas sinapses na DA. No entanto, como o modelo de camundongo utilizado, não desenvolve extensa patologia da proteína tau, é importante observar que o propofol ainda pode impactar a saúde neural e pode mitigar o início ou a progressão da DA (Woodhouse et al., 2018). De acordo com Quiroga e

colaboradores (2014) ao avaliar diferentes fármacos e protocolos em modelos animais da DA, incluindo o propofol, mostrou que doses repetidas, podem até diminuir a deposição de agregados β A no hipocampo de camundongos transgênicos (Tg2576), quando comparado a outros fármacos.

Dentre os fármacos utilizados na veterinária, inclusive em modelos animais, tem-se a cetamina. Este fármaco promove uma anestesia dissociativa, devido sua ação bloqueando receptores NMDA. Devido ao seu efeito de rigidez muscular acentuada, não produz um estado anestésico verdadeiro, e então associa-se a cetamina a outros fármacos, como por exemplo os agonistas α_2 -adrenérgicos, incluindo xilazina e dexmedetomidina, que promovem miorelaxamento (Moreno, 2012).

A cetamina, vem sendo pesquisada com relação ao seu efeito na depressão, contudo, em dose subanestésica. Neste caso, mostra rápida resposta quando utilizada em pacientes com tentativa de suicídio. Entretanto, quando utilizada de forma contínua pode causar inúmeros efeitos colaterais, incluindo tonturas, sonolência, confusão, sentimentos de dissociação, insônia, alucinações, psicose, e aprendizado e memória prejudicados (Smalheiser, 2019). Este mesmo autor, levanta a hipótese de se utilizar a cetamina em pacientes com DA, visto que ela possui o mesmo mecanismo de ação da memantina, fármaco amplamente utilizado para controle dos sintomas da DA (Smalheiser, 2019). Entretanto, pesquisas são necessárias, pois assim como em estudos sobre depressão, pois o que preocupa são seus efeitos colaterais, principalmente os efeitos psicóticos. Por outro lado, um estudo mostrou que a administração prolongada de cetamina causa fosforilação da proteína tau e redução do receptor AMPA dependente da proteína tau no hipocampo de camundongos (Li et al., 2019).

Outro estudo recente investigou a ação de cetamina em camundongos expostos ao estresse crônico, a fim de desenvolver hiperfosforilação da proteína tau, fenômeno também encontrado na DA, o qual mostrou que o efeito antidepressivo da cetamina pode diminuir os níveis desta proteína nas sinapses (Wen et al., 2019).

A xilazina é um dos fármacos utilizados em associação a cetamina, classificado como agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, é amplamente utilizado em medicina veterinária e procedimentos de experimentação animal para produzir

analgesia, sedação e relaxamento muscular sem causar anestesia geral (Seymour e Duke-novakvski, 2010).

A combinação de xilazina e cetamina, é capaz de induzir uma hiperfosforilação rápida e robusta da tau de maneira dependente da dose sob condições normotérmicas e hipotérmicas em camundongos. Estes dados indicam que a xilazina pode interferir no modelo animal de demência (Hector et al., 2019).

A dexmedetomidina, outro fármaco empregado na associação com cetamina, é um medicamento, relativamente novo no Brasil, o qual é comercializado na linha veterinária desde 2016. A dexmedetomidina é utilizada como sedativo, analgésico e miorelaxante na sedação ambulatorial, medicação pré-anestésica, anestesia local e infusão intravenosa contínua. O seu mecanismo de ação envolve a ativação de receptores α_1 pós e α_2 pré-sinápticos na razão de 1/1600, sendo o mais seletivo para os receptores α_2 , além de ativar receptores imidazólicos (Rankin, 2015).

Nas pesquisas existem diferentes focos quanto ao uso da dexmedetomidina. De acordo com Gao et al. (2019) ao investigar o efeito deste fármaco sobre a neuroinflamação, descobriu-se que melhora significativamente os resultados neurológicos e diminui a lesão medular, que é associado à modulação da neuroinflamação e é parcialmente mediado via sinalização do receptor α_2 adrenérgico. Outra pesquisa, buscando resultados relacionados a DA, com o objetivo de investigar a proteção de dexmedetomidina contra o peptídeo β A em neurônios e astrócitos, e os possíveis mecanismos de proteção, sugeriram que o efeito protetor deste contra o peptídeo β A é particularmente relevante para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), visto que o BDNF tem uma importante função na proliferação e desenvolvimento de neurônios e astrócitos. Assim, o presente estudo fornece uma base para o estudo adicional da proteção do fármaco contra o peptídeo β A em modelos animais e pesquisas pré-clínicas (Wang et al., 2018).

Ao pesquisar a influência da dexmedetomidina na potencialização da DA, um estudo foi feito com ratos, mostrando que esta aumenta a fosforilação da tau, *in vivo* e *in vitro*, na ausência de hipotermia induzida pelo anestésico e através da ativação do receptor α_2 adrenérgico, além de promover agregação da proteína tau e afetar memória espacial (Whittington, 2015).

Diante dos dados apresentados, identificou-se uma divergência de resultados,

não evidenciando claramente quais os efeitos dos fármacos anestésicos sobre os modelos animais de demência. Desta forma, faz-se necessário um estudo que compare os fármacos, em busca de um melhor protocolo anestésico, que possibilite a injeção do peptídeo, visando bem-estar do animal, assim como menor ou nenhuma influência sobre a propagação ou início do processo fisiopatológico que mimetiza a demência.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos de diferentes agentes anestésicos sob parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo no modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β_{A1-42} .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar o efeito da administração de isoflurano, propofol, cetamina associada a xilazina e cetamina associada a dexmedetomidina em camundongos machos e fêmeas com 3 meses de idade submetidos ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β_{A1-42} no teste comportamental labirinto em Y para avaliar a memória espacial de curto prazo;

-Avaliar o efeito da administração de isoflurano, propofol, cetamina associada a xilazina e cetamina associada a dexmedetomidina em camundongos machos e fêmeas com 3 meses de idade submetidos ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β_{A1-42} no teste comportamental de habituação ao campo aberto para avaliar a memória de habituação;

-Avaliar o efeito da administração de isoflurano, propofol, cetamina associada a xilazina e cetamina associada a dexmedetomidina em camundongos machos e fêmeas com 3 meses de idade submetidos ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β_{A1-42} no teste comportamental do plus maze para avaliar a ansiedade;

-Avaliar o efeito da administração de isoflurano, propofol, cetamina associada a xilazina e cetamina associada a dexmedetomidina em camundongos machos e fêmeas com 3 meses de idade submetidos ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β_{A1-42} no teste comportamental da suspensão pela cauda para avaliar a depressão;

-Avaliar o efeito da administração de isoflurano, propofol, cetamina associada a xilazina e cetamina associada a dexmedetomidina em camundongos machos e fêmeas com 3 meses de idade submetidos ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo β_{A1-42} nos parâmetros de estresse oxidativo, como a formação

intracelular de DCFH-DA, carbonilação de proteínas, atividade da SOD, sulfidrina e níveis de GSH, no hipocampo.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, sob parecer número 020/2020 (ANEXO A). Todos os procedimentos estão em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009) e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos Balb-C machos e fêmeas adultos (3 meses de idade), procedentes do biotério da UNESC, pesando aproximadamente 30 a 45 g. Os animais foram acondicionados em 10 animais por caixa, com acesso ao alimento e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de 23 ± 1 °C.

3.3 FÁRMACOS OU SUBSTÂNCIAS UTILIZADOS

Neste estudo utilizou-se quatro protocolos anestésicos diferentes para injeção do peptídeo, nos quais foram empregados os seguintes fármacos: isoflurano (Isoflurano - BioChimico) fornecidas por via inalatória nas concentrações de 4% (indução) + 2% (manutenção); cetamina (Dopalen® - Ceva) na dose de 100 mg/kg, associada a xilazina (Anasedan® - Ceva) na dose de 5mg/kg, ambas administradas por via intramuscular utilizando a mesma seringa, em uma única aplicação; cetamina (Dopalen® - Ceva) na dose de 100 mg/kg, associada a dexmedetomidina (Dextomidor® - Zoetis) na dose 25 µg/kg, diluída em solução salina, ambas administradas por via intramuscular utilizado a mesma seringa, em uma única aplicação; propofol (Propovan® - Cristália) na dose 175 mg/kg administrado por via intraperitoneal em uma única aplicação.

O peptídeo βA_{1-42} (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi dissolvido numa solução de tampão fosfato (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A solução foi incubada durante 7 dias em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ para permitir a agregação dos peptídeos βA_{1-42} em oligômeros (Ueda et al., 1994; Resende et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011) . Após a agregação a solução foi armazenada a -20°C até a sua utilização. No dia da administração a solução foi diluída na dose final de 100 pmol/ μL em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (NaCl 24 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 2,0 mM, KH₂PO₄ 1,25 mM, 26 mM de NaHCO₃, glucose 10 mM e sacarose 4 mM).

3.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DEMÊNCIA

Os camundongos Balb-C adultos (3 meses) machos ou fêmeas, pesando entre 30 a 45 g, foram anestesiados com diferentes anestésicos, de acordo com o protocolo abaixo, e submetidos à injeção dos agregados βA_{1-42} no ventrículo lateral esquerdo a uma concentração de 100 pmol/ μL com volume de 4 μL unilateralmente no ventrículo. Micro injeções foram efetuadas utilizando uma seringa Hamilton de 10 μL acoplada a uma agulha de aço inoxidável de calibre 28, feitas especialmente com 3 mm de comprimento. A agulha foi inserida diretamente através da pele e do crânio no ventrículo lateral, orientada pela visualização de um triângulo equilátero entre os olhos e o centro do crânio para localizar o bregma. A introdução da agulha no ventrículo lateral foi realizada à mão livre pela pesquisadora (Laurson e Belknap, 1986; Gomes et al., 2013). Após um dia da realização do procedimento, os animais foram tratados com água durante 17 dias, por gavagem.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais de animais foram divididos em 3 protocolos, de acordo com os anestésicos utilizados.

3.5.1 Protocolo 1: Animais machos e fêmeas com 3 meses de idade anestesiados com isoflurano.

Camundongos Balb-C machos e fêmeas, adultos, pesando entre 30 a 35g com 3 meses foram anestesiados com isoflurano 4% (indução) e 2% (manutenção) por inalação no aparelho de anestesia inalatória Insight®. Após, foram submetidos à

injeção dos agregados βA_{1-42} ou ACSF. O grupo controle recebeu apenas oxigênio 100%. Estes animais foram divididos em três grupos experimentais de acordo com a tabela abaixo:

1	Oxigênio 100%
2	ACSF + isoflurano 4% (indução) + 2% (manutenção)
3	βA_{1-42} + isoflurano 4% (indução) + 2% (manutenção)

3.5.2 Protocolo 2: Animais machos e fêmeas com 3 meses de idade anestesiados com cetamina e xilazina ou cetamina e dexmedetomidina.

Camundongos Balb-C machos e fêmeas, pesando entre 30 a 35g com 3 meses foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) + xilazina (5 mg/kg) ou com cetamina (100 mg/kg) + dexmedetomidina (25 μ g/kg) por via intramuscular (im). Após, foram submetidos à injeção dos agregados βA_{1-42} ou ACSF. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Estes animais foram divididos em cinco grupos experimentais de acordo com a tabela abaixo:

1	salina/im
2	ACSF + cetamina 100 mg/kg/im + xilazina 5mg/kg/im
3	ACSF + cetamina 100 mg/kg/im + dexmedetomidina 25 μ g/kg/im
4	βA_{1-42} + cetamina 100 mg/kg/im + xilazina 5mg/kg/im
5	βA_{1-42} + cetamina 100 mg/kg/im + dexmedetomidina 25 μ g/kg/im

3.5.3 Protocolo 3: Animais machos e fêmeas com 3 meses de idade anestesiados com propofol.

Camundongos Balb-C machos e fêmeas, pesando entre 30 a 35g com 3 meses foram anestesiados com propofol (175 mg/kg) pela via intraperitoneal (ip). Após, foram submetidos à injeção dos agregados βA_{1-42} ou ACSF. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Estes animais foram divididos em três grupos experimentais de acordo com a tabela abaixo:

1	solução salina/ip
2	ACSF + propofol 175 mg/kg/ip
3	βA_{1-42} + propofol 175 mg/kg/ip

3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

Cada protocolo teve um grupo independente de animais, n=10 por grupo, no qual os animais foram submetidos ao teste do labirinto em Y no 13º dia. Um outro grupo com n = 10 animais, passou pelo teste de suspensão pela cauda no 14º. No 15º e 16º pelo teste de habituação ao campo aberto, e no 17º dia passou pelo teste de labirinto em cruz elevado (Figura 2).

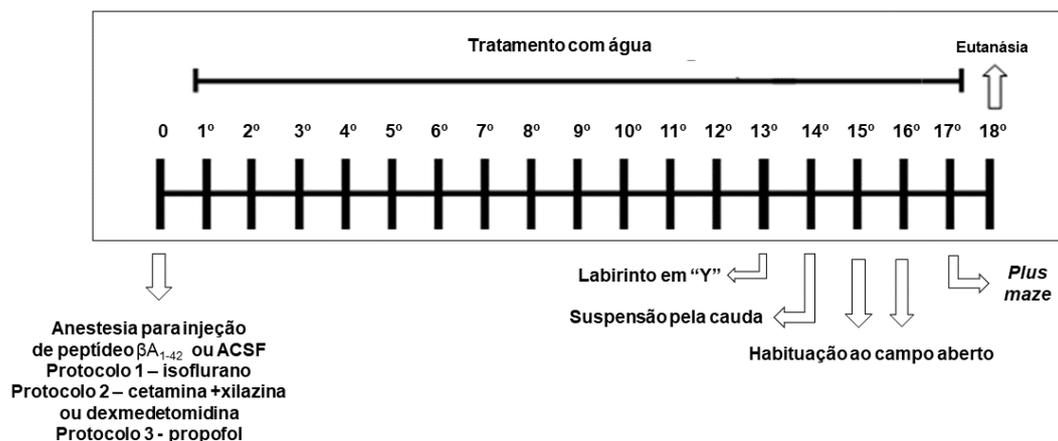


Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental dos animais submetidos a exposição dos diferentes agentes anestésicos, para injeção do peptídeo βA_{1-42} , seguido dos testes comportamentais de labirinto em “y”, suspensão pela cauda, habituação ao campo aberto e labirinto em cruz elevado.

Labirinto em Y (Y-maze): Esse teste avalia a memória operacional (working memory) e o aprendizado. O labirinto em Y consiste em uma caixa acrílica com 2mm de espessura, altura 34,5 cm, com cada braço medindo 75,5 cm de comprimento e 11,7 cm de largura. Neste teste, o animal foi colocado em um braço e alterna espontaneamente as entradas nos outros braços durante 8 minutos. O tempo de permanência em cada braço foi anotado. Os dados foram expressos como o tempo nos braços novo e outro. O sucesso do teste foi indicado pelo tempo entre o braço “novo” e braço “outro” nos grupos controle, indicando que os animais se lembraram

do braço em que eles exploraram na primeira exposição ao aparato. O dano na memória espacial de curto prazo foi considerado quando o animal permaneceu o mesmo tempo ou tempo inferior no braço novo em relação ao braço outro (Sarter e Bruno, 1998).

Habituação ao campo aberto: No 15º de tratamento, os animais foram colocados no aparato de habituação ao campo aberto, para avaliação da memória de habituação. O aparato de 40 x 60 cm é delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 9 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino (16º dia de tratamento) na qual se repete o procedimento do treino. Foram avaliados os números de “cruzamentos” através das linhas pretas e o número de “levantamentos” medidos pelas vezes que o animal permaneceu nas duas patas traseiras, esses parâmetros foram avaliados em ambas as sessões (Vianna et al., 2000).

Labirinto em cruz elevada (*pluz maze*): O nível de ansiedade dos animais foi avaliado na tarefa do labirinto em cruz elevada no 17º dia do experimento. O labirinto consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central (5 x 5 cm), com 50 cm de altura do chão. Os experimentos foram conduzidos em sala escura com luz vermelha posicionada a 30 cm de altura da plataforma central do aparelho.

Os animais foram colocados no centro do labirinto, virado para o braço fechado, por cinco minutos. Os parâmetros avaliados foram: número de entradas e o tempo de permanência no braço aberto ou no fechado, e número de entradas em cada um dos braços e as entradas totais (Pellow et al., 1985)

Teste de suspensão pela cauda: Empregado no 14º dia do experimento, com o objetivo de avaliar o efeito depressivo. Os camundongos acústica e visualmente isolados foram suspensos pela cauda 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 5 minutos, conforme descrito anteriormente (Zomkowski et al., 2002). Em caso de efeito antidepressivo o tempo de imobilidade é reduzido neste teste, já em caso de aumento no tempo de imobilidade, pode-se

considerar um efeito depressogênico, sendo que estes efeitos podem ser justificados pelos fármacos e substâncias utilizadas (Steru et al., 1985).

3.5 EUTANÁSIA

Após os testes comportamentais, os animais, no 18º dia foram submetidos a eutanásia por decapitação. Imediatamente após a eutanásia, o hipocampo foi dissecado para as análises dos parâmetros de estresse oxidativo. As amostras foram armazenadas com refrigeração à -80°C no freezer da UNESC.

3.6 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para análise de parâmetros de estresse oxidativos, foram utilizadas as amostras de hipocampo, as quais foram homogeneizadas em 700 µl de tampão fosfato para cada estrutura.

3.6.1 DCFH-DA:

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO de acordo com o método descrito anteriormente Lebel e Bondy (1992), com algumas modificações.

3.6.2 Carbonilação de Proteínas:

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. cm⁻¹.

3.6.3 Conteúdo de Sulfidrina:

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor 5,51-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), que reduz grupos tióis gerados,

formando um derivado amarelo (TNB), que é mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

3.6.4 Atividade da SOD:

Foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm) segundo Bannister e Calabrese (1987).

3.6.5 Níveis de GSH:

Foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. O conteúdo de GSH foi mensurado em homogenato de hipocampo após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável por mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de GSH reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.6.6 Conteúdo de Proteínas:

O teor de proteína a partir do homogenato do hipocampo homogeneizado foi avaliado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry et al. (1951). O reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. A partir disso, o reagente foi lentamente reduzido, passando de amarelo para azul. A absorbância foi lida a 700 nm.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuem uma distribuição normal.

