



Ministério da Educação

Universidade Federal de Rio Grande



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**EFEITO DO ANESTÉSICO SEVOFLURANO NO APRENDIZADO E NA
MEMÓRIA DE RATOS JOVENS**

ANDREA FOGAÇA SOUBHIA

Rio Grande, 2017



Ministério da Educação

Universidade Federal de Rio Grande



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**EFEITO DO ANESTÉSICO SEVOFLURANO NO APRENDIZADO E NA
MEMÓRIA DE RATOS JOVENS**

ANDREA FOGAÇA SOUBHIA

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Susi Lauz

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Martí Barros

Rio Grande, 2017

Andrea Fogaça Soubhia

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**EFEITO DO ANESTÉSICO SEVOFLURANO NO APRENDIZADO E NA
MEMÓRIA DE RATOS JOVENS**

Banca Examinadora

Profa Dra. Andrea Von Groll.– FURG

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes–USP

Profa. Dra. Lulie Susin- FURG

Profa. Dra..Susi Lauz– FURG (Orientadora)

Agradecimentos

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Susi Lauz que permitiu que eu realizasse meu sonho do doutorado ao disponibilizar a vaga para seleção, sem a qual nada teria começado e Profa. Dra. Daniela Martí Barros, que com sua generosidade e sabedoria abriu seu laboratório para que esse estudo pudesse se tornar realidade. Obrigada por terem me proporcionado crescimento acadêmico e também pessoal.

Ao LabNeuro, este grupo que fez com que tudo fosse possível. Obrigada a todos colegas que compartilhei bancada de laboratório, angústias e alegrias. Sara e Marcos, obrigada pelo acolhimento no laboratório, por ter trabalhado com vocês e por tudo que me ensinaram.

Aos colegas, professores e funcionários de PPGCS pelo apoio, incentivo e colaborações.

À minha família, Celso e Sofia minha base, meu alicerce e meu coração sem o apoio e compreensão vocês eu certamente não teria conseguido,

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1-INTRODUÇÃO.....	11
1.1-Mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios	13
1.2-Mecanismo pelo qual anestésicos inalatórios desenvolveriam neurotoxicidade-	15
1.3-Memória e aprendizado -----	17
1.4-Estimulação ambiental -----	23
1.5-Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)-----	24
1.6-Morte celular e sua correlação caspase-----	25
1.7-Sevoflurano na prática clínica pediátrica.....	27
2-JUSTIFICATIVA	30
3-OBJETIVOS.....	31
3.1-Objetivo Geral	31
3.2-Objetivos Específicos	31
4-METODOLOGIA	32
4.1-Modelo experimental	32
4.2-Desenho Experimental.....	32
4.3-Análises Comportamentais	36
4.3.a-Campo Aberto	37
4.3.b-Labirinto aquático de Morris.....	38
4.3.c-Teste de Esquiva Passiva.....	39
4.4-Análise Bioquímica de BDNF	39
4.5-Análise Histológica.....	40

4.5-Análise dos dados	40
4.6-Aspectos Éticos.....	41
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS- -----	42
6-ARTIGO 1 -----	49
7 ARTIGO 2 -----	59
8- CONCLUSÃO -----	79
9-ANEXOS-----	80