Os dados do teste de Y-maze, plus maze e habituação ao campo aberto foram avaliados pelo teste T de *Student* pareado.

Para os ensaios dos parâmetros de estresse oxidativo e teste de suspensão pela cauda, os dados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de *Duncan* quando apropriado.

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. A significância estatística foi considerada para valores de p menores que 0,05.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados na figura 3 mostram os dados do teste comportamental do labirinto em Y dos animais machos que foram anestesiados com isoflurano (Figura 3A). Houve diferença significativa nos grupos controle [t (6): -3,00, $p < 0,05$] e ACSF [t (6): -2,50, $p < 0,05$], evidenciando que os animais desse grupo, exploraram mais o braço novo, no segundo momento do teste, indicando memória intacta. Já o grupo βA_{1-42} , não conseguiu diferenciar o braço novo do outro, ou seja, não conseguiu identificar qual braço já havia sido explorado antes, mostrando dano na memória espacial de curto prazo [t (8): -1,05, $p = 0,32$].

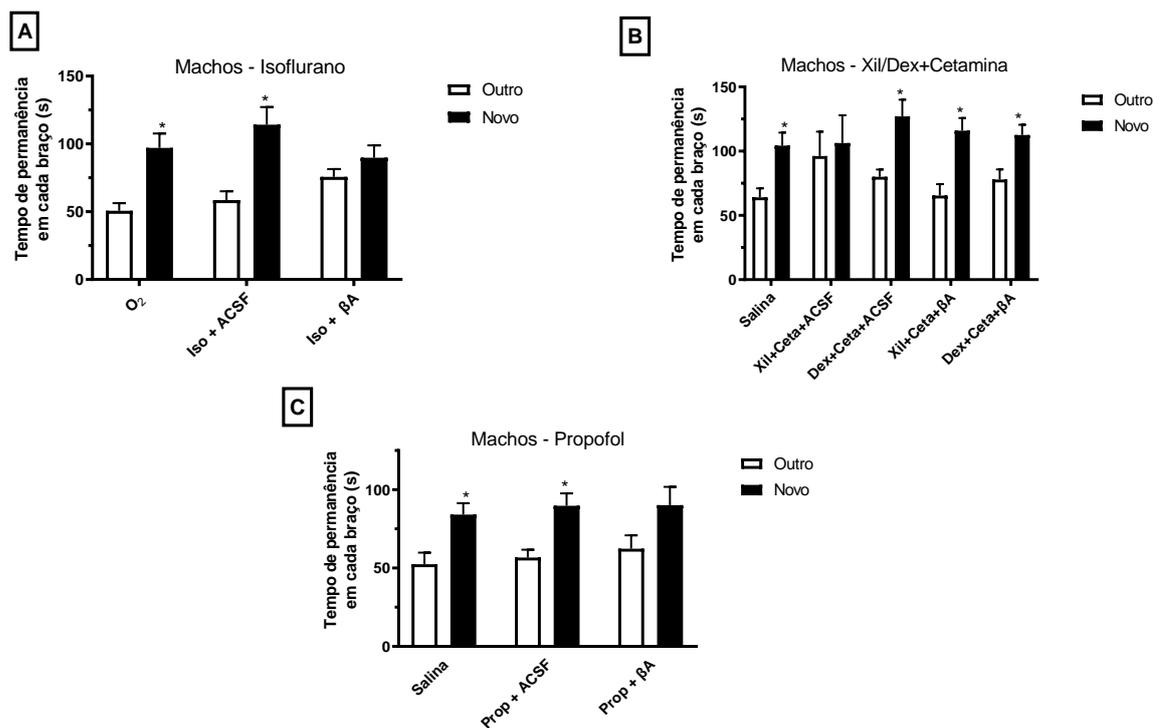


Figura 3. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental do labirinto em Y. A – Animais machos anestesiados com isoflurano. B – Animais machos anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C – Animais machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol); Outro (braço “outro”); Novo (braço novo).

Na figura 3B pode-se observar os dados dos animais machos (protocolo 2), anestesiados com dexmedetomidina ou xilazina associadas a cetamina, submetidos ao teste comportamental do labirinto em Y. Foi possível observar que apenas o

grupo 2 [ACSF (xilazina + cetamina)], não teve diferença significativa [t (8): 0,18, p =0,85], assim mostrando que apenas esse grupo mostrou dano de memória espacial de curto prazo. O restante dos grupos desse protocolo, tiveram resultados significativos, ou seja, tanto o grupo 1 (controle) [t (6): -3,706, p <0,05], grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)] [t (5): -2,62, p <0,05], grupo 4 [β A₁₋₄₂ (xilazina + cetamina)] [t (4): -2,72, p <0,05] e grupo 5 [β A₁₋₄₂ (dexmedetomidina + cetamina)] [t (4): -2,79, p <0,05], reconheceram que o braço novo era realmente um braço que ainda não havia sido explorado.

Os resultados presentes na figura 3C demonstram os dados dos machos (protocolo 3), anestesiados com propofol. Pode-se observar que no labirinto em Y, observou-se diferença significativa apenas nos grupos controle [t (8): -2,63, p <0,05] e ACSF [t (8): -2,81, p <0,05], desta forma, apenas o grupo β A₁₋₄₂ teve dano de memória espacial de curto prazo [t (9): -1,47, p = 0,17].

A figura 4 mostra os dados obtidos do teste comportamental do labirinto em Y realizado em fêmeas, sendo representadas na figura 4A, as fêmeas anestesiadas com isoflurano (protocolo 1). Houve diferença significativa apenas no grupo controle [t (4): -3,76, p <0,05], ou seja, os animais dos grupos ACSF [t (9): 0,24, p =0,81] e β A₁₋₄₂ [t (4): -1,17, p =0,30], tiveram dano na memória espacial de curto prazo, dano evidenciado, uma vez que os camundongos não exploraram durante tempo maior o braço novo.

A figura 4B representa os resultados do comportamento do labirinto em Y das fêmeas (protocolo 2) anestesiadas com dexmedetomidina ou xilazina associadas a cetamina. Esses animais não tiveram dano de memória espacial de curto prazo, ou seja, todos os grupos tiveram diferença significativa, tanto o grupo 1 (controle) [t (6): -2,69, p <0,05], grupo 2 [ACSF (xilazina + cetamina)] [t (6): -3,13, p <0,05], grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)] [t (7): -2,63, p <0,05], grupo 4 [β A₁₋₄₂ (xilazina + cetamina)] [t (11): -5,34, p <0,05], e grupo 5 [β A₁₋₄₂ (dexmedetomidina + cetamina)] [t (8): -4,83, p <0,05].

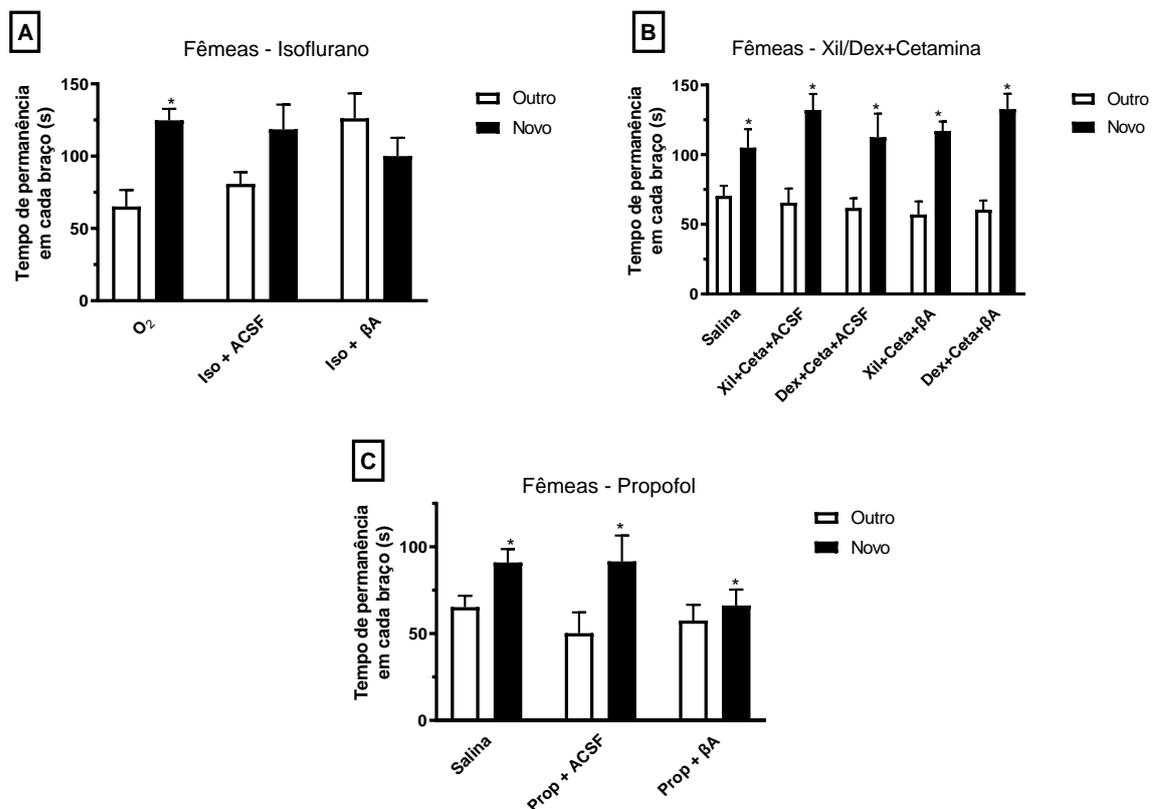


Figura 4. Camundongos fêmeas submetidas ao teste comportamental do labirinto em Y. A - fêmeas anestesiadas com isoflurano. B - fêmeas anestesiadas com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - fêmeas anestesiadas com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol); Outro (braço “outro”); Novo (braço novo).

As fêmeas do grupo propofol (protocolo 3), após aplicado o teste T de Student, pode-se encontrar um resultado semelhante, ou seja, todos os grupos tiveram diferença significativa: grupo 1 (controle) [t (5): -3,80, $p < 0,05$], grupo 2 (ACSF) [t (6): -5,42, $p < 0,05$] e grupo 3 (βA₁₋₄₂) [t (9): -3,23, $p < 0,05$], não evidenciando nenhum dano de memória espacial de curto prazo, como mostra a figura 4C.

A figura 5 mostra os resultados do teste comportamental de habituação ao campo aberto, nos animais machos (protocolo 1), anestesiados com isoflurano. A figura 5A mostra o número de cruzamentos, e a figura 5B o número de levantamentos. Pode-se observar que houve diferença significativa em todos os grupos, no número de cruzamentos: grupo 1 (controle) [t (6): 3,74, $p < 0,05$], grupo 2 (ACSF) [t (6): 2,99, $p < 0,05$] e grupo 3 (βA₁₋₄₂) [t (8): 5,32, $p < 0,05$], e no número de

levantamentos, grupo 1 (controle) [t (6): 6,83, p <0,05], grupo 2 (ACSF) [t (6): 4,63, p <0,05] e grupo 3 (βA_{1-42}) [t (8): 4,00, p <0,05], ou seja, nenhum grupo mostrou dano na memória de habituação neste teste.

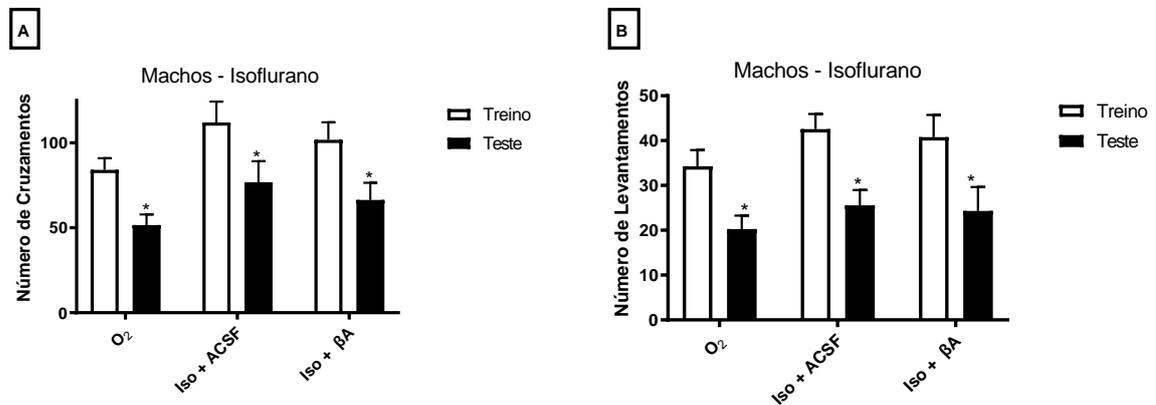


Figura 5. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam anestesia com isoflurano. A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-10. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂).

Na figura 6 apresenta-se os resultados do teste de habituação ao campo aberto nas fêmeas (protocolo 1), anestesiadas com isoflurano. A figura 6A representa a quantidade de cruzamentos e a figura 6B a quantidade de levantamentos, quando foram comparados os resultados do treino e do teste. Pode-se observar que apenas o grupo βA_{1-42} não teve diferença significativa na quantidade de cruzamentos [t (10): 1,80, p =0,10], ou seja, mostrando dano na memória de habituação neste grupo. Diferente do que foi encontrado nos grupos controle [t (6): 2,47, p <0,05] e ACSF [t (9): 2,94, p <0,05], uma diferença significativa entre o número de cruzamentos do dia treino e dia teste. Entretanto, quando se avaliou os levantamentos, nenhum dos grupos obteve diferença significativa, grupo 1 (controle) [t (6): 1,05, p =0,33], grupo 2 (ACSF) [t (9): -0,65, p =0,52] e grupo 3 (βA_{1-42}) [t (10): -1,12, p =0,28].

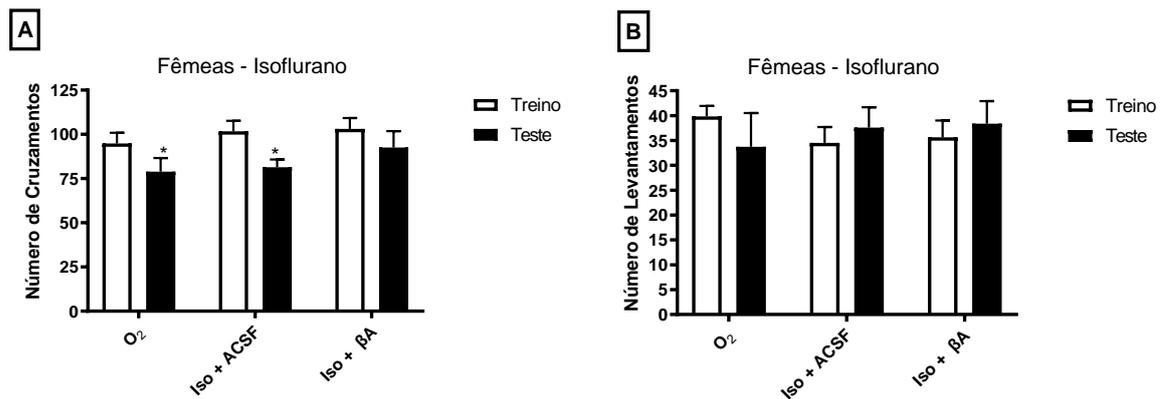


Figura 6. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam anestesia com isoflurano. A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=6-10$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂).

Os resultados apresentados na figura 7 mostram o teste comportamental de habituação ao campo aberto, nos animais machos (protocolo 2), anestesiados com dexmedetomidina ou xilazina associadas a cetamina. A figura 7A representa o número de cruzamentos, e a figura 7B, o número de levantamentos. Apenas os grupos 4 [βA₁₋₄₂ (xilazina + cetamina)] [t (10): 1,20, $p=0,25$] e 5 [βA₁₋₄₂ (dexmedetomidina + cetamina)] [t (9): 0,27, $p=0,79$], não tiveram diferença significativa, assim mostrando que esses grupos apresentaram dano de memória, quando foi avaliado o número de cruzamentos. Com relação aos outros grupos, observou-se uma diferença significativa no número de cruzamentos entre o dia treino e dia teste, grupo 1 (controle) [t (5): 2,65, $p<0,05$], grupo 2 [ACSF (xilazina + cetamina)] [t (6): 2,92, $p<0,05$] e grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)] [t (5): 2,76, $p<0,05$]. No número de levantamentos, nenhum dos grupos mostrou diferença significativa, grupo 1 (controle) [t (5): 0,00, $p=1,00$], grupo 2 [ACSF (xilazina + cetamina)] [t (6): -0,81, $p=0,44$], grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)] [t (5): -0,14, $p=0,88$], grupo 4 [βA₁₋₄₂ (xilazina + cetamina)] [t (10): -0,66, $p=0,51$] e grupo 5 [βA₁₋₄₂ (dexmedetomidina + cetamina)] [t (9): -1,54, $p=0,15$].

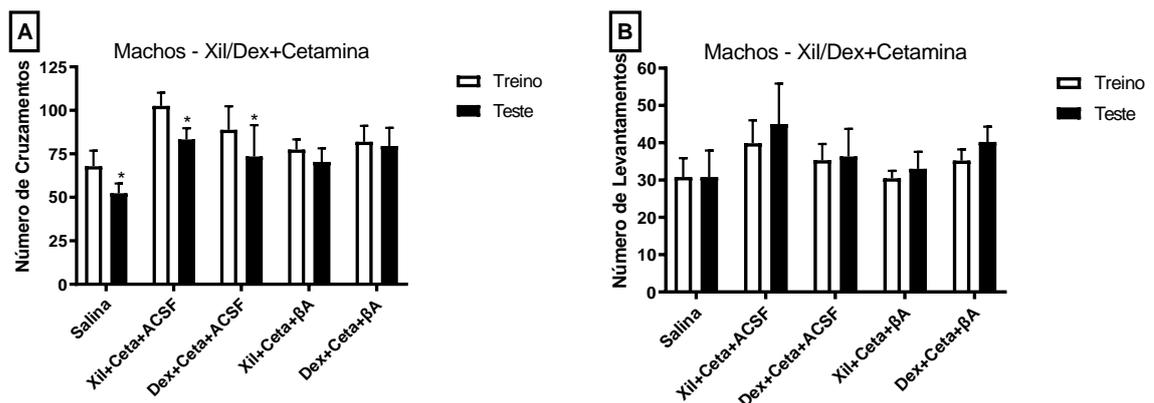


Figura 7. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto que receberam o protocolo anestésico de xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n= 6-10$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide 1-42).