RESUMO

O sevoflurano tem sido o agente anestésico inalatório de preferência para realização de anestésias pediátricas. Estudos tem associado o uso dos anestésicos inalatórios com neurodegeneração, perda de memória e dificuldade de aprendizado em ratos jovens e crianças submetidas a anestésias inalatórias. Esse trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros relacionados à memória e ao aprendizado em ratos de 14 dias submetidos à anestesia única por 3 horas com sevoflurano a 3%, com e sem estimulação em ambiente enriquecido. Foram utilizados 60 ratos Wistar com 14 dias distribuídos em 5 grupos 12 animais: controle, controle estimulado, oxigênio, sevoflurano, sevoflurano estimulado discriminados a seguir; os grupos sevoflurano e sevoflurano estimulado no 14º dia de vida foram anestesiados por 3 horas com uma mistura de oxigênio a 2% e sevoflurano a 3%, o grupo oxigênio foi submetido a 3 horas com oxigênio a 2% e os grupos controle não sofreram intervenção. Do 21º dia de vida até o 39º dia os ratos dos grupos estimulados foram submetidos há 1 h d⁻¹ 3 vezes por semana a um labirinto colorido com vários objetos. No 40º dia de vida os ratos foram submetidos a protocolos comportamentais de campo aberto, labirinto aquático de Morris (LAM) e esquiva passiva consecutivamente. Após os testes comportamentais finais realizou-se a eutanásia dos animais para isolamento dos hemisférios cerebrais, extração do hipocampo e córtex pré-frontal e avaliar nos mesmos o valor quantitativo de BDNF,. Para avaliar lesão neuronal, utilizamos mais 30 ratos, distribuídos em 3 grupos, grupo controle, sevoflurano e oxigênio, que foram anestesiados no 14 dia de vida e 3 horas após eutanasiados e tiveram o hipocampo e o pré-frontal isolados e analisados por histologia. Os resultados foram analisados por ANOVA e pós-teste Kruskal Wallis seguido teste de Dunn para múltiplas comparações, com valores de $p < 0,05$ sendo considerado significativo. Nossos resultados mostraram que o grupo sevoflurano teve pior desempenho nos testes de memória espacial e aversiva, enquanto que no grupo sevoflurano estimulado esse desempenho foi igual ou superior aos outros grupos, mostrou também que o grupo sevoflurano foi único grupo a apresentar apoptose tanto em córtex pré-frontal (CPF) como em hipocampo e que o grupo sevoflurano estimulado apresentou significativo aumento de BDNF em CPF e hipocampo após estímulo ambiental. Concluindo podemos observar que a anestesia com sevoflurano gerou neurodegeneração, causando déficit de aprendizagem e memória nos testes comportamentais e alterações histológicas significativas com apoptose e o uso de ambiente enriquecido se mostrou uma boa ferramenta para o tratamento dessas lesões. Desse modo, esses achados podem ser relevantes para anestesia neonatal e pediátrica. **Palavras-chave:** sevoflurano, anestesia inalatória, memória, aprendizado.

ABSTRACT

Sevoflurane inhalational anesthetic agent has been preferably for Pediatric anesthesia. Studies have associated the use of inhaled anesthetics with neurodegeneration, memory loss and difficulty of learning in young rats and children undergoing anesthesia in laboratories. This work aimed to evaluate memory-related parameters and to learning in rats of 14 days undergoing anesthesia only for 3 hours with 3% sevoflurane, with and without stimulation in enriched environment. Wistar rats were used with 14 days distributed in 5 groups: control, control stimulated, oxygen, sevoflurane, sevoflurane stimulated discriminated below; sevoflurane and sevoflurane groups spurred on 14^o day of life were anesthetized for 3 hours with a mixture of oxygen at 2% and 3% sevoflurane, the oxygen group has undergone 3 hours with 2% oxygen and the control groups not been intervention. 21^o's life until the day^o day 39 the rats stimulated groups were submitted for 1:00 d-1 3 times a week to a colorful maze with various objects. In^o 40 day old rats were subjected to behavioral protocols of the open field, Morris water maze (MWM) and Inhibitory avoidance task. After the behavioral tests end the euthanasia of the animals for isolation of cerebral hemispheres, extraction of the hippocampus and prefrontal cortex and evaluate in the same quantitative value of BDNF,. To evaluate neuronal injury, we use more 30 rats, divided into 3 groups, who were anesthetized in the 14 day of life and 3h after decapitated and had the hippocampus and the prefrontal isolated and analyzed by histology. The results were analyzed by ANOVA and Kruskal Wallis test followed by post-test Dunn for multiple comparisons, with values of p 0.05 considered significant. Our results showed that sevoflurane group had worse performance on tests of spatial memory and Inhibitory avoidance task, while in the group sevoflurane stimulated the performance was equal to or superior to other groups, also showed that the sevoflurane group was only group to present apoptosis both in the prefrontal cortex (CPF) as in hippocampus and group sevoflurane stimulated had significant increase in BDNF presented in CPF and hippocampus after environmental stimulus. In conclusion we can see that anesthesia with sevoflurane generated neurodegeneration, causing learning disabilities, worse behavioral tests memory and significant apoptosis on histological results and the use of enriched environment proved to be a good tool for the treatment of these lesions. Thus, these findings may be relevant to neonatal and pediatric anesthesia.

Key words: sevoflurane, inhalation anesthesia., memory, learning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Receptor GABA	14
Figura 2-Mecanismo de ação do anestésico inalatório no receptor GABA	15
Figura 3- Esquema de distribuição da memória no SNC	21
Figura 4- Formação Hipocampal	22
Figura 5- Cascata das Caspases	26
Figura 6- Ratos sendo anestesiados	35
Figura 7- Ratos colocados na gaiola labirinto	36
Figura 8- Campo Aberto	37
Figura 9- Labirinto Aquático Morris	38
Figura 10 – Esquiva Passiva	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA análise de variância

BDNF fator neurotrófico derivado do cérebro

CA corno de Ammon

CPF córtex pré-frontal

CEUA Comitê de ética em Uso de Animal

DNA ácido desoxirribonucleico

ELISA ensaio de imunoabsorção enzimática

FDA Food and Drug Administration

GABA ácido gama aminobutirico

GD giro denteado

LAM labirinto aquático Morris

LTP potencial de longa duração

LTD potencial de longa depressão

NMDA N-metil D-aspartato

ROS espécies reativas de Oxigênio

SNC Sistema Nervoso Central

SEVO sevoflurano

1-INTRODUÇÃO

É inegável o grande avanço científico com o advento da anestesia moderna, não é à toa que a primeira demonstração pública do uso do éter em 1846 no *Boston General Hospital* em Massachusetts é apontada como um dos grandes marcos da medicina moderna (Barash 2009), sendo considerada a maior contribuição americana para medicina (Goodman e Gilman 2015). A partir deste evento mudou-se a face da prática clínica da medicina com grandes avanços na área cirúrgica e diagnóstica. O fato do paciente não sentir dor e não ter efeitos deletérios com o estímulo cirúrgico permitiu a partir deste ponto que as especialidades cirúrgicas se desenvolvessem imensamente, contribuindo para o aumento da qualidade e do índice de sobrevivência dos seres humanos.

Assim sendo, foi-se construindo com o passar do tempo uma especialidade complexa e essencial a medicina, novos conhecimentos da fisiologia, inúmeros avanços na farmacologia e a informatização da anestesia com aparelhos e monitores sofisticados, levando-nos a criar protocolos com aplicações clínicas extremamente eficazes da anestesia, dando a impressão de extrema segurança e eficiência. Apesar da anestesia ser usada clinicamente ao longo de dois séculos, nós ainda nos mantemos intrigados com a complexidade de sua natureza, pelo intrincado mecanismo de ação destes fármacos e os efeitos que causam nas funções cerebrais. (Jevtovic-Todorovic 2017).

Os achados das últimas duas décadas sugerem fortemente que os anestésicos gerais, quando administrados em certa época da maturação do sistema nervoso central (SNC), implicariam em neurodegeneração, prejudicando o desenvolvimento cognitivo em animais e crianças principalmente gerando déficit de memória e aprendizado (Satomoto 2009, Fang 2012, Yu 2013), tornando seu uso não tão inócua e com sequelas importantes ao longo da vida, ao contrário do que se acreditava anteriormente.

Esta associação comentada acima também tem sido verificada quando consideramos os anestésicos inalatórios (Jevtovic- Todorovic 2013). Artigos como o de Jevtovic-Todorovic (2003), que relaciona o aumento da ativação do neurotransmissor GABA e/ou diminuição de excitação de N-metil-D- aspartato com neurodegeneração generalizada no cérebro de ratos em desenvolvimento, e como o de Culley (2004), que relaciona o uso de isoflurano e perda de memória e redução de neurogênese em ratos, geraram questionamentos na classe médica, principalmente entre cirurgiões e anestesiológicos, quanto à segurança da utilização destes

anestésicos nos pacientes pediátricos, dando ao início a uma procura por maiores elucidações ao longo de duas décadas, tanto em pesquisas com modelo animais, para tentar elucidar o mecanismo pelo qual os anestésicos agem causando a lesão no SNC imaturo, como em estudos retrospectivos e de coortes para avaliar a correta proporção e magnitude do problema nos seres humanos.