Na figura 8 encontram-se os resultados do teste comportamental de habituação ao campo aberto, nos animais fêmeas (protocolo 2), anestesiados com dexmedetomidina ou xilazina associadas a cetamina. A figura 8A representa o número de cruzamentos, e a figura 8B, o número de levantamentos. Os resultados revelaram que os grupos 2 [ACSF (xilazina + cetamina)] [t (9): -0,23, $p=0,82$], 4 [βA_{1-42} (xilazina + cetamina)] [t (10): 1,31, $p=0,21$] e 5 [AB (dexmedetomidina + cetamina)] [t (9): -0,43, $p=0,67$], não tiveram diferença significativa, representando assim dano na memória de habituação. Este resultado foi diferente nos grupos 1 (controle) [t (6): 4,38, $p<0,05$] e grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)] [t (10): 3,01, $p<0,05$]. O número de levantamentos, nos grupos 1 (controle) [t (6): 1,55, $p=0,16$], 4 [βA_{1-42} (xilazina + cetamina)] [t (10): 1,78, $p=0,10$] e grupo 5 [βA (dexmedetomidina + cetamina)] [t (9): -0,88, $p=0,40$], não tiveram diferença significativa. Entretanto, encontrou-se diferença significativa no número de levantamentos do dia treino quando comparados ao dia teste nos grupos 2[ACSF (xilazina + cetamina)] [t (9): 2,26, $p<0,05$] e 3 (ACSF [dexmedetomidina + cetamina]) [t (10): 4,42, $p<0,05$].

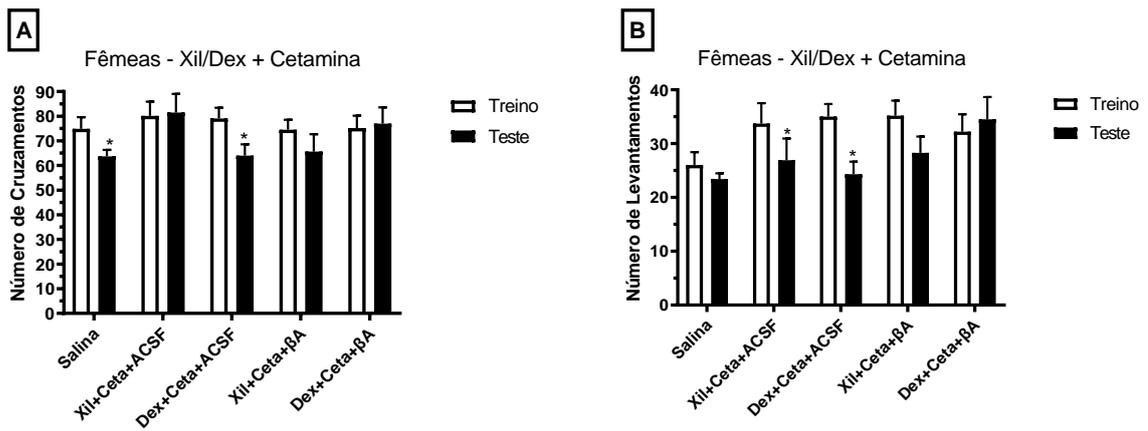


Figura 8. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam o protocolo anestésico de xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂).

Na figura 9 encontram-se os resultados dos animais machos anestesiados com propofol, os quais foram submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto (protocolo 3). A figura 9A representa o número de cruzamentos e a figura 9B o número de levantamentos. Com relação aos cruzamentos, o grupo 1 (controle) [$t(5): 3,56, p < 0,05$], grupo 2 (ACSF) [$t(6): 2,60, p < 0,05$] e grupo 3 (βA_{1-42}) [$t(9): 2,91, p < 0,05$], apresentaram diferenças significativas, não evidenciando prejuízo na memória quando comparados os resultados do dia treino com o dia teste. Este resultado não foi o mesmo encontrado quando se avaliou o número de levantamentos, pois observou-se que o grupo 1 (controle) [$t(5): 1,04, p = 0,34$] e o grupo 2 (ACSF) [$t(6): 1,25, p = 0,25$] não tiveram diferenças significativas. Este resultado foi diferente no grupo 3 (βA_{1-42}) [$t(9): 3,17, p < 0,05$], onde se observou uma diferença significativa.

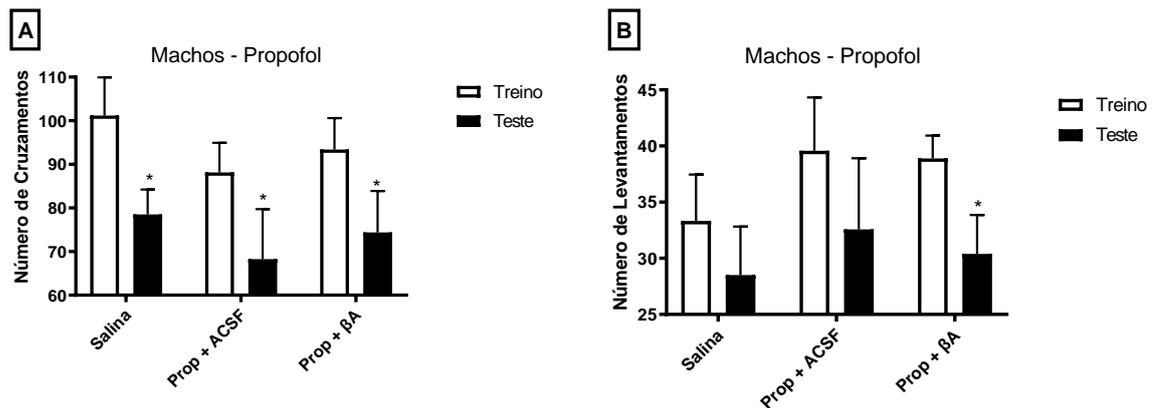


Figura 9. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto que receberam anestesia com propofol. A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviações: Prop (propofol); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂).

Os dados de memória de habituação ao campo aberto em fêmeas anestesiadas com propofol foram demonstrados na figura 10, número de cruzamentos (Figura 10A) e número de levantamentos (Figura 10B). Pode-se observar que os grupos 1 (controle) [$t(6): 2,82, p < 0,05$] e 2 (ACSF) [$t(5): 3,01, p < 0,05$], tiveram diferença significativa, ou seja, apenas o grupo βA_{1-42} teve dano na memória de habituação quando comparado o número de cruzamentos do dia teste com o dia treino [$t(9): 1,22, p = 0,25$]. Este resultado não foi encontrado quando se comparou o número de levantamentos, pois em nenhum grupo foram encontradas diferenças significativas, grupo 1 (controle) [$t(6): 0,88, p = 0,41$], grupo 2 (ACSF) [$t(5): 0,42, p = 0,68$] e grupo 3 (βA_{1-42}) [$t(9): -1,81, p = 0,10$].

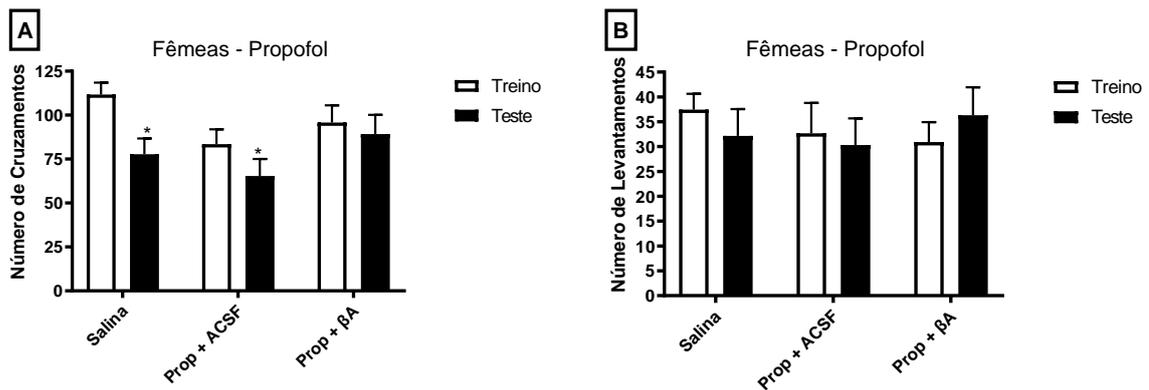


Figura 10. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto, que receberam anestesia com propofol. A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n= 6-10$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Prop (propofol); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂).

Neste estudo foi também avaliado o teste de suspensão pela cauda, com o intuito de investigar efeito antidepressivo ou depressogênico dos machos entre os diferentes protocolos empregados de anestesia (Figura 11). A ANOVA de uma via mostrou que no protocolo 1, machos anestesiados com isoflurano, nenhum dos grupos apresentou efeito antidepressivo ou depressogênico, ou seja, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos [$F(2,20) = 1,72, p = 0,20$] (Figura 11A).

Na figura 11B, estão apresentados os resultados dos grupos que receberam o protocolo anestésico de xilazina ou dexmedetomidina, associados a cetamina, do protocolo 2, em machos. Nenhum grupo teve diferenças significativas no tempo de imobilidade [$F(4,32) = 0,88, p = 0,50$].

Os resultados apresentados na figura 11C, mostram os resultados dos animais machos anestesiados com propofol, submetidos ao teste de suspensão pela cauda. Os resultados também não mostram alteração significativa [$F(2,25) = 0,34, p = 0,71$].

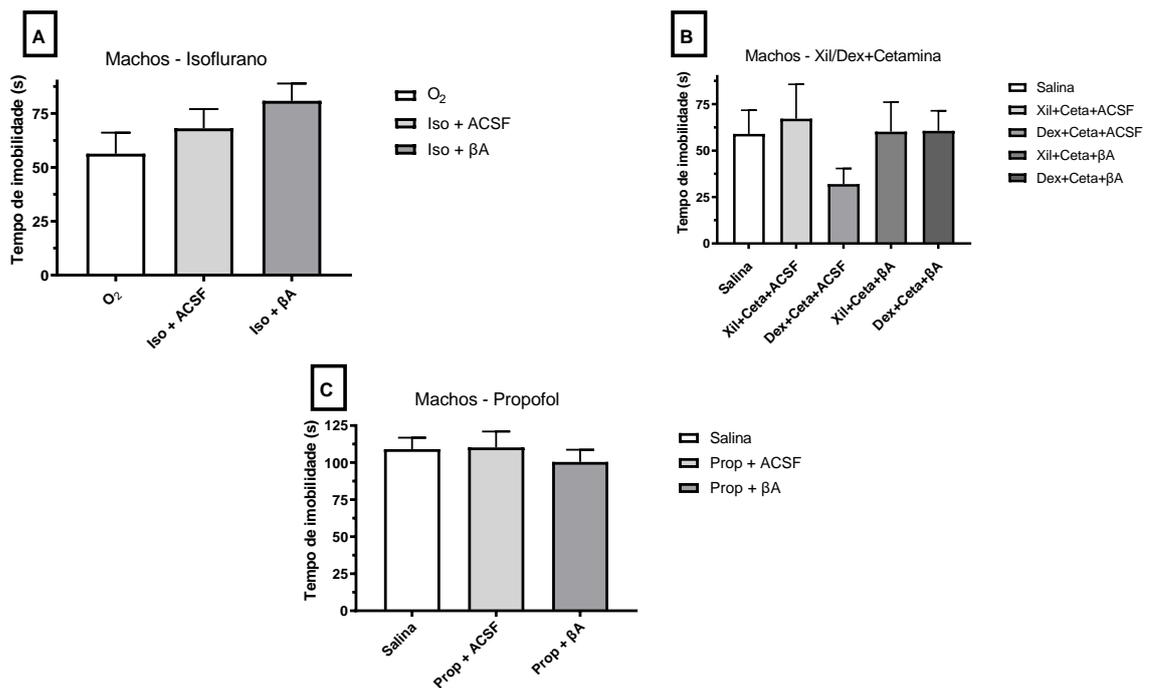


Figura 11. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de suspensão pela cauda. A - Machos anestesiados com isoflurano. B - Machos anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: Iso (Isoflurano); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂).

E quando foram avaliados os resultados nas fêmeas (Figura 12) do teste de suspensão pela cauda, também não foram encontradas diferenças significativas ao receberem isoflurano para anestesia [$F(2,20) = 1,90$, $p = 0,17$] (Figura 13A).

Quando se avaliou esses resultados nas fêmeas do protocolo 2 (Figura 12B), a ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(4,37) = 4,04$, $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan mostrou que todos os grupos tiveram o tempo de imobilidade significativamente menor quando comparados ao grupo controle, indicando efeito antidepressivo da xilazina ou dexmedetomidina, associados a cetamina, com ou sem o peptídeo βA₁₋₄₂.

Os resultados apresentados na figura 12C, mostram os resultados dos animais fêmeas anestesiados com propofol, submetidos ao teste de suspensão pela cauda. Os resultados não mostraram diferenças significativas no tempo de imobilidade [$F(2,14) = 0,15$, $p = 0,86$],

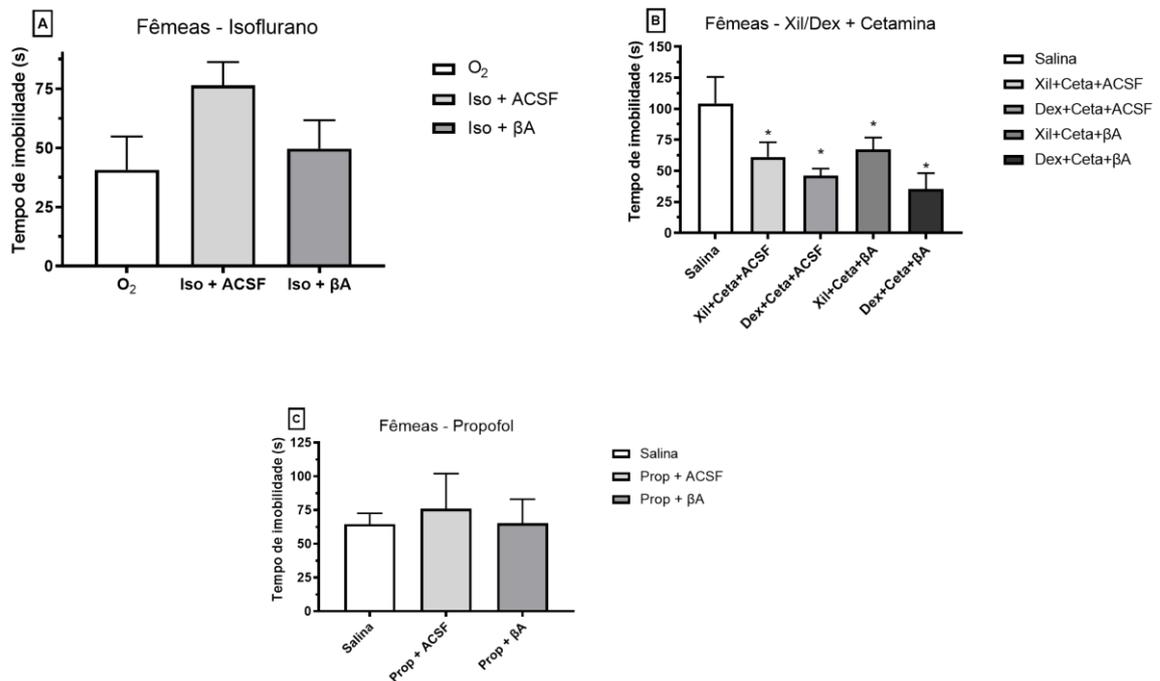


Figura 12. Camundongos fêmeas submetidas ao teste comportamental de suspensão pela cauda. A - Fêmeas anestesiados com isoflurano. B - Fêmeas anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: Iso (Isoflurano); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide 1-42).

Foi também avaliado o efeito ansiolítico ou ansiogênico dos diferentes anestésicos nos animais machos, através da avaliação dos animais no teste do labirinto em cruz elevada. Os resultados expressados na figura 13, mostram esses efeitos no protocolo 1, machos anestesiados com isoflurano, sendo que o número de entradas é mostrado na figura 13A e tempo de permanência em cada braço estão na figura 13B. O teste T de *Student*, não mostrou diferença significativa no grupo 1 (controle), tanto no número de entradas [t (8):0,91, $p = 0,38$] quanto no tempo de permanência em cada braço [t (8):0,77, $p = 0,45$]. No grupo 3 (βA₁₋₄₂), também não foi evidenciada nenhuma diferença significativa no número de entradas [t (5):2,12, $p = 0,08$] e no tempo de permanência [t (5):2,42, $p = 0,06$]. Já grupo 2 (ACSF), foi encontrada diferença significativa em ambas as avaliações, ou seja, teve um maior número de entradas nos braços abertos [t (8):2,82, $p < 0,05$], assim como tempo de permanência no mesmo [t (8):4,52, $p < 0,05$], evidenciando um comportamento ansiolítico do isoflurano.

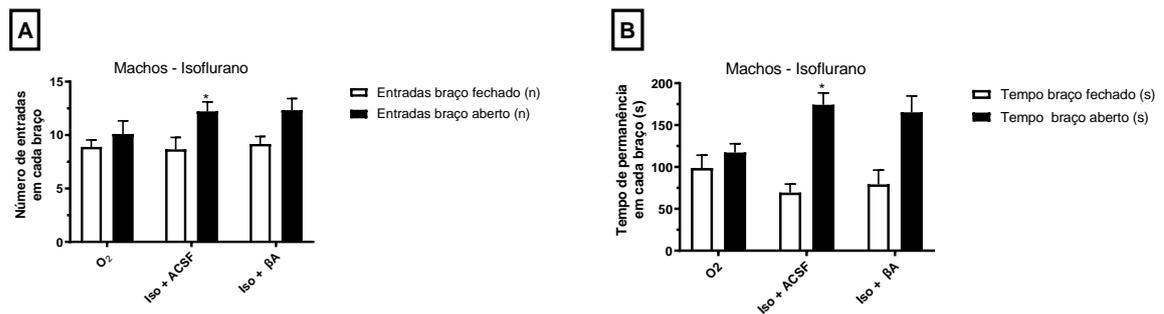


Figura 13. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com isoflurano. A- Número de entradas em cada braço. B- tempo de permanência em cada braço. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-10. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide 1-42).