A partir destas dúvidas, em maio de 2011, a *Food and Drugs Administration* (FDA) chamou a atenção para as preocupações em torno da segurança da anestesia para crianças, lactentes e neonatos, e em junho de 2012 um importante grupo de especialistas em neurofarmacologia anestésica se reuniu na Áustria convidados pela importante revista *British Journal of Anaesthesia* no *BJA Salzburg Seminar on Anaesthetic Neurotoxicity and Neuroplasticity*.

Dada a relevância do assunto, a revista convocou um painel de especialistas para avaliar um conjunto crescente de evidências de estudos em animais e humanos que sugerem que agentes anestésicos podem prejudicar o desenvolvimento cerebral, levando a déficits comportamentais e cognitivos duradouros, resultando numa edição especial *online* da revista sobre o assunto, disponibilizada gratuitamente para maior acesso dos anestesistas mundiais sobre essa importante questão, bem como dados emergentes dos estudos clínicos sugerem que os anestésicos podem ser associados com déficits cognitivos mais tarde em pacientes pediátricos.

Em 2012, Ing e DiMaggio publicaram um estudo no qual crianças expostas ao menos uma vez a anestesia geral venosa ou inalatória para cirurgia ou exame diagnóstico antes dos três anos apresentaram, aos dez anos, mais problemas de raciocínio, de linguagem e de memória, ampliando o leque de profissionais com conhecimento do fato, gerando três grandes estudos epidemiológicos estão sendo realizados no momento no intuito de fornecer maiores esclarecimentos. São eles: o *Pediatric Anesthesia NeuroDevelopment Assesment* (PANDA), um estudo da Universidade de Columbia; o *General Anesthesia Safety* (GAS) um estudo do Hospital Infantil de Boston e o *Mayo Safety in Kids* (MASK), um estudo conduzido pela Clínica Mayo (Twaroski 2015). Até o momento, não há evidências concretas e consenso definitivo sobre os efeitos tóxicos dos anestésicos inalatórios nos cérebros humanos em desenvolvimento, e por isso os médicos clínicos ainda não foram devidamente alertados sobre o assunto pelas agências reguladoras como a FDA.

1.1-Hipóteses sobre mecanismos de ação dos anestésicos inalatórios

Os anestésicos inalatórios são os fármacos mais utilizados para manutenção da anestesia geral (Barash 2009). A popularidade destes medicamentos para estabelecer anestesia é baseada na facilidade de administração, previsibilidade de seus efeitos, baixo custo e extenso treinamento dos anestesistas neste tipo de anestesia (Gang Zhu 2017). Entretanto, seu exato mecanismo de ação permanece incerto.

A maioria das hipóteses atuais sobre o mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios tem como base as suas características físico-químicas e seus efeitos bioquímicos e neurofisiológicos, e propõe a membrana celular, como sítios de ação, tanto na porção lipídica como na porção protéica (Franks and Lieb 1984 e 2004). O mecanismo sináptico e o sítio de ação dos anestésicos gerais ainda são controversos.

A anestesia geral inalatória parece resultar principalmente da facilitação de sistemas inibitórios centrais, mas eventualmente também poderia decorrer da depressão da transmissão sináptica excitatória (Franks and Lieb 1984 e 2004). O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, presente em um terço das sinapses centrais, é encontrado principalmente em inter-neurônios inibitórios locais do neocortex e do allocortex (Miller 2015). As teorias mais recentes propõem as proteínas ou a interface protéica-lipídica como sítio principal de ação dos anestésicos, sem descartar a ação destes sobre domínios hidrofóbicos (Grasshoff 2005). Os anestésicos inalatórios produziram pequenas modificações na conformação protéica que levariam a alterações de função em receptores e/ou canais iônicos (Perouansky 2010).

Nessas últimas décadas foram reunidas evidências consideráveis de que o principal alvo molecular dos anestésicos inalatórios consiste na ativação dos receptores GABA_A (Figura 1), um importante mediador da transmissão sináptica inibitória do SNC bem como da inibição do receptor NMDA, que é o mais comum receptor pós-sináptico do glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC (Campagna 2003, Franks and Lieb 2004). O receptor GABA_A consiste numa organização pentamétrica de cinco proteínas derivadas de polipeptídeos, sendo necessária a combinação de três subunidades principais, α , β e γ , para o desempenho das funções fisiológicas e farmacológicas do receptor, e nele estaria contido um sítio de ligação para os anestésicos voláteis, além de diversos sítios para outros anestésicos

venosos também, como sitio para benzodiazepínicos, propofol e thionembutal além do próprio sitio de ligação do neurotransmissor GABA, e quando ativado esse receptor abre-se os canais de Cl permitindo a entrada de cloro na célula nervosa, hiperpolarizando-a inibindo a formação de um novo potencial de ação, tornando o SNC inativo, conforme figura 2.

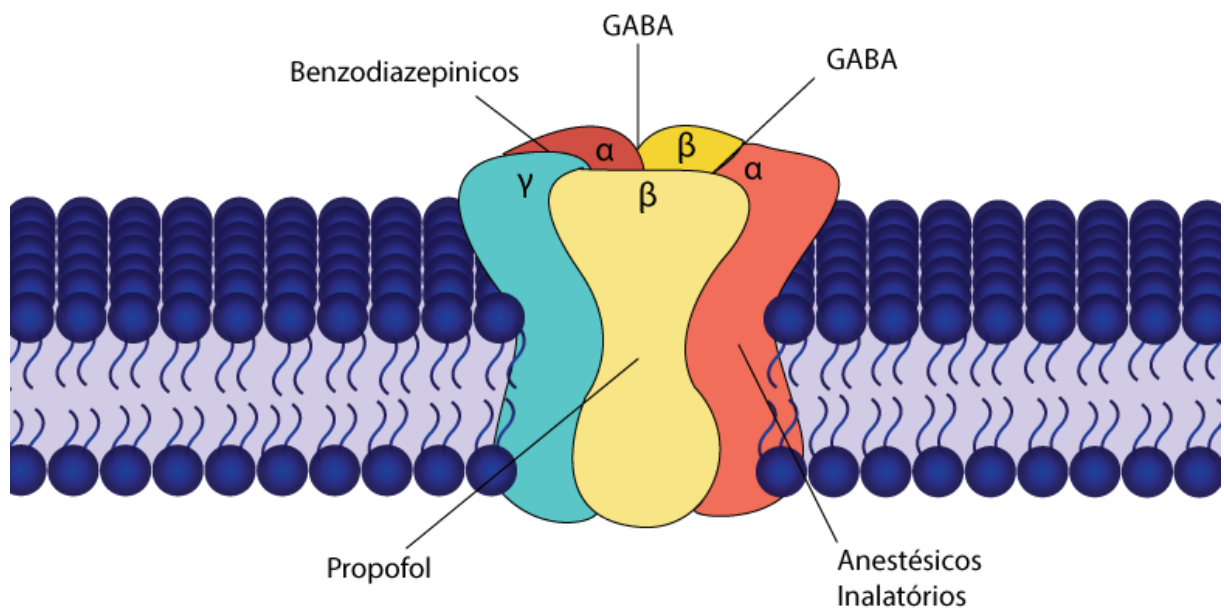


Figura 1- Receptor GABA_A

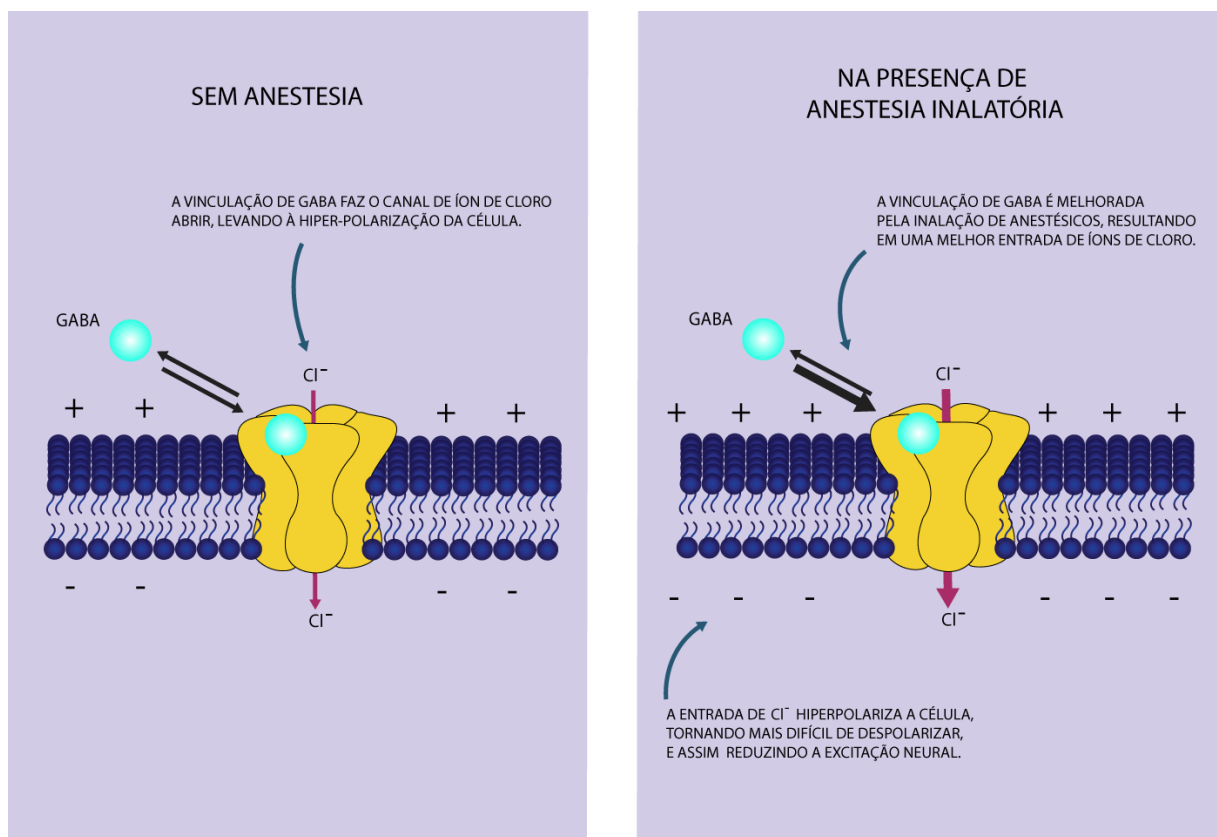


Figura 2-Mecanismo de ação do anestésico inalatório no receptor GABA_A

1.2-Anestésicos inalatórios e neurotoxicidade