Com relação as fêmeas do protocolo 1, anestesiadas com isoflurano (Figura 14), todos os grupos apresentaram diferença significativa. O grupo 1 (controle) evidenciou um maior número de entradas [t (7):4,10, $p < 0,05$], assim como no grupo 2 (ACSF) [t (9):4,40, $p < 0,05$] e grupo 3 (βA₁₋₄₂) [t (10):3,22, $p < 0,05$] (Figura 14A). Além disso, foi observado um maior tempo de permanência nos braços abertos, no grupo 1 [t (7):7,15, $p < 0,05$], grupo 2 [t (9):6,52, $p < 0,05$] e grupo 3 [t (10):2,47, $p < 0,05$] (Figura 14B).

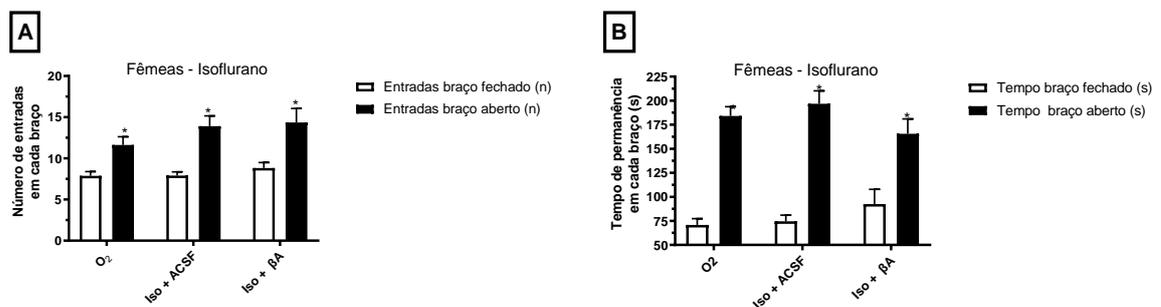


Figura 14. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com isoflurano. A- Número de entradas em cada braço. B- tempo de permanência em cada braço. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-10. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide 1-42).

Na figura 15, encontram-se os resultados do protocolo 2, machos anestesiados com o protocolo de xilazina ou dexmedetomidina, associados a cetamina, sendo que o número de entradas é mostrado na figura 15A e tempo de permanência em cada braço estão na figura 15B. O teste T de *Student*, no grupo 1 (controle), não mostrou diferença significativa no número de entradas [t (6):1,09,

$p=0,32$], mas o tempo de permanência foi maior no braço aberto [$t(6):4,80, p<0,05$]. No grupo 2 [ACSF (xilazina + cetamina)], não houve diferença no número de entradas nos braços [$t(8):0,71, p=0,50$], mas o tempo de permanência no braço aberto foi maior [$t(8):4,52, p<0,05$]. No grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)], não se observou diferença significativa no número de entradas [$t(9):0,85, p=0,41$], mas o animal permaneceu mais tempo nos braços abertos [$t(9):5,73, p<0,05$]. O grupo 4 [βA_{1-42} (xilazina + cetamina)], assim como os anteriores, apresentou diferença significativa apenas na permanência nos braços abertos [$t(10):6,13, p<0,05$], o que não foi evidenciado no número de entrada do mesmo [$t(10):1,46, p=0,17$]. O grupo 5 [βA_{1-42} (dexmedetomidina + cetamina)] apresentou diferença significativa nos dois parâmetros avaliados, tanto no número de entradas [$t(9):3,68, p<0,05$] quanto na permanência nos braços abertos [$t(9):8,95, p<0,05$].

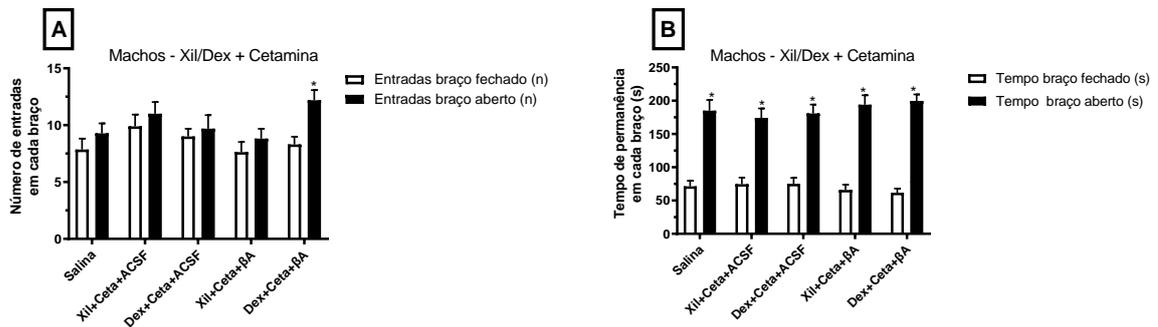


Figura 15. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. A- Número de entradas em cada braço. B- tempo de permanência em cada braço. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-10. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide 1-42).

As fêmeas que receberam a administração de xilazina ou dexmedetomidina, associados a cetamina, tiveram resultados apresentados na figura 16, sendo que o número de entradas é mostrado na figura 16A e tempo de permanência em cada braço estão na figura 16B. Após a aplicação do teste T de *Student*, observou-se que o grupo 1 (controle) não apresentou diferença significativa no número de entradas [$t(9):0,70, p=0,50$], mas o tempo de permanência foi maior no braço aberto [$t(9):3,74, p<0,05$]. No grupo 2 [ACSF [xilazina + cetamina)], não houve diferença no número

de entradas nos braços [t (9):1,80, p=0,10], mas o tempo de permanência no braço aberto foi maior [t (9):4,12, p<0,05]. No grupo 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)], não se observou diferença significativa no número de entradas [t (10):0,80, p=0,44], mas permaneceu mais tempo nos braços abertos [t (10):3,40, p<0,05]. O grupo 4 [βA_{1-42} (xilazina + cetamina)] apresentou diferença significativa nos dois parâmetros avaliados, tanto no número de entradas [t (10):2,90, p<0,05] quanto na permanência nos braços abertos [t (10):10,70, p<0,05]. E o grupo 5 [βA_{1-42} (dexmedetomidina + cetamina)], apresentou apenas diferença significativa na permanência dos braços, ficando mais tempo nos braços abertos [t (9):4,27, p<0,05], mas o número de entradas não sofreu nenhum efeito [t (9):1,02, p=0,33].

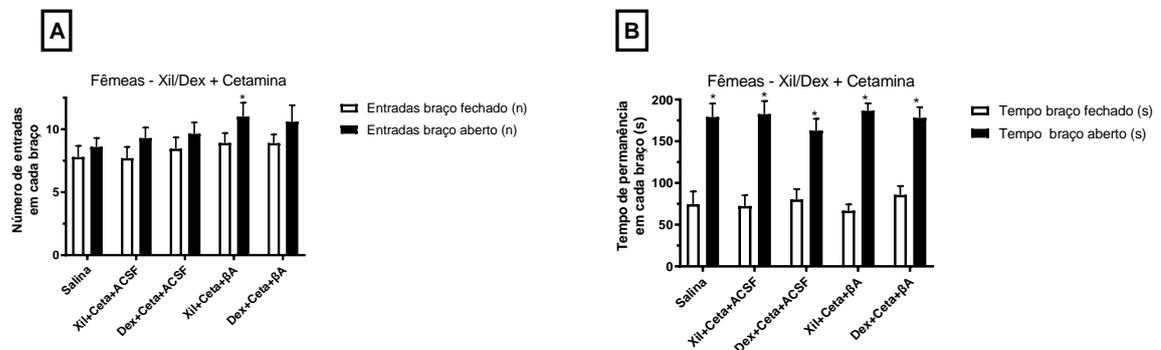


Figura 16. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. A- Número de entradas em cada braço. B- tempo de permanência em cada braço. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-10. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide 1-42).

Os resultados do protocolo 3, machos anestesiados com propofol, submetidos ao teste comportamental do labirinto em cruz elevada, tem seus resultados apresentados na figura 17, sendo que o número de entradas é mostrado na figura 17A e tempo de permanência em cada braço estão na figura 17B. Ao ser aplicado o teste T de *Student* nos resultados, encontrou-se que o grupo 1 (controle) não apresentou diferença significativa no número de entradas [t (9):1,50, p=0,16], nem na permanência dos braços [t (9):1,79, p=0,11], não evidenciando nenhum efeito ansiolítico ou ansiogênico. No grupo 2, o resultado foi significativo em ambas as avaliações, demonstrando um maior número de entradas nos braços abertos [t (8):2,64, p<0,05], e mais tempo nos mesmos [t (8):2,82, p<0,05]. Já o grupo 3 (βA_{1-42}).

42), não foram encontradas diferenças significativas, tanto no número de entradas [t (9):0,50, p=0,62], quanto na permanência nos braços [t (9):0,48, p=0,64].

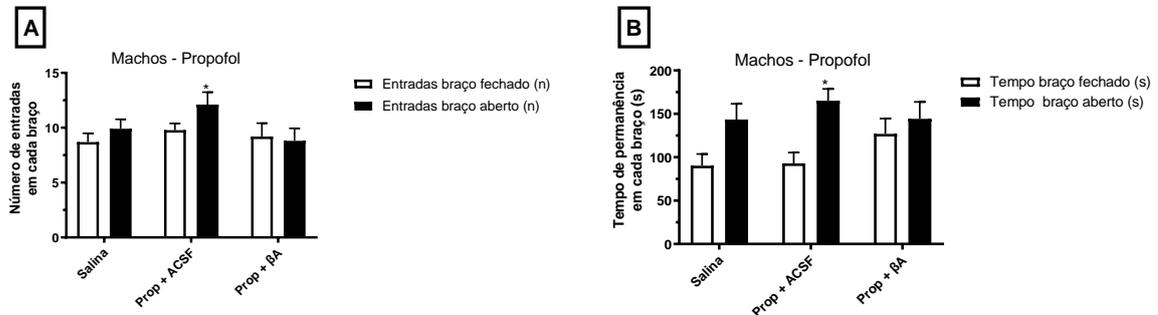


Figura 17. Camundongos machos submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia propofol. A- Número de entradas em cada braço. B- tempo de permanência em cada braço. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-10. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Prop (propofol); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); β A (β -amiloide₁₋₄₂).

Os resultados da figura 18, apresentam os dados do teste comportamental do labirinto em cruz elevada do protocolo 3, fêmeas anestesiadas com propofol, sendo que o número de entradas é mostrado na figura 18A e tempo de permanência em cada braço estão na figura 18B. Ao ser aplicado o teste T de *Student* nos dados, encontrou-se que o grupo 1 (controle) não apresentou diferença significativa no número de entradas [t (9):0,35, p=0,73], assim como na permanência dos braços [t (9):0,93, p=0,37]. No grupo 2, o resultado foi semelhante, não demonstrando diferença significativa no número de entradas nos braços [t (9):0,00, p=1,00], nem no tempo nos mesmos [t (9):1,38, p=0,19]. E o grupo 3 (β A₁₋₄₂), não foram encontradas diferenças significativas, tanto no número de entradas [t (9):1,60, p=0,14], quanto na permanência nos braços [t (9):1,33, p=0,21]. Desta forma, o propofol não mostrou nenhum efeito ansiolítico ou ansiogênico.

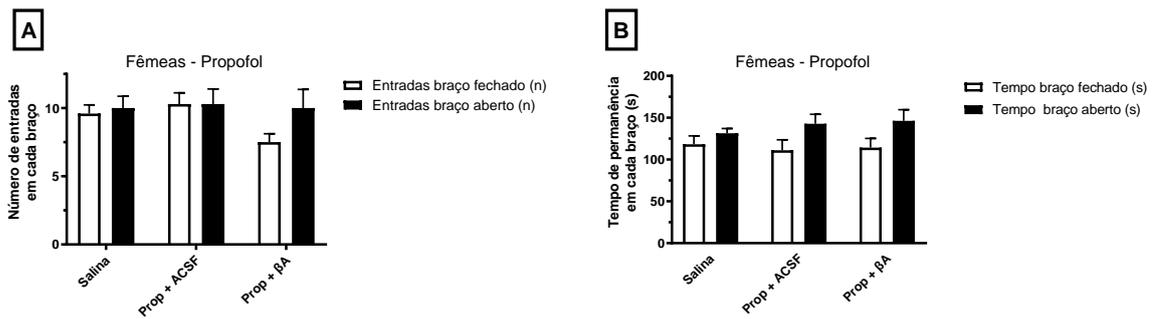


Figura 18. Camundongos fêmeas submetidos ao teste comportamental de labirinto em cruz elevado que receberam anestesia com propofol. A- Número de entradas em cada braço. B- tempo de permanência em cada braço. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=6-10$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). Abreviaturas: Prop (propofol); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂).

Com o intuito de investigar os parâmetros de estresse oxidativo, foram avaliados os níveis de DCF e conteúdo de grupamentos sulfidríla, para avaliação de dano oxidativo; avaliação enzimática do sistema antioxidante pelos níveis de GSH e atividade da SOD, nas amostras do hipocampo desses animais. Os níveis de DCF quando aumentados indicam que estão elevadas as EROS que culminam em dano oxidativo (Figura 19), e ao serem avaliados em machos anestesiados com isoflurano, ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [$F(2,10) = 5,34$, $p < 0,05$], e o teste de *post hoc* de *Duncan*, mostrou um aumento significativo do DCF no grupo βA_{1-42} quando comparado ao grupo controle e ACSF (Figura 19A).

A figura 19B mostra os resultados dos machos que receberam a administração de xilazina ou dexmedetomidina associada a cetamina. Após a aplicação da ANOVA de uma via, nos resultados, não foram encontradas diferenças significativas nos machos [$F(4,16) = 0,97$, $p = 0,45$]. E ainda avaliando esse parâmetro no protocolo 3 a ANOVA de uma via revelou diferença significativa em machos que receberam propofol [$F(2,8) = 10,00$, $p < 0,05$] (Figura 19C). O teste *post hoc* de *Duncan*, mostrou o aumento significativo desse parâmetro nos grupos βA_{1-42} e ACSF quando comparados ao grupo controle.

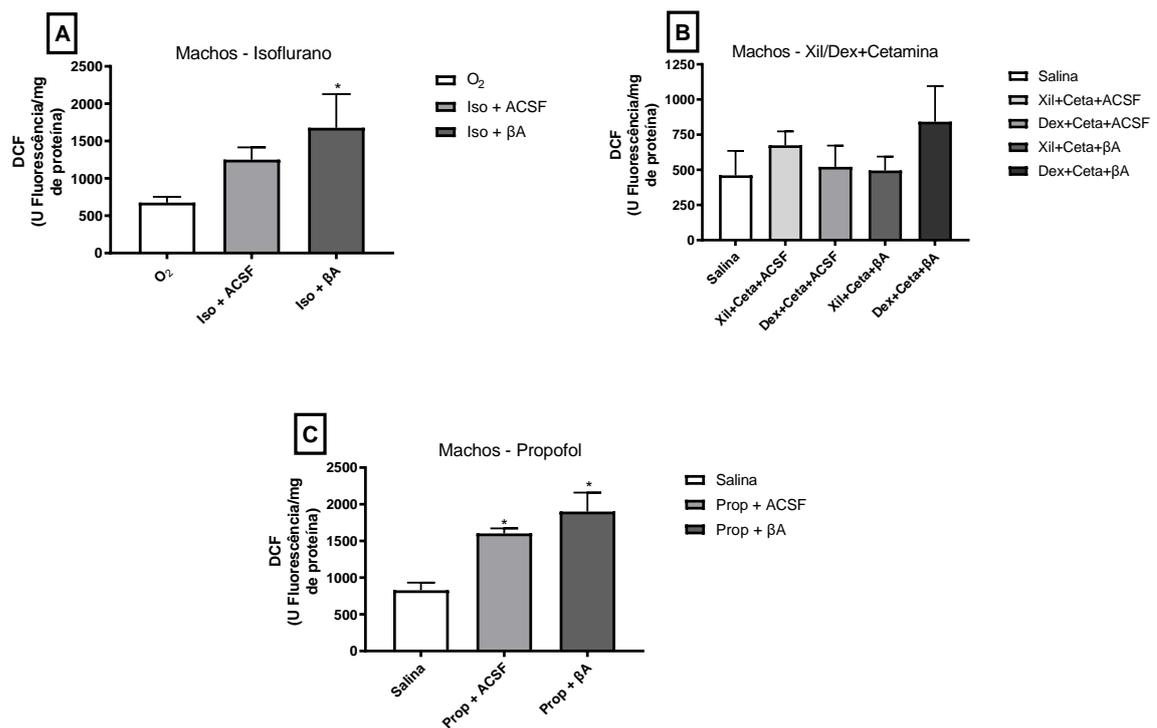


Figura 19. Níveis de DCF em hipocampo de camundongos machos. A - Machos anestesiados com isoflurano. B - Machos anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

Quando esses mesmos dados foram investigados nas fêmeas que receberam anestesia com isoflurano (Figura 20), foi obtido um resultado diferente, onde não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos [$F(2,11) = 3,71$, $p=0,06$] (Figura 20A).

Os resultados do protocolo 2, fêmeas (Figura 20B) que receberam a administração de xilazina ou dexmedetomidina associada a cetamina, após a aplicação da ANOVA de uma via, mostraram diferenças significativas [$F(4,12) = 10,09$, $p<0,05$]. O teste *post hoc* de *Duncan* mostrou que todos os grupos, quando comparado ao grupo controle, mostraram aumento nos níveis de DCF. E ainda avaliando esse parâmetro no protocolo 3, a ANOVA de uma via revelou diferença significativa nas fêmeas que receberam propofol [$F(2,9) = 5,47$, $p<0,05$] (Figura 18C). O teste *post hoc* de *Duncan*, mostrou o aumento significativo desse parâmetro nos grupos βA₁₋₄₂ e ACSF quando comparados ao grupo controle.

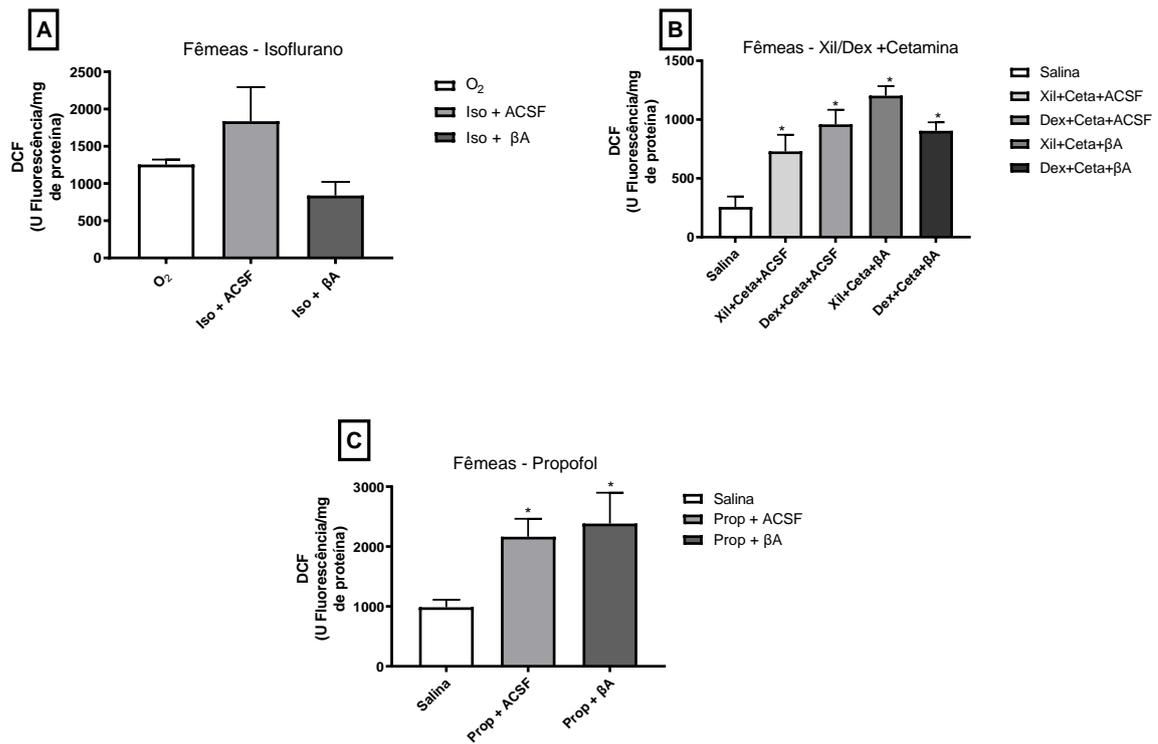


Figura 20. Níveis de DCF em hipocampo de camundongos fêmeas. A - Fêmeas anestesiados com isoflurano. B - Fêmeas anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Fêmeas anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

Os níveis de GSH foram avaliados, e os resultados foram analisados também através de ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* de *Duncan*, quando necessário. Os dados dos machos de cada protocolo estão expressos na figura 21. No protocolo 1, os machos anestesiados com isoflurano não tiveram diferenças significativas entre os grupos [$F(2,9) = 4,23$, $p=0,05$] (Figura 21A). Quando foram avaliados os níveis desse parâmetro no protocolo 2, pode-se encontrar uma diferença significativa [$F(4,16) = 7,42$, $p<0,05$], onde valores foram significativamente menores nos grupos 3 [ACSF (dexmedetomidina + cetamina)], 4 [βA₁₋₄₂ (xilazina + cetamina)] e 5 [βA₁₋₄₂ (dexmedetomidina + cetamina)] (Figura 21B). E ao avaliar esse parâmetro no protocolo 3, os machos que receberam propofol, não apresentaram diferenças significativas nos resultados [$F(2,9) = 0,12$, $p=0,88$] (Figura 21C).

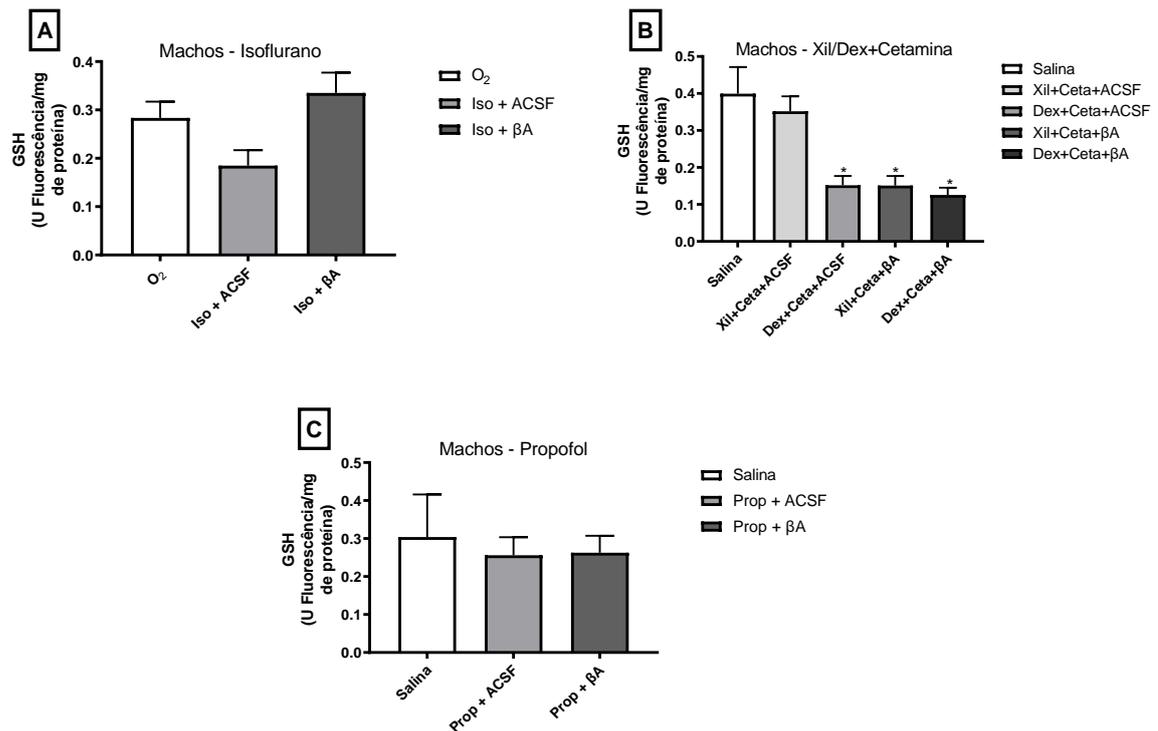


Figura 21. Níveis de GSH em hipocampo de camundongos machos. A - Machos anestesiados com isoflurano. B - Machos anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

A figura 22, mostra os resultados dos níveis de GSH no hipocampo de fêmeas. Estes animais anestesiados com isoflurano (protocolo 1) não tiveram diferenças significativas entre os grupos [F (2,9) =0,06, $p=0,93$] (Figura 22A). Quando foram avaliados os níveis desse parâmetro no protocolo 2, pode-se observar nenhuma diferença significativa nestes resultados [F (4,12) =2,65, $p=0,08$] (Figura 22B). E ao avaliar esse parâmetro no protocolo 3 que receberam propofol, não se encontrou diferença significativa nas fêmeas [F (2,7) =0,66, $p=54$] dentre os grupos estudados (Figura 22C).

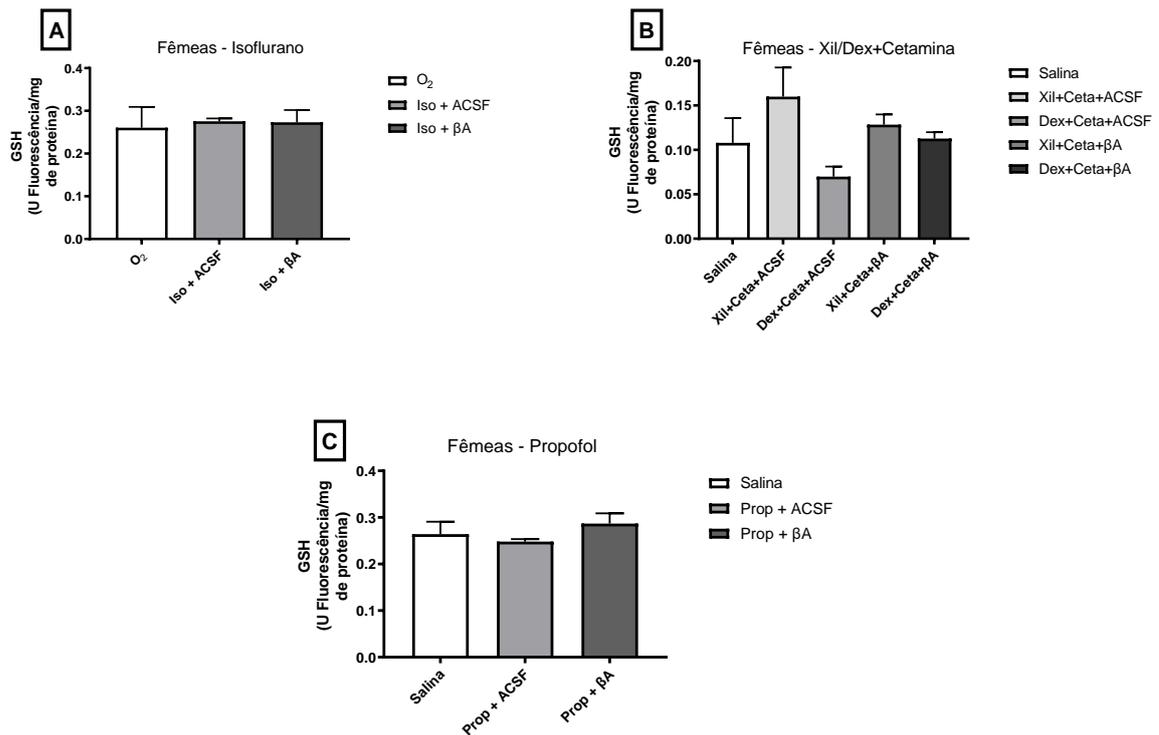


Figura 22. Níveis de GSH em hipocampo de camundongos fêmeas. A - Fêmeas anestesiados com isoflurano. B - Fêmeas anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Fêmeas anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

Quando foi investigado a atividade da SOD como marcador do estresse oxidativo, investigou-se em todos os protocolos o aumento desse parâmetro quando as amostras apresentavam alteração no sistema antioxidante. Na figura 23 estão apresentadas atividade da SOD em machos. No protocolo 1, machos que receberam isoflurano para anestesia, foi encontrado um aumento significativo na atividade da SOD no grupo βA₁₋₄₂ com relação aos demais resultados [F (2,9) =12,51, $p<0,05$] (Figura 23A).

Ao ser avaliado esse parâmetro no protocolo 2, não foram encontradas diferenças significativas nos machos [F (4,20) =1,17, $p=0,35$] (Figura 23B) que receberam xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. E quando atividade da SOD foi analisada no protocolo 3, encontrou-se um aumento significativo nos machos dos grupos βA₁₋₄₂ e ACSF quando comparados ao grupo controle [F (2,11) =6,31, $p<0,05$] (Figura 23C).

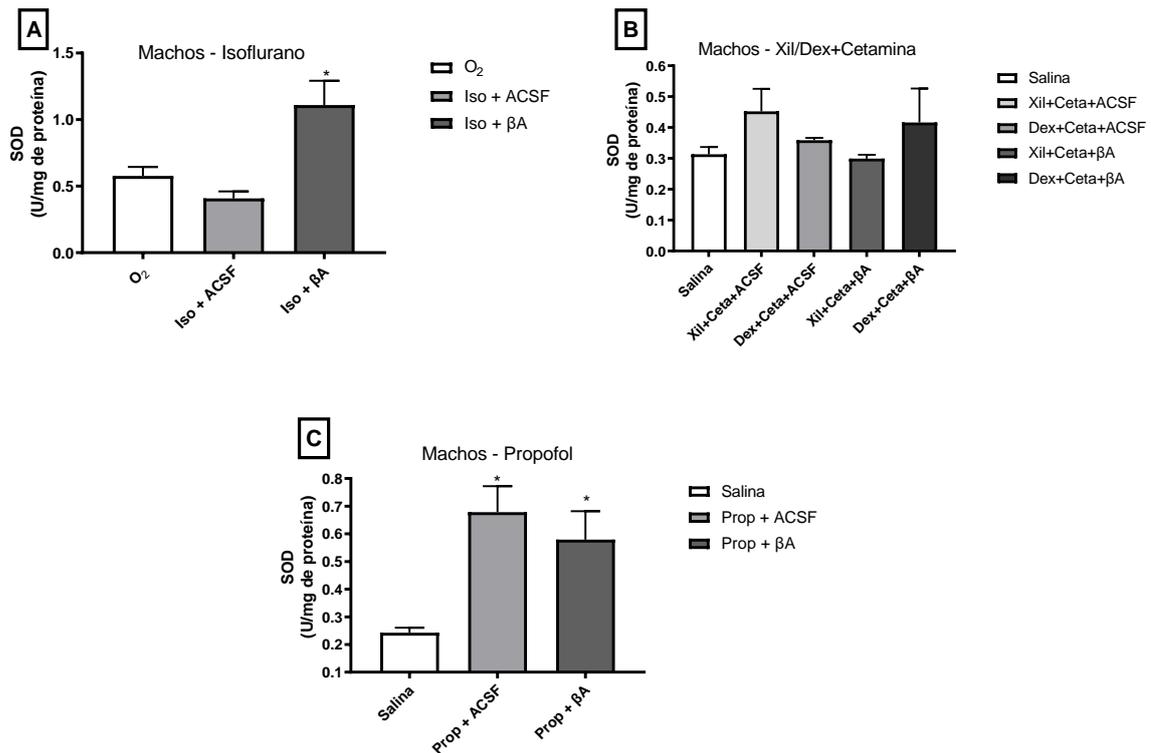


Figura 23. Atividade da SOD em hipocampo de camundongos machos. A - Machos anestesiados com isoflurano. B - Machos anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

Os resultados da figura 24 mostram a atividade da SOD em fêmeas. No protocolo 1, fêmeas que receberam isoflurano para anestesia, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis desse parâmetro [$F(2,10) = 2,27$, $p=0,15$] (Figura 24A).

Ao ser avaliado esse parâmetro no protocolo 2, não foram encontradas diferenças significativas em fêmeas [$F(4,16) = 0,18$, $p=0,94$] (Figura 24B) que receberam o protocolo de xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. E quando atividade da SOD foi analisada no protocolo 3, houve uma diminuição significativa desse parâmetro no grupo ACSF com relação aos demais grupos [$F(2,11) = 6,30$, $p<0,05$] (Figura 24C).

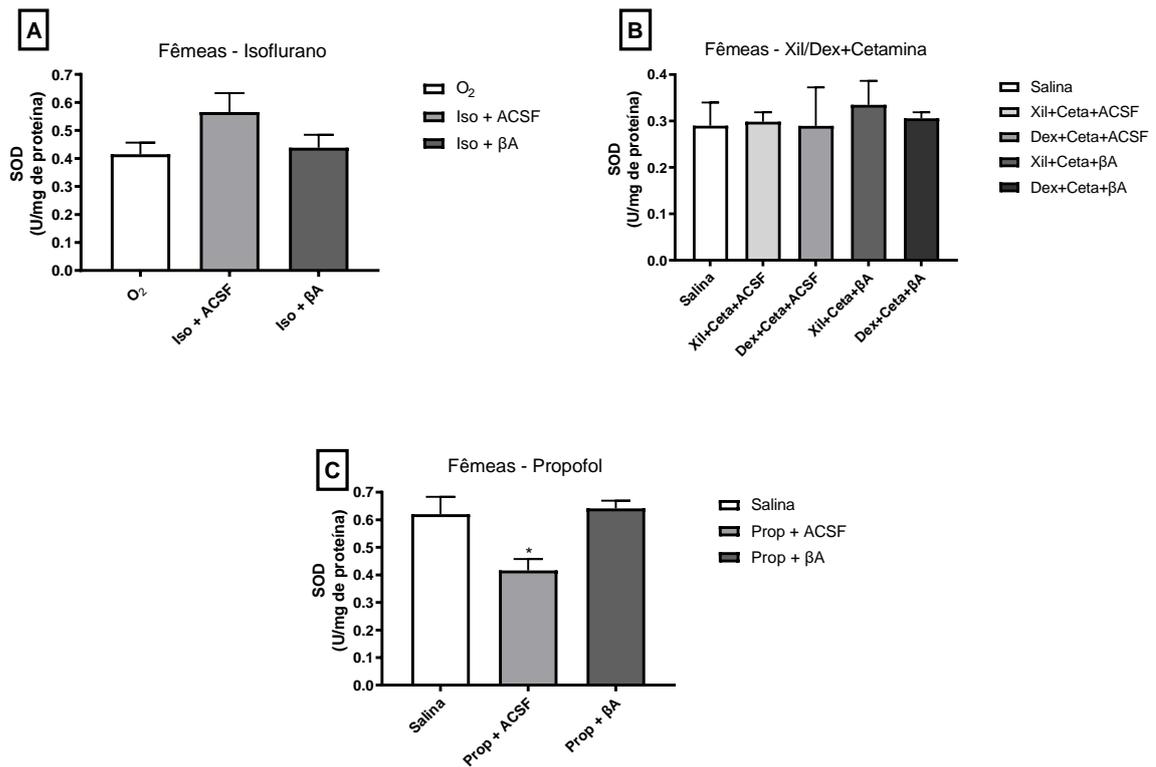


Figura 24. Atividade da SOD em hipocampo de camundongos fêmeas. A - Fêmeas anestesiados com isoflurano. B - Fêmeas anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Fêmeas anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

E por último, o parâmetro de estresse oxidativo avaliado foi o conteúdo de sulfidril, o qual tem seus valores alterados diante de um dano oxidativo. Foi aplicada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de *Duncan*, quando necessário, nos resultados desse parâmetro em todos os protocolos da pesquisa, sendo que os valores de machos são expressos na figura 25 e fêmeas na figura 26.