Em relação a capacidade dos anestésicos inalatórios causarem neurotoxicidade, ainda é muito incerto o preciso mecanismo de ação pelo qual isto acontece, muitas hipóteses foram estudadas e ainda está em discussão o que se sabe precisamente é que existem dois fatores críticos para o desencadeamento da lesão neuronal: o estado de desenvolvimento cerebral no momento de exposição ao fármaco e a intensidade da exposição anestésica, que inclui tanto a frequência como a intensidade da exposição (Jevtovic-Todorovic 2013). À luz desta informação, modelos animais em estágios iniciais do desenvolvimento cerebral e crianças expostas a altas concentrações anestésicas e repetidas vezes até o terceiro ano de vida estariam mais susceptíveis a desenvolverem lesão no SNC, coincidindo com a etapa de maior desenvolvimento neuronal, isto é, com o período de pico da sinaptogênese (Yon JH 2005).

Um estudo realizado por Zhu (2010) mostrou que ratos jovens expostos ao isoflurano apresentaram déficit de memória, e que o resultado piorava com o envelhecimento destes animais. Esse déficit de memória foi paralelo com a diminuição de células tronco hipocampais e uma persistente redução da neurogênese nessa região. Aparentemente, os fatores

neurotróficos em geral e o fator de crescimento BDNF em particular estariam envolvidos na diminuição da densidade sináptica no hipocampo em desenvolvimento de ratos submetidos as anestésias inalatória e venosa (Head 2009), envolvendo uma diminuição significativa de microtúbulos celulares e alteração no transporte de substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento neuronal.