No protocolo 1, em machos anestesiadas com isoflurano, foi observado uma diferença significativa entre os grupos [$F(2,7) = 9,70$, $p < 0,05$], sendo que após o teste *post hoc* de *Duncan* os grupos ACSF e βA₁₋₄₂, tiveram um aumento quando comparados ao grupo controle (Figura 25A). Desta forma, no protocolo dos machos o conteúdo sulfidril demonstrou dano oxidativo nestes dois grupos quando comparados ao grupo controle.

Quando se avaliou os níveis do conteúdo de sulfidril no protocolo 2, machos que receberam xilazina ou dexmedetomidina, associadas a cetamina, não foram encontradas diferenças significativas nos grupos [$F(4,14) = 1,19$, $p = 0,35$] (Figura

25B). E no protocolo 3, machos que receberam propofol para anestesia, encontrou-se um aumento significativo [$F(2,7) = 25,12$, $p < 0,05$] nos grupos βA_{1-42} e ACSF quando comparados ao grupo controle, podendo evidenciar dano oxidativo nesses dois grupos com relação ao controle (Figura 25C).

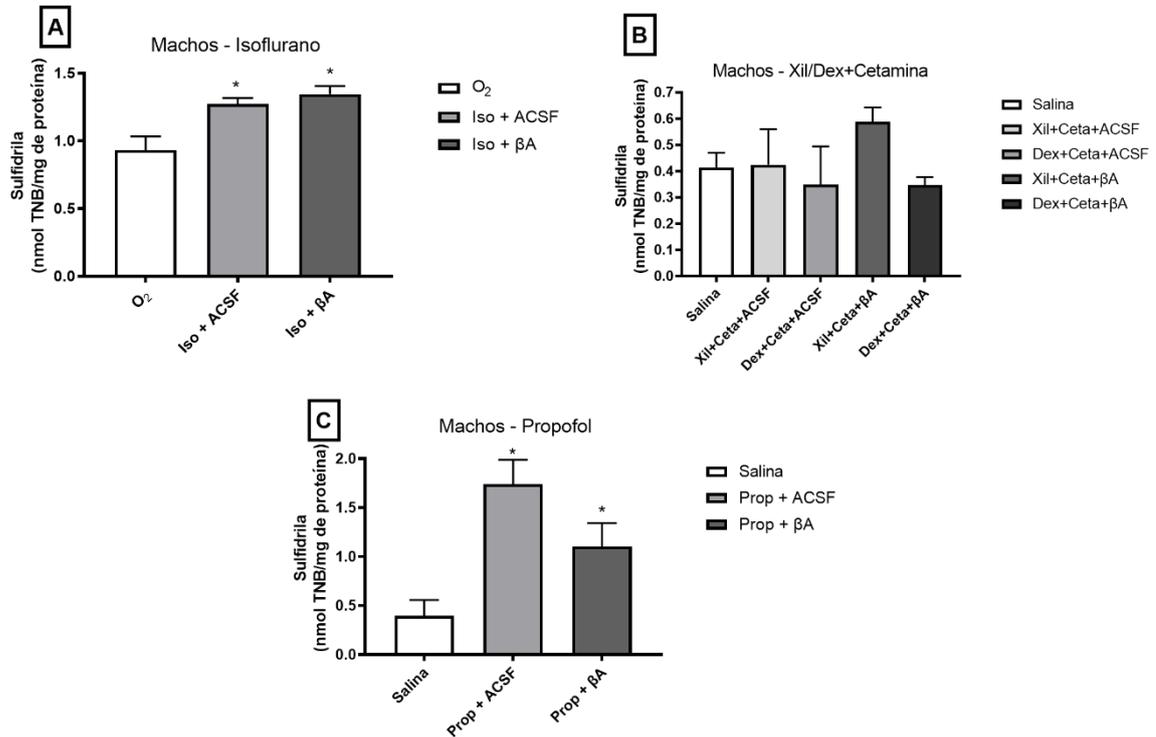


Figura 25. Níveis de sulfidril em hipocampo de camundongos machos. A - Machos anestesiados com isoflurano. B - Machos anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Machos anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 5$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β -amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

No protocolo 1, fêmeas anestesiadas com isoflurano, foi observado uma diferença significativa entre os grupos [$F(2,7) = 9,95$, $p < 0,05$], a qual foi identificada no grupo βA_{1-42} com relação ao controle e quando comparado ao grupo ACSF, ao evidenciar uma redução significativa desse parâmetro (Figura 26A).

Quando se avaliou os níveis do conteúdo de sulfidril no protocolo 2, fêmeas que receberam xilazina ou dexmedetomidina, associadas a cetamina, não foram encontradas diferenças significativas nos grupos [$F(4,13) = 2,87$, $p = 0,065$] (Figura 26B). E no protocolo 3, fêmeas que receberam propofol para anestesia, não se encontrou diferença significativa entre os grupos [$F(2,11) = 0,56$, $p = 0,58$] (Figura 26C).

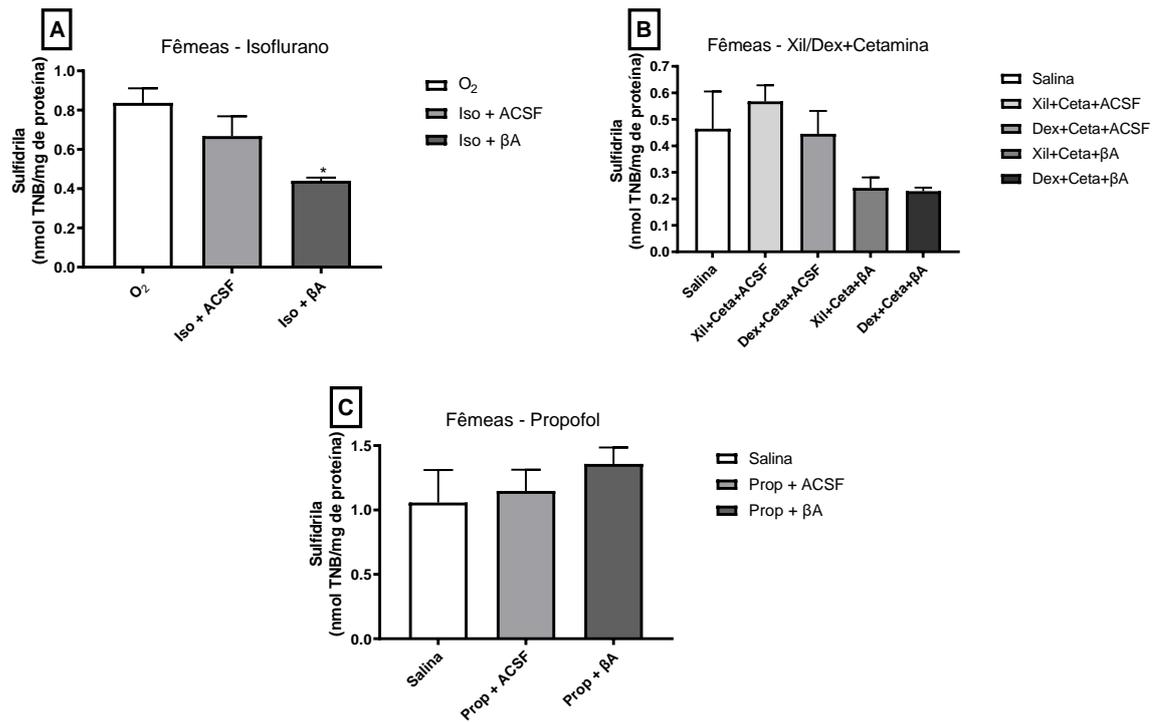


Figura 26. Níveis de sulfidril em hipocampo de camundongos fêmeas. A - Fêmeas anestesiados com isoflurano. B - Fêmeas anestesiados com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina. C - Fêmeas anestesiados com propofol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=5$. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina ou O₂). Abreviaturas: O₂ (oxigênio); Iso (isoflurano); ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial); βA (β-amiloide₁₋₄₂); Xil (xilazina); Dex (dexmedetomidina); Prop (propofol).

5. DISCUSSÃO

Diante dos resultados encontrados, o presente estudo pode demonstrar que ao investigar-se a influência dos diferentes protocolos de anestesia, foram encontrados diferentes dados com relação aos testes comportamentais e bioquímicos. Desta forma, quando investigou-se a influência comportamental do isoflurano utilizado na anestesia inalatória, pode-se encontrar um dano de memória espacial de curto prazo nos grupos βA_{1-42} em machos e nos grupos βA_{1-42} e ACSF em fêmeas, ao avaliar os animais no teste do labirinto em Y. Ao que se espera, o dano de memória no grupo βA_{1-42} já é encontrado em outras pesquisas, visto que a indução do modelo de demência pela injeção do peptídeo tem o objetivo de causar uma neurotoxicidade capaz de preceder com declínio cognitivo nos animais (Kasza et al 2017; Budni et al 2017; Garcez et al 2018). Corroborando com a hipótese de dano pela injeção do peptídeo, houve um aumento do DCF no grupo βA_{1-42} (machos), espécie reativa que é utilizada como biomarcador de radicais livres, e um aumento de SOD, que aumenta sua atividade na presença de excessiva de EROs. Essas alterações foram encontradas em diferentes parâmetros do estresse oxidativo em outros estudos semelhantes, ou seja, diante da neuroinflamação encontrada em modelos de demência, esses parâmetros são significativamente alterados, como forma de compensação do dano (Li et al, 2018; Lee et al, 2015).

Entretanto, ao encontrar-se esse dano de memória espacial no grupo ACSF fêmeas, acredita-se que a exposição do anestésico isoflurano tenha causado consequências significativas de cognição, visto que a injeção dessa substância similar ao líquido cefalorraquidiano, tem o objetivo de formar um grupo controle para a injeção do peptídeo βA_{1-42} , sem causar dano de memória (Paranjampe et al., 2013; Dingleline et al., 1980). Um resultado semelhante foi encontrado em Nie et al. (2020), onde o grupo controle de fêmeas prenhes que foram submetidos a anestesia de isoflurano, durante duas horas, tiveram filhotes com danos cognitivos ao empregar-se o teste de labirinto de aquático de Morris com 31 dias de idade. E em outros estudos também demonstram que o uso de anestésicos inalatórios, incluindo o isoflurano, causam danos permanentes de cognição, além de causar danos ao cérebro capazes de acelerar o processo de demência (Bianch et al, 2008; Eckenhoff et al, 2008; Mandal e Fodale, 2009). Mas é preciso lembrar que a exposição ao

isoflurano, no presente estudo, foi de poucos segundos, sugerindo que houve dano de memória mesmo após 13 dias desta exposição ultracurta.

Quando foram avaliados os dados do teste de habituação ao campo aberto, o dano de memória de habituação não foi encontrado, nem mesmo no grupo que foi induzido ao modelo de demência. Desta forma, a exposição ao isoflurano, mesmo que em única dose, pode ter influenciado na deposição do peptídeo, neste caso, assim como o que foi encontrado por Quiroga et al. (2018), a deposição foi menor com uso desse anestésico, evidenciando um fator neuroprotetor no modelo empregado. Ao comparar com o resultado anterior, o qual demonstrou dano na memória de curto prazo com esse mesmo anestésico, acredita-se que a ação do fármaco, tenha sido diferente em regiões do cérebro responsáveis pelos diferentes tipos de consolidação de memória (Vianna et al., 2000). Todavia, quando o mesmo protocolo foi administrado nas fêmeas que receberam anestesia inalatória com isoflurano para injeção do peptídeo, tiveram dano de memória de habituação quando comparadas ao restante dos grupos. Neste caso, a injeção de agregados do peptídeo βA_{1-42} , assim como se encontram em outras pesquisas, desenvolveu neurodegeneração similar ao que se encontra na DA (Karthick et al., 2018; Chambon et al., 2011). Essa diferença encontrada entre machos e fêmeas, pode ser justificada pelas diferenças sexuais de resposta aos fármacos, podendo o ciclo estral das fêmeas influenciar diretamente na absorção dos anestésicos (Barha et al., 2010; Beiko et al., 2004). Possivelmente, o isoflurano não diminuiu a deposição de peptídeo nas fêmeas justamente por essa diferença de absorção do fármaco.

Contribuindo para este último resultado, a dosagem do conteúdo de sulfidrilas como biomarcador, também revelou um dano oxidativo, ou seja, a injeção foi suficiente para gerar declínio cognitivo e dano a ponto de reduzir o conteúdo de grupamentos sulfidrilas. Este resultado foi semelhante ao encontrado em outros trabalhos, mostrando o que o isoflurano causou neurotoxicidade, levando a danos no hipocampo de ratos e alteração de parâmetros do estresse oxidativo (Li et al., 2019; Chai et al., 2016).

Ao avaliar-se o efeito antidepressivo ou depressogênico do isoflurano, pelo teste de suspensão pela cauda, os grupos expostos a este anestésico, tanto machos quanto fêmeas, não tiveram nenhuma diferença significativa, ou seja, não foram encontrados dados que influenciasse no efeito antidepressivo ou depressogênico. Em estudos clínicos, o uso de isoflurano tem sido empregado como um rápido

tratamento antidepressivo. Entretanto, como antidepressivo, é utilizado em altas doses e de forma repetida. No presente estudo em camundongos, utilizou-se doses baixas e de forma única, apenas com o intuito de promover anestesia para injeção do peptídeo intracerebroventricular, procedimento este que dura em torno de 1 a 3 minutos (Langer et al., 1985; Weeks et al., 2013).

No labirinto em cruz elevada, o objetivo é avaliar a ansiedade/medo dos animais submetidos ao teste. Os camundongos saudáveis, ou sem influência de algum fármaco passam mais tempo nos braços fechados, ou seja, evitam os braços abertos por medo de permanecer nesse ambiente. Este é um comportamento natural dos animais. Portanto, neste teste, pode-se avaliar o efeito ansiogênico (maior permanência nos braços fechados) ou efeito ansiolítico (maior permanência nos braços abertos) (Walf e Frye, 2007; Arruda et al., 2011). Ao empregar esse teste nos animais que receberam anestesia com isoflurano, o único grupo de machos que teve um resultado significativo, recebeu este anestésico para injeção de ACSF; já nas fêmeas esse resultado foi encontrado em todos os grupos, visto que esses camundongos permaneceram mais tempo nos braços abertos, evidenciando um efeito ansiolítico do fármaco empregado. Ao que se espera, fármacos sedativos e/ou anestésicos podem ter efeitos antidepressivos e ansiolíticos; corroborando com a literatura, em ratos anestesiados com esse fármaco, que ao empregar-se outros testes comportamentais e bioquímicos, revelou efeito antidepressivo e ansiolítico deste (Antila et al., 2014; Herbst, 2017; Yonezaki et al., 2015).

Ao avaliar os efeitos comportamentais do protocolo anestésico de xilazina e cetamina, no labirinto em Y, encontrou-se um dano de memória espacial de curto prazo no grupo de machos que receberam a combinação desses fármacos para injeção de ACSF. E ao se avaliar os dados do teste de habituação ao campo aberto, este dano foi encontrado nas fêmeas que receberam o mesmo protocolo. Além do que foi relatado, quando realizada a análise dos parâmetros de estresse oxidativo, foi encontrado aumento do DCF desse mesmo grupo de fêmeas em relação ao controle, e uma diminuição dos valores de GSH no grupo de machos, encontrando um dano oxidativo nos animais que foram submetidos a esse protocolo. Ao que se espera, a injeção de ACSF não deve causar nenhum dano de memória, desta forma encontra-se justificativa em outras pesquisas semelhantes, que utilizaram a associação de xilazina e cetamina, e danos de memória e cognição foram encontrados, sejam empregando o protocolo de forma isolada ou de forma repetida

(Jiron et al., 2019; Huang et al., 2017). E de acordo com Yang et al., (2021), anestésicos gerais, incluindo o protocolo de xilazina e cetamina, podem fragmentar a atividade do hipocampo e afetar a consolidação da memória. Além do exposto, as alterações encontradas nos marcadores de estresse oxidativo, tanto aumento de DCF quando na diminuição de GSH, evidenciam um aumento da produção de EROS e ainda permite-se dizer que a eficiência do sistema antioxidante foi diminuída nesses animais que receberam xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina (Alirezaei et al., 2016).

Em contrapartida, quando se avaliou o teste de labirinto em Y nos machos e fêmeas que receberam o protocolo 2 para injeção do peptídeo βA_{1-42} , pode-se observar que não houve dano de memória espacial de curto prazo, como esperado. Possivelmente a utilização destes fármacos tenha protegido este dano. Como já exposto em outras pesquisas, a cetamina pode oferecer um efeito neuroprotetor, devido ao seu mecanismo de ação nos receptores NMDA, semelhante aos efeitos da memantina, fármaco empregado no controle da DA (Lener et al., 2018; Vasconcelos et al., 2005). Outro fármaco empregado no protocolo, a dexmedetomidina, a qual possui possíveis mecanismo de proteção frente ao peptídeo, em neurônios e astrócitos, tanto em modelos animais quanto em pesquisas clínicas (Wang et al., 2018).

Nos grupos que receberam xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina para injeção de peptídeo βA_{1-42} , foram encontrados danos de memória de habituação no teste comportamental de habituação ao campo aberto, tanto em machos quanto em fêmeas. Da mesma forma, a concentração de radicais livres foi encontrado nas fêmeas, ao se avaliar os níveis de DCF. Esses resultados indicam que a injeção do peptídeo associada ou não a administração dos fármacos anestésicos, causou neurotoxicidade, a ponto de afetar a memória e levar a danos oxidativos a esses animais (Kasza et al., 2017; Budni et al., 2017; Garcez et al., 2018). Outro resultado que pode evidenciar alteração pela deposição do peptídeo foram os valores de GSH, nos dois grupos que receberam injeção, ou seja, em ambos os protocolos anestésicos. Quando os valores de GSH apresentam-se reduzidos em relação ao controle, pode ser evidenciado um sistema antioxidante insuficiente, provavelmente afetado pelo modelo de demência empregado na pesquisa (Faure e Lafond, 1995).

O teste de suspensão pela cauda mostrou que todos os grupos de fêmeas que foram anestesiadas com xilazina e cetamina ou dexmedetomidina e cetamina, obtiveram um efeito antidepressivo quando comparados ao grupo controle. Esse resultado reflete em uma possível influência dos fármacos nesse efeito. Dentre os fármacos empregados, a cetamina tem uma importante atuação no tratamento ou prevenção de comportamento depressivo (Abelaira et al., 2021). Ao ser empregada em estudos clínicos, mostrou efeitos antidepressivos rápidos principalmente em transtorno depressivo maior, doença que está entre as mais incapacitantes no mundo todo, e mais especificamente em paciente com depressão resistente a tratamentos anteriores (Rush et al., 2006; Murrough et al., 2013).

O mecanismo de ação da cetamina é baseado no antagonismo de receptores glutamatérgicos no tipo NMDA, os quais tem um papel significativo no mecanismo de sensibilização central. Esse mecanismo culmina em aumento do disparo glutamatérgico, e o glutamato liberado se liga e ativa receptores AMPA, resultando em liberação de BDNF, além de ativação do receptor de tropomiosina cinase B (TrkB). Esses mecanismos de ação deste fármaco culminam em alterações agudas na plasticidade sináptica resultando em um fortalecimento das sinapses excitatórias, o que se torna necessário para as respostas antidepressivas (Zanos e Gould, 2018; Lener et al., 2018; Vasconcelos et al., 2005).

De acordo com estudos anteriores, quando a cetamina é administrada em apenas uma dose, seus efeitos antidepressivos já são encontrados, ao empregar testes comportamentais. As administrações do fármaco são realizadas de forma aguda, por pelo menos uma semana antes do início dos testes, e estes resultados antidepressivos já são encontrados, quando comparados a administração de solução salina (Zhang et al., 2016; Wang et al., 2019; Mastrodonato et al., 2019).

Há uma série de controvérsias quando relatado as diferenças sexuais em resposta a tratamento com antidepressivos, ao que se encontram na literatura, dependendo da terapia instituída, estudos mostram que existe uma maior eficácia antidepressiva em mulheres do que em homens (Kornstein et al., 2000; Martenyi et al., 2001; Quitkin et al., 2002; Khan et al., 2005). Essas diferenças podem surgir devido aos dados demográficos, classe dos agentes terapêuticos e parâmetros relacionados à quantidade, regime e duração da exposição ao fármaco (Sramek et al., 2016). Dentre as hipóteses que defendem uma resposta diferente nesse gênero, em pesquisas com animais fêmeas, acredita-se que o estrogênio pode afetar o

sistema serotoninérgico, levando a uma maior vulnerabilidade a estressores, além de diferentes respostas a agentes antidepressivos, sendo mais eficaz do que em machos (Dalla et al., 2009). Os dados presentes neste experimento, com relação a resposta antidepressiva da cetamina, também corroboram com este contexto.

O último protocolo utilizado da pesquisa, foi anestesia com propofol, administrado de forma intraperitoneal para possibilitar a injeção intracerebroventricular de ACSF ou βA_{1-42} , sendo comparados com um grupo controle que recebeu apenas solução salina na mesma via de administração. Ao analisar os dados coletados do teste comportamental do labirinto em Y, a fim de avaliar memória espacial de curto prazo, foi evidenciado dano apenas no grupo de machos que recebeu propofol para injeção de βA_{1-42} . Esse resultado é justificado pela injeção de peptídeo βA_{1-42} , que promoveu dano capaz de causar demência e afetar a memória espacial de curto prazo, ou seja, esses animais não exploraram o braço novo como esperado (Garcez et al., 2018; Ma et al., 2018). Resultado semelhante encontrado no grupo de fêmeas βA_{1-42} , que passaram pelo teste de habituação ao campo aberto, o qual revelou dano de memória ao comparar o dia treino e teste como relação ao número de cruzamentos e levantamentos, considerando que não houve diferença entre os dias. Esses dados também foram encontrados por outros autores, que tanto no modelo de demência através da injeção de peptídeo βA_{1-42} , quanto para outros modelos de demência já validados, foram encontrados danos de memória espacial de curto prazo, ao utilizarem o labirinto em Y, e danos de memória de habituação utilizando o teste de habituação ao campo aberto (Webster et al., 2014; Webster et al., 2013).

Corroborando com esse resultado, ao ser avaliados os parâmetros do estresse oxidativo nesses mesmos animais, pode-se encontrar aumento significativo de DCF em machos e fêmeas, aumento da atividade da SOD em machos e aumento significativo do conteúdo sulfidril em machos. Devido ao processo inflamatório intenso causado pela deposição de peptídeo, houve alta produção de EROs, resultando em aumento de DCF, o sistema antioxidante, expresso pelo aumento dos níveis de SOD, aumentou sua atividade na tentativa de diminuir danos biológicos, e o aumento do conteúdo sulfidril, sugerindo dano oxidativo (Varadarajan et al., 2000; Bolós et al., 2017; Su et al., 2020).

Com relação ao grupo de fêmeas que foram submetidas ao teste de labirinto em Y, após anestesia com propofol para injeção do peptídeo βA_{1-42} , observou-se que

o protocolo possivelmente protegeu o dano causado pela injeção. Este efeito pode ser justificado pelo uso de propofol em outros estudos, mostrando uma proteção contra danos neuronais (Ergun et al., 2002). Este fármaco é capaz de suprimir apoptose e inflamação e regular proteínas associadas à neuroproteção ou homeostase de íons para atuar em seus efeitos neuroprotetores (Fan et al., 2015).

Os grupos ACSF, tanto machos quanto fêmeas tiveram alterações significativas nos marcadores de estresse oxidativo. Tanto machos quanto fêmeas apresentaram aumento significativo de DCF, este refletido por elevação de EROs, ainda no grupo fêmeas que receberam injeção de ACSF, demonstraram um sistema antioxidante ineficaz ao se observar a atividade da SOD reduzida quando comparados aos grupos controle e βA_{1-42} . Uma hipótese que justifica esses resultados encontrados é que, de acordo com Whittington et al. (2011), o propofol aumenta a fosforilação da proteína tau, tanto *in vivo* quanto *in vitro* em condições normotérmicas, culminando no aparecimento de massas fibrilares, ou seja, um processo de neurodegeneração que contribui para o desenvolvimento do estresse oxidativo, corroborando assim com as alterações encontradas.

O labirinto em cruz elevada mostrou que nos machos anestesiados com propofol, houve um efeito ansiolítico ao obterem maior número de entradas e permanência nos braços aberto. Acredita-se que o propofol, assim como outros fármacos anestésicos e sedativos, forneçam aos animais um efeito ansiolítico (Kurt et al., 2003). De acordo com Vasileiou et al., (2009), o propofol também possui propriedades ansiolíticas, as quais podem estar relacionadas a diferentes sistemas neuromediadores. Em outro estudo, quando o comparado a diferentes fármacos, assim como o diazepam, o propofol em diferentes doses proporcionou, aos camundongos avaliados, um efeito ansiolítico ao permanecerem mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Kurt et al., 2003).

Nas condições desse estudo e diante dos resultados apresentados, os diferentes protocolos anestésicos puderam influenciar de alguma forma nos testes comportamentais e parâmetros do estresse oxidativo. Pelo exposto, o protocolo no qual utilizou-se propofol, apresentou menos influência sob os comportamentos como um todo. Não apresentou dano de memória nos grupos que receberam ACSF, além não influenciar nos efeitos antidepressivos e apresentar efeito ansiolítico devido suas propriedades farmacológicas. Entretanto, teve alterações consideráveis nos

parâmetros de estresse oxidativo, quando se compara aos resultados encontrados com a exposição do isoflurano.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados acredita-se que no teste de labirinto em Y, principal teste empregado para avaliação do modelo de demência de injeção do peptídeo βA_{1-42} , o protocolo que se empregou propofol como anestésico, não causou dano de memória espacial de curto prazo, tanto em machos quanto em fêmeas. Entretanto promoveu um fator de proteção no grupo de fêmeas que foram induzidas ao modelo de demência. Em contrapartida, como evidenciado, alterações significativas frente aos parâmetros do estresse oxidativo, como aumento nos níveis de DCF, SOD e sulfidril, foram encontradas. Diferente do que foi evidenciado com o uso de isoflurano, o qual teve promovido dano de memória espacial de curto prazo, todavia, não alterou o modelo de demência empregado. Além disso, alterou menos os parâmetros de estresse oxidativo, sendo encontrados apenas redução nos níveis de sulfidril. E com relação as associações de xilazina e cetamina, dexmedetomidina e cetamina, pode-se também observar diferentes influências nos grupos, mostrando dano de memória nos grupos ACSF e proteção sobre o modelo. Possivelmente esses resultados contribuem para que se escolha um protocolo de acordo com cada objetivo da pesquisa.

Entretanto, sugere-se novos estudos, empregando mais testes comportamentais, como é o exemplo do labirinto octogonal, além de dosagem dos parâmetros do estresse oxidativo no córtex e citocinas inflamatórias para que se consiga chegar a um resultado mais preciso, definindo assim um protocolo anestésico menos influente no modelo demência de injeção do peptídeo βA_{1-42} .

REFERÊNCIAS

- Abelaira HM, Veron DC, de Moura AB, Carlessi AS, Borba LA, Botelho ME, Andrade NM, Martinello NS, Zobot GC, Joaquim L, Biehl E, Bonfante S, Budni J, Petronilho F, Quevedo J, Réus GZ. Sex differences on the behavior and oxidative stress after ketamine treatment in adult rats subjected to early life stress. *Br Res Bulle.* 2021;172: 129-138.
- Akillioglu K, Babar Melik E, Melik E, Boga A. Effects of ketamine on exploratory behaviour in BALB/C and C57BL/6 mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2021; 100:513–517.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3): 141-145.
- Alirezai M, Rezaei M, Hajjigharamani S, Sookhtehzari A, Kiani K. Oleuropein attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress induced by some anesthetic drugs in the hippocampal area of rats. *J of Physiol Sci.* 2016; 67(1):131-9.
- Antila H, Ryazantseva M, Popova D, Sipilä P, Guirado R, Kohtala S, Yalcin I, Lindholm J, Vesa L, Sato V, Cordeira J, Autio H, Kislin M, Rios M, Joca S, Casarotto P, Khiroug L, Lauri S, Taira T, Castrén E, Rantamäki T. Isofurane produces antidepressant effects and induces TrkB signaling in rodents. *Scienti Repor.* 2017; 7(7811): 1-12.
- Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci.* 2008;44(2):279–287.
- Arruda EJ, Kitamura JH, Chaves TP, Silva CA, Mascarim AL. Comportamento Exploratório e Ansiolítico de Ratos e Ratas Submetidos à Estimulação Somatossensorial. *Rev Bras Terap e Saúde.* 2011; 2(1):7-12.
- Attems J, Thal DR, Jellinger KA. The relationship between subcortical tau pathology and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(4):711–725.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279-312.
- Baranov D, Bickler PE, Crosby GJ, Culley DJ, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG, et al. Consensus statement: First international workshop on anesthetics and alzheimer's disease. *Anesth Analg.* 2009;108(5):1627–1630.
- Barbosa LF, Medeiros MHG, Augusto O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim Nova.* 2006; 29(6):1352-1360.
- Barbosa KBF, Costa NMB, De Cássia GAR, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J.

Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr.* 2010;23(4):629–643.

Barha CK, Dalton GL, Galea LAM. Low doses of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17 α - and 17 β -estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(2):547–559.

Barreiros, ALBS, David, JM, David, JP. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova.* 2006; 29(1):113-123.

Beiko J, Lander R, Hampson E, Boon F, Cain DP. Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behav Brain Res.* 2004;151(1–2):239–253.

Berry SH. Anestésicos injetáveis. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene AS, Robertson SA. *Lumb e Jones Anestesiologia e Analgesia em Veterinária.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015; 829-891.

Bianchi SL, Tran T, Liu C, Lin S, Li Y, Keller JM, Eckenhoff RG, Eckenhoff MF. Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. *Neurobiol of Aging.* 2008; 29:1002-1010.

Bianchi MLP, Antunes LMO. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev nutrição.* 1999; 12(2):123-130.

Bolós M, Perea JR, Avila J. Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol Conc.* 2017; 8(1):37-43.

Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Moacir W, Lissi E, Dutra-Filho CS. Avaliação do mecanismo envolvido no dano oxidativo induzido por leucina no córtex cerebral de ratos jovens. *Radic Livre Res.* 2005; 39: 71 – 79.

Bsava manual of canine and feline anaesthesia and analgesia. 2 ed. Canadá, US:British Small animal Vet Ass. 2010;120-132.

Budni J, Feijó DP, Batista-Silva H, Garcez ML, Mina F, Belletini-Santos T, Krasilchik LR, Luz AP, Schiavo GL, Quevedo J. Lithium and memantine improve spatial memory impairment and neuroinflammation induced by β -amyloid 1-42 oligomers in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2017; 141:84-92.

Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. *Tre in Mol Med.* 2001; 7 (12): 548-554.

Campos AC, Fogaça M V., Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35(2):101–111.

Cervellati C, Trentini A, Pecorelli A, Valacchi G. Inflammation in neurological disorders: the thin boundary between brain and periphery. *Mary Ann Liebert.* 2020;1–

57.

Chai D, Jiang H, Qifang L. Isoflurane neurotoxicity involves activation of hypoxia inducible factor-1 α via intracellular calcium in neonatal rodents. *Bran R.* 2016; 1653:39-50.

Chambon C, Weneger N, Gravius A, Danysz W. Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid-peptides in rodents. *Behav Bra R.* 2011; 225: 623-641.

Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselet D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology.* 2018; 14: 450-464.

Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ. Human Amyloid b-Induced Neuroinflammation is an Early Event in Neurodegeneration. *Wiley-Liss.* 2006; 53:484-490.

Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, Abisambra JF, Abner EL, Alafuzoff I, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol.* 2014;128(6):755–766.

Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106(3):226-233.

Dandekar A, Mendez R, Zhang K. Cross talk between er stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. In: Osowski CM. *Stress Responses: Methods and protocols, methods in molecular biology.* Nova York: Springer Science. 2015; 205-214.

Del Villar K, Miller CA. Down-regulation of DENN/MADD, a TNF receptor binding protein, correlates with neuronal cell death in Alzheimer's disease brain and hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(12):4210–5.

Dingledine R, Dodd J, Kelly JS. The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording. *J of Neuros Meth.* 1980; 2: 323-362.

Eckenhoff RG, Zheng W, Kelz MB. From Anesthetic Mechanisms Research to Drug Discovery. *Discov.* 2008; 84 (1): 144-148.

Ergun R, Akdemir G, Sen S, Taşçı A, Ergüngör F. Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats. *Neurosurg Ver.* 2002; 25:95–98.

Evered L, Silbert B, Knopman DS, Scott DA, DeKosky ST, Rasmussen LS, et al. Recommendations for the Nomenclature of Cognitive Change Associated with Anaesthesia and Surgery-20181. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(1):1–10.

Falco A D, Cukierman DS, Hauser-davis RA, Rey NA. Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento *Quim. Nova.* 2016;39(1):63–80.

- Fan W, Zhu X, Wu L, Wu Z, Li D, Huang F, He H. Propofol: an anesthetic possessing neuroprotective effects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(8):1520-1529.
- Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In.: Favier L. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* Birkhauser Verlag Basel. 1995; 237-238.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil.* 1997; 43(1): 61-68.
- Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, De Felice FG. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2014;10(1):76–83.
- Flecknell PA, Thomas AA. Anestesia e analgesia comparada em animais de laboratório. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene AS, Robertson SA. *Lumb e Jones Anestesiologia e Analgesia em Veterinária.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015; 2197-2229
- Forrester SJ, DKikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.*2018; 122(6): 877–902.
- Forrester SJ, DKikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.*2018; 122(6): 877–902.
- Gakuba C, Gaberel T, Goursaud S, Bourges J, Di Palma C, Quenault A, Lizarrondo SM, Vivien D, Gauberti M. General anesthesia inhibits the activity of the “glymphatic system”. *Theranostics.* 2018; 8(3). 710-722.
- Gao J, Sun Z, Xiao Z, Du Q, Niu X, Wang G, et al. Dexmedetomidine modulates neuroinflammation and improves outcome via alpha2-adrenergic receptor signaling after rat spinal cord injury. *Br J Anaesth.* 2019;123(6):827–838.
- Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Luz AP, Schiavo GL, Macieski JMC, Medeiros EB, Marques AO, Magnus NQ, Budni J. The Involvement of NLRP3 on the Effects of Minocycline in an AD-Like Pathology Induced by β -Amyloid Oligomers Administered to Mice. *Mol Neurobiol.* 2018:1-12.
- GBD 2016 Dementia Collaborators. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(1):88-106.
- Gioeni D, Di Cesare F, D'Urso ES, Rabbogliatti V, Ravasio G. Ketamine-dexmedetomidine combination and controlled mild hypothermia for the treatment of long-lasting and super-refractory status epilepticus in 3 dogs suffering from idiopathic epilepsy. *J Vet Emerg Crit Car.*2020; 30(4):455-60.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–55.

Hardy, J; Selkoe D. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Amyloid Int J Exp Clin Investig.* 2002;297(5580):353–367.

Hector A, McAnulty C, Piché-Lemieux MÉ, Alves-Pires C, Buée-Scherrer V, Buée L, et al. Tau hyperphosphorylation induced by the anesthetic agent ketamine/xylazine involved the calmodulin-dependent protein kinase II. *FASEB J.* 2020;34(2):2968–2977.

Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 1995;65(5):2146–56.

Huang L, Hayes S, Yang G. Long-lasting behavioral effects in neonatal mice with multiple exposures to ketamine-xylazine anesthesia. *Neuroto and Teratol.* 2017; 60:75-81.

Jiron JM, Mendieta Calle JL, Castillo EJ, Abraham AM, Messer JG, Malphurs WL, Malinowski C, Grove K, Reznikov LR, Zubcevic J, Aguirre JI. Comparison of Isoflurane, Ketamine–Dexmedetomidine, and Ketamine–Xylazine for General Anesthesia during Oral Procedures in Rice Rats (*Oryzomys palustris*). *Jour of the Ameri Associa for Labor Ani Scie.* 2019; 58(1):40-9.

Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295: 849 –868.

Jun JH, Kim KN, Kim JY, Song SM. The effects of intranasal dexmedetomidine premedication in children: a systematic review and meta-analysis. *Can J Anest/J can d'anest.* 2017;64(9):947-61.

Karthick C, Nithiyanandan S, Essa MM, Guillemin GJ, Swaminathan K, Jayachandran SK, Anusuyadevi M. Time-dependent effect of oligomeric amyloid- β (1–42)-induced hippocampal neurodegeneration in rat model of Alzheimer's disease. *Neuro R.* 2018; 41(2): 1-12.