Sabe-se que anestésicos que estimulem a ativação dos receptores GABA_A nos cérebros em desenvolvimento resultam em uma elevação intracelular de cálcio que pode gerar uma alteração no potencial de membrana mitocondrial, gerando disfunção e morte neuronal (Zhang 2010, Sanchez 2011). Além disso, isoflurano e sevoflurano (Sevo) estão relacionados com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Boscolo 2012), que pioram os danos isquêmicos no SNC e aumentam a peroxidação lipídica neuronal e o desaparecimento neuronal em regiões suscetíveis do SNC como o *subiculum* no sulco do hipocampo (Boscolo 2012).

Foi descrito também que a neurotoxicidade e o baixo desenvolvimento cognitivo em camundongos seriam desencadeados por reação neuroinflamatória em decorrência do uso dos anestésicos gerais, aumentando os níveis de interleucina 6, tendo atenuação da lesão cognitiva com o uso de anti-inflamatórios (Cui 2011). Recentemente temos hipóteses como o envolvimento epigenético com o sevoflurano causando a fosforilação da methyl-CpG proteína 2 no hipocampo, gerando morte celular nessa região que foi revertida com o pré-tratamento a exposição de um antagonista parcial de NMDAR, sugerindo que as alterações epigenéticas induzidas pelo sevoflurano executariam uma função importante na neurotoxicidade (Ham 2015).

Atualmente se estuda o papel do envolvimento dos microRNAs na neurotoxicidade desencadeada após exposição anestésica, que seriam responsáveis por um mecanismo de *feedback* negativo em alvos de expressão gênica de proteção cerebral, gerando com isso neurodegeneração (Twaroski 2015), e também a posição do stress do retículo endoplasmático de animais submetidos à anestesia por sevoflurano e sua implicação nas lesões do hipocampo (Gang Zhu 2017).

Apesar de todos esses achados, o exato mecanismo pelo qual os anestésicos inalatórios causam neurotoxicidade permanecem incertos. Mais estudos se tornam necessários para elucidar suas vias de ação na gênese das lesões, para a partir destes conhecimentos procurar

alternativas para as atenuar ou até mesmo evitar seu aparecimento. O que se sabe é que a exposição anestésica induz a apoptose neuronal tanto no hipocampo como no córtex (Loepke,2008, Shen 2013), afetando a memória tanto nos modelos animais quanto humanos, prejudicando com isto a curva de aprendizagem destes indivíduos, causando transtornos e deficiências no futuro.

1.3-Memória e Aprendizado

A memória pode ser definida como o registro da representação de informações adquiridas através de experiências. Recebemos constantemente estímulos e informações, e apenas uma fração será retida de forma duradoura. A intensidade e a duração da memória são determinadas pela importância da informação, o grau de atenção e a emoção envolvida no momento de aquisição da mesma (Izquierdo 2011).

A aprendizagem pode ser determinada como uma mudança relativamente duradoura do comportamento, de uma forma sistemática, ou não, adquirida pela experiência, pela observação e pela prática motivada (Izquierdo 2011). Tanto a aprendizagem como a memória são propriedades fundamentais do SNC, sendo que ambas estão intimamente relacionadas. Por definição, não há aprendizagem sem memória, e nem memória sem aprendizagem (Izquierdo 2011). O aprendizado refere-se a uma mudança no comportamento que resulta da aquisição de conhecimento acerca do mundo, e a memória é o processo pelo qual esse conhecimento é codificado, armazenado e posteriormente evocado.

Os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu comportamento quando expostos a novas experiências, e a capacidade de aprender e de recordar eventos depende de modificações induzidas no SNC pela percepção desses eventos, e as alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade neuronal (Ramón y Cajal, 1911). O conceito de plasticidade é amplo e consiste na capacidade do SNC em modificar sua estrutura e função em decorrência de experiências anteriores e, além disso, inclui todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem no encéfalo (Holtmaat e Svoboda e, 2009).