Kasza A, Penke B, Frank Z, Bozsó Z, Szegedi V, Hunya A, Németh K, Kozma G, Fülöp L. Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized β -Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. *Molecules.* 2017; 22:1-28.

Khan A., Brodhead AE., Schwartz KA., Kolts RL., Brown WA. Diferenças entre os sexos na resposta ao antidepressivo em estudos clínicos de antidepressivos recentes. *J Clin Psychopharmacol.* 2005; 25 (4): 318–324.

Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv [Internet].* 2018; 4:575–90.

Kishi T, Matsunaga S, Oya K, Nomura I, Ikuta T, Iwata N. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimer's Dis.*

2017;60(2):401–425.

Kornstein SG., Schatzberg AF., Thase ME. Diferenças de gênero na resposta ao tratamento com sertralina versus imipramina na depressão crônica. *Am J Psychiatry*. 2000; 157 (9): 1445–1452.

Kurt M, Bilge SS, Kukula O, Celik S, Kesim Y. Anxiolytic-like profile of propofol, a general anesthetic, in the plus-maze test in mice. *Pol. J. Pharmacol*. 2003; 55: 973–977.

Langer G, Neumark J, Koinig G, Graf M, Schonbeck G. Rapid psychotherapeutic effects os anesthesia with isoflurane (ES narcotherapy) in treatment-refractory depressed patients. *Neuropsych*. 1985; 14: 118-120.

Lebel e Bondy (1992) LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227-31.

Lee YM, Song BC, Yeum KJ. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. *BioMed Res Int*. 2015; 1-8.

Lener MS, Niciu MJ, Ballard ED, Park M, Park LT, Nugent AC, Zarate CA. Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. *Bio Psychi*. 2017; 81(10):886-97.

Leonardi F, Costa GL, Stagnoli A, Zubin E, Boschi P, Sabbioni A, Simonazzi B. The effect of intramuscular dexmedetomidine-butorphanol combination on tear production in dogs. *Can Vet J*. 2019; 60: 55–59.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. Cambridge: Academic Press.1990; 464-478.

Li B, Feng XJ, Hu XY, Chen YP, Sha JC, Zhang HY, Fan HG. Effect of melatonin on attenuating the isoflurane-induced oxidative damage is related to PKC α /Nrf2 signaling pathway in developing rats. *Br Res Bull*. 2018; 143: 9-18.

Li N, Yue L, Wang J, Wan Z, Bu W. MicroRNA-24 alleviates isoflurane-induced neurotoxicity in rat hippocampus via attenuation of oxidative stress. *Biochem Cell Biol*. 2020; 98 (2): 208-218.

Li R, Singh M. Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):385–403.

Li Y, Ding R, Ren X, Wen G, Dong Z, Yao H, et al. Long-term ketamine administration causes Tau protein phosphorylation and Tau protein-dependent AMPA receptor reduction in the hippocampus of mice. *Toxicol Lett*. 2019; 315:107–115.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Lucatelli JF, Barros AC, Sharbel MW, De Andrade FM. Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce. *Rev Psiquiatr Clin.* 2009;36(1):25–30.

Ma L, Xiao H, Wen J, Liu Z, He Y, Yuan F. Possible mechanism of *Vitis vinifera L.* Lip Hea Dise. 2018; 17(152):01-09.

Mahmoud M, Mason KP. Dexmedetomidine: review, update, and future considerations of paediatric perioperative and periprocedural applications and limitations. *Brit J Anaest.* 2015; 115(2):171-82.

Mandal PK, Fodale V. Isoflurane and desflurane at clinically relevant concentrations induce amyloid b-peptide oligomerization: An NMR study. *Bioch and Bioph R Com.* 2009; 379: 716-720.

Martenyi F., Dossenbach M., Mraz K., Metcalfe S. Diferenças de gênero na eficácia da fluoxetina e maprotilina em pacientes deprimidos: um ensaio duplo-cego de antidepressivos com perfil de inibição da recaptação serotoninérgica ou norepinefrinérgica. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2001; 11 (3): 227–232.

Mastrodonato A, Cohensedgh O, LaGamma CT, McGowan JC, Hunsberger HC, Denny CA. Prophylactic (R,S)-ketamine selectively protects against inflammatory stressors. *Behav Br Rese.* 2020; 378:112238.

Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's Disease:A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(4):1–16.

McClure RES, Barha CK, Galea LAM. 17 β -Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. *Horm Behav [Internet].* 2013;63(1):144–57.

McGeer EG, Yasojima K, Schwab C, McGeer PL. The pentraxins: Possible role in Alzheimer's disease and other innate inflammatory diseases. *Neurobiol Aging.* 2001;22(6):843–848.

McLarnon J, Ryu J. Relevance of BA 1-42 Intrahippocampal Injection as An Animal Model of Inflamed Alzheimers Disease Brain. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5(5):475–480.

Moreno JCD. Antagonistas de receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA). In.: Fantoni D. Tratamento da dor na clínica de pequenos animais. Rio de janeiro: Elsevier. 2012; 171-201.

Morse HC. Building a Better Mouse: One Hundred Years of Genetics and Biology. In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL. The Mouse in Biomedical Research. 2007; p. 1–11.

Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, Al Jurdi RK, Green CE, Perez AM, Iqbal S, Pillemer S, Foulkes A, Shah A, Charney DS, Mathew SJ. Antidepressant Efficacy of

Ketamine in Treatment-Resistant Major Depression: A Two-Site Randomized Controlled Trial. *Amer J Psychi.* 2013; 170(10):1134-42.

Nam E, Derrick JS, Lee S, Kang J, Han J, Lee SJC, Chung SW, Lim MH. Regulatory Activities of Dopamine and Its Derivatives towards Metal-Free and Metal-Induced Amyloid- β Aggregation, Oxidative Stress, and Inflammation in Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* 2018; 9(11): 2655-2666.

Nunes EA, Hallak JEC. Modelos animais em psiquiatria: Avanços e desafios. *Rev Latinoam Psicopatol Fundam.* 2014;17(3):528–543.

Oliveira J, Kucharska E, Garcez ML, Rodrigues MS, Quevedo J, Moreno-Gonzalez I, Budni J. Inflammatory Cascade in Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Review of Experimental Findings. *Cells.* 2021;10(10):2581.

Paranjame GS, Terril SE, Gouwens LK, Ruck BM, Nichols MR. Amyloid- β (1–42) Protofibrils Formed in Modified Artificial Cerebrospinal Fluid Bind and Activate Microglia. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 8:312-322.

Pawson P, Forsyth S. Agentes anestésicos. In: Maddison JE, Page SW, Churuch DB. *Farmacologia clínica de pequenos animais.* 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010; 83-112.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985; 14: 149-167.

Pérez MJ, Ponce DP, Osorio-Fuentealba C, Behrens MI, Quintanilla RA. Mitochondrial Bioenergetics Is Altered in Fibroblasts from Patients with Sporadic Alzheimer's Disease. *Fronte Neurosci.* 2017;11: 1-13.

Perlman RL. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evol Med Public Heal.* 2016;170-176.

Perucho J, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-navarro JA. Anesthesia with Isoflurane Increases Amyloid Pathology in Mice Models of Alzheimer's Disease. 2010; 19:1245–1257.

Pitsikas N, Georgiadou G, Delis F, Antoniou K. Effects of Anesthetic Ketamine on Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Neuroch Rese.* 2019; 44(4): 829-38.

Qiu C, Kivipelto M, Von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(2):111–128.

Quiroga C, Chaparro RE, Karlinski R, Erasso D, Gordon M, Morgan D, et al. Effects of Repetitive Exposure to Anesthetics and Analgesics in the Tg2576 Mouse Alzheimer's Model. *Neurotox Res.* 2014;1-8.

Quitkin FM., Stewart JW., McGrath PJ. Existem diferenças entre as respostas aos antidepressivos de mulheres e homens? *Am J Psychiatry*. 2002; 159(11): 1848–1854.

Ramtekkar UP, Reiersen AM, Todorov AA, Todd RD, Sex and age differences in attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and diagnoses: implications for dsm-v and icd-11. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 49(3): 217–28.

Rankin DC. Sedatives and tranquilizers. In.: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene AS, Robertson SA. *Veterinary anesthesia and analgesia*. Ames: Wiley Blackwell. 2015; 196-206.

Resende R, Ferreira E, Pereira C, Resende de Oliveira C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience*. 2008;155(3):725-37.

Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(2):317–330.

Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: A review. *Brain Res Bull*. 2003;61(1):1–24.

Ruiz-Muñoz AM, Nieto-Escamez FA, Aznar S, Colomina MT, Sanchez-Santed F. Cognitive and histological disturbances after chlorpyrifos exposure and chronic A β (1–42) infusions in Wistar rats. *NeuroToxicology*. 2011;32(6):836-44.

Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M. Acute and Longer-Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps: A STAR*D Report. *Ameri J Psychi*. 2006; 163(11):1905-17.

Ryu JK, McLarnon JG. Block of purinergic P2X7 receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2008;19(17):1715–1719.

Saraiva RA. Mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002; 52(1): 114-123.

Sarter M, Bruno JP. Cortical acetylcholine, reality distortion, schizophrenia, and Lewy Body Dementia: too much or too little cortical acetylcholine? *Brain Cogn*. 1998; 38:297–316.

Seymour C, Duke-Novakvski T. Fármacos sedativos. In.: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene AS, Robertson SA. *Lumb e Jones Anestesiologia e Analgesia em Veterinária*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015; 48-60.

Shami NJIE, Moreira EAM. Lycopene as an antioxidant agent. *Rev Nutr*. 2004;17(2):227–36.

Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VMY, Trojanowski JQ. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):295–303.

Shepherd A, Tyebji S, Hannan AJ, Burrows EL. Translational Assays for Assessment of Cognition in Rodent Models of Alzheimer's Disease and Dementia. *J Mol Neurosci.* 2016;60(3):371–382.

Sharifi-Rad M, Anil KNV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, Rajkovic J, Tsouh Fokou PV, Azzini E, Peluso I, Prakash MA, Nigam M, El RY, Beyrouthy ME, Polito L, Iriti M, Martins N, Martorell M, Docea AO, Setzer WN., Calina D, Cho W, Sharifi-Rad J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frente. Physiol.* 2020; 11: 694.

Shokouhi S, Newhouse PA, Taylor WD, Albert K, Kang H. In vivo network models identify sex differences in the spread of tau pathology across the brain. 2020;1–11.

Sies, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In *Oxidative Stress*; Academic Press: London, UK, 1985; 1–8.

Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015; 4:180–193.

Sies, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* 2018; 7: 122–126.

Silbert B, Evered L, Scott DA, Maruff P. Anesthesiology must play a greater role in patients with Alzheimer's disease. *Anesth Analg.* 2011;112(5):1242–1255.

Singh-Bains MK, Linke V, Austria MDR, Tan AYS, Scotter EL, Mehrabi NF, et al. Altered microglia and neurovasculature in the Alzheimer's disease cerebellum. *Neurobiol Dis.* 2019; 132:1-16.

Sipos E, Kurunczi A, Kasza Á, Horváth J, Felszeghy K, Laroche S, et al. β -Amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: Implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2007;147(1):28–36.

Smalheiser NR. Ketamine: A Neglected Therapy for Alzheimer Disease. 2019; 11:1–5.

Sramek JJ, Murphy MF, Cutler NR. Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016;18(4):447-457.

Steffey EP, Mama KR, Brosnan RJ. Anestésicos inalatórios. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene AS, Robertson SA. *Lumb e Jones Anestesiologia e Analgesia em Veterinária*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015; 892-1035.

Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Lazareva NA, Gulyaeva NV. Studies of the Effects of Central Administration of β -Amyloid Peptide (25–35):

Pathomorphological Changes in the Hippocampus and Impairment of Spatial Memory. 2006. *Neuro and Behavio Physio*. 36 (1): 101-106.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70.
Strooper B De, Karran E. Review the Cellular Phase of Alzheimer' s Disease. *Cell*. 2016;164(4):603–615.

Su C, Chen Y, Chen K, Li W, Tang H. Inhibitory potency of 4- substituted sampangine derivatives toward Cu²⁺ mediated aggregation of amyloid β -peptide, oxidative stress, and inflammation in Alzheimer's disease. *Neuroch Inter*. 2020; 139:104794.

Sultana R, Kimball DB, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, Markesbery WR, Butterfield DA. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: An approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobio Agi*. 2006; 27: 1564-1576.

Swardfager W, Lanctt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010;68(10):930–41.

Takeda S, Sato N, Niisato K, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, et al. Validation of BA1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. *Brain Res*. 2009; 1280:137–147.

Tang JX, Baranov D, Hammond M, Shaw LM, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG. Human Alzheimer and inflammation biomarkers after anesthesia and surgery. *Anesthesiology*. 2012;115(4):727–732.

Tang JX, Baranov D, Hammond M, Shaw LM, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG. Human Alzheimer and inflammation biomarkers after anesthesia and surgery. *Anesthesiology*. 2012;115(4):727–732.

Tranquilli WJ, Grimm KA. Introdução à anestesia e à analgesia. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene AS, Robertson SA. *Lumb e Jones Anestesiologia e Analgesia em Veterinária*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015; 29-47.

Ueda K, Fukui Y, Kageyama H. Amyloid β protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid β protein. *Brain research*. 1994;639(2):240-4.

Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. *J Struct Biol*. 2000; 130(2-3):184-208.

Vasconcelos SM, Andrade MD, Soares PM, Chaves BG, Patrocínio MC, Sousa FC, Macêdo DS. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. *Arch Cli Psychi*. 2005; 32(1):10-6.

Vasileiou I, Xanthos T, Koudouna E, Perrea D, Klonaris C, Katsargyris A, et al. Propofol: A review of its non-anaesthetic effects. *Europ J Pharm.* 2009; 605(1-3):1–8

Vianna MRM, Alonso M, Viola H, Quevedo J, Paris F, Furman M, Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-340.

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat proto.* 2007; 2(2):322-328.

Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol.* 2008;85(2):148–175.

Wang Y, Jia A, Ma W. Dexmedetomidine attenuates the toxicity of β - amyloid on neurons and astrocytes by increasing BDNF production under the regulation of HDAC2 and HDAC5. *Molecular medicine reports.* 2019;533–540.

Wang J, Zhao Q, Zhou Y, Sun W, Han S, Peng Y, Li J, Han R. Subanesthetic Dose of Ketamine Improved CFA-induced Inflammatory Pain and Depression-like Behaviors Via Caveolin-1 in Mice. *J Neurosur Anest.*2019; 32(4):359-66.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing, and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520–562.

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Gen.* 2014; 5 (8): 1-23.

Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzhe Resea Thera.* 2013; 5(3):28.

Weeks HR, Tadler SC, Smith KW, Iacob E, Saccoman M, White AT, Landvatte JD, Chelune GJ, Suchy Y, Clark E, Cahalan MK, Bushnell L, Sakata D, Light AR, Light KC. Antidepressant and Neurocognitive Effects of Isoflurane Anesthesia versus Electroconvulsive Therapy in Refractory Depression. *Plos One.* 2013; 8(7): 1-8.

Wen G, Yao H, Li Y, Ding R, Ren X, Tan Y, et al. Regulation of tau protein on the antidepressant effects of ketamine in the chronic unpredictable mild stress model. *Front Psychiatry.* 2019; 10:1–10.

Whittington RA, Virág L, Marcouiller F, Papon MA, El Khoury NB, Julien C, Morin F, Emala CW, Planel E. Propofol directly increases tau phosphorylation. *PLoS One.* 2011;6(1):e16648.

Whittington RA, Virág L, Gratuze M, Petry FR, Noël A, Poitras I, et al. Dexmedetomidine increases tau phosphorylation under normothermic conditions in vivo and in vitro. *Neurobiol Aging.* 2015;36(8):2414–2428.

Woodhouse A, Fernandez-Martos CM, Alice R, Atkinson K, Hanson KA, Collins JM, et al. *BMC Anesthesiology*. 2020;18(47): 1-8.

Wrona M, Wardman P. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Fr Rad Biol Med*. 2006; 41(4):657-667.

Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, Semenza GL. Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. In: Galluzzi L, Kroemer G. *Methods in Enzymology*. Vol 542. Cambridge: Academic Press. 2014; 425-455.

Yang W, Chini M, Pöppel JA, Formozov A, Dieter A. Anesthetics fragment hippocampal network activity, alter spine dynamics, and affect memory consolidation. *PLOS Biology*. 2021; 19(4): e3001146.

Yonezaki K, Uchimoto A, Miyazaki T, Asakura A, Kobayashi A, Takase K, Goto T. Postanesthetic Effects of Isoflurane on Behavioral Phenotypes of Adult Male C57BL/6J Mice. *Plos one*. 2015; 10(3):1-23.

Zhao M, Cribbs DH, Anderson AJ, Cummings BJ, Su JH, Wasserman AJ, et al. The induction of the TNFalpha death domain signaling pathway in Alzheimer's disease brain. *Neurochem Res*. 2003;28(2): 307–18.

Zanos P, Gould TD. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychi*. 2018; 23(4):801-11.

Zhang GF, Wang J, Han JF, Guo J, Xie ZM, Pan W, Yang JJ, Sun KJ. Acute single dose of ketamine relieves mechanical allodynia and consequent depression-like behaviors in a rat model. *Neuro Let*. 2016; 631:7-12.

Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*. 2002;13(4):387-91

**ANEXO
A**



CEUA

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **10/03/2020**.

Título de Projeto	Efeitos comportamentais e neuroquímicos da exposição a diferentes agentes anestésicos em modelos animais da doença de Alzheimer
Project Title	Behavioral and neurochemical effects of several anesthetic agent exposure in animal models of Alzheimer's disease
Número do Protocolo Protocol number	020/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	Josiane Budni
Pesquisadores Researchers	Paulo Cesar Lock Silveira, Eduarda Behenck Medeiros, Gabriel Casagrande Zobot, Adrielly Vargas, Camilla Canto Vieira, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Laura de Roch Casagrande, Gustavo de Bem Silveira.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	16/03/2020 a 15/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / Balb C
Idade/Peso	3 meses / 30-35g
Número de animais	220 Masculino + 220 Feminina = 440
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Samira S. Valvassori
Samira da Silva Valvassori
 Coordenadora do CEUA

Criciúma, 10 de março de 2020.