A memória pode ser classificada de acordo com o curso temporal de armazenamento em memória de curto prazo (memória de trabalho) e de memória de longo prazo (Kandel 2014). A memória de trabalho tem recebido atenção dos pesquisadores em decorrência de seu impacto na aprendizagem (Wang 2013), é um sistema de capacidade limitada que permite o

armazenamento e a manipulação temporária das informações verbais ou visuais necessárias para as tarefas complexas, como a compreensão, aprendizado, raciocínio e planejamento (Baddeley 2003). Como exemplo a compreensão de uma palavra pronunciada: ao escutar a palavra o som é encaminhado para memória sensorial, as experiências com a língua permitem reconhecer os padrões dos sons, em seguida a palavra é encaminhada para memória de trabalho onde a informação será processada, contudo o processo de reconhecer o significado da palavra é desenvolvido na memória a longo prazo, local de armazenamento das informações.

O processo de resgatar informações da memória de longo prazo e estabelecer associações com as novas informações é o motivo de ser denominada memória de trabalho (Baddeley 2003). O funcionamento inadequado de um ou mais componentes da memória de trabalho está associado com as dificuldades de aprendizagem e ao baixo rendimento escolar (Uehara 2010). Crianças que enfrentam dificuldades de aprendizagem podem apresentar limitações na capacidade de armazenar e ou organizar informações de forma adequada e precisa para execução de tarefas acadêmicas e ou motoras (Uehara 2010). A associação entre memória de trabalho e a capacidade do progresso acadêmico nas áreas de linguagem e matemática é bem estabelecida (Gathercole 2004, Schuchardt 2011)

A memória de longo prazo pode ser classificada como explícita que se apresenta nas formas episódicas (que representa experiências pessoais) ou semânticas (que representa conhecimentos e fatos gerais) e a implícita, que inclui formas de *priming* conceitual e de percepção, assim como o aprendizado de hábito e habilidades motoras e de percepção (Kandel 2014).

Como é um processo dinâmico, a memória explícita pode ser dividida em 4 etapas distintas: codificação, consolidação, armazenamento e evocação. As etapas estão descritas abaixo.

A codificação da informação ocorre a partir da exposição a uma experiência. Esse processo se produz de forma rápida e consta essencialmente da associação de estímulos e respostas entre si. É o processo pelo qual novas informações são observadas e conectadas com informações preexistentes.

Este processo associativo ou não, inicialmente é intenso e se manifesta no fato de ser a memória de uma experiência recém-vivida, que geralmente é fiel e precisa ao estímulo que conduziu sua criação. Com o passar do tempo, essa intensidade e nitidez podem sofrer um

decréscimo (Cammarota 1997). Não recordamos tudo e não temos todos os detalhes do evento, só guardamos aquilo que, por determinadas circunstâncias do contexto ou do indivíduo, são determinantes para nos fazer recordar do acontecido, para a memória persistir e ser bem lembrada, a informação que chega deve ser codificada de forma profunda (Craik e Lockhart,1990). A codificação da memória também é mais forte quando se está mais motivado a lembrar (Kandel 2014).

A consolidação é o processo de filtração e fixação progressiva da informação adquirida. Esta fase é o período mais lábil e suscetível a modificações da memória, e envolve a expressão de genes e que produzem alterações estruturais nas sinapses (Mcgaugh 2000).

O armazenamento refere-se aos mecanismos e sítios neurais que permitem a retenção da memória ao longo do tempo. Após consolidadas, as memórias ficam depositadas no encéfalo em locais como córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala e com o passar do tempo ocorre o armazenamento da informação (Mcgaugh 2000).

Por último, temos o processo de evocação da memória, que se dá quando observamos mudança do comportamento do animal devido ao processo de reconhecimento de experiência similar, ficando claro que aquela memória estava armazenada em algum local do SNC do animal (Vianna et al 2000). Este é o processo pelo qual a informação armazenada é evocada, e envolve trazer novamente a mente diferentes tipos de informação, armazenados em diferentes lugares do encéfalo (Kandel 2014).

A consequência das três primeiras etapas envolvidas na memória seria a aprendizagem, que se manifesta por um novo comportamento, ou a modificação de um pré-existente a cada vez que a memória for evocada. A maioria dos pesquisadores restringe o processo de aprendizado à aquisição de novos conhecimentos, enquanto que a memória seria a retenção e a codificação dos mesmos (Squire e Kandel 2000; Redolar-Ripoll, 2002).

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade cerebral, fenômeno característico do SNC (Ramón y Cajal 1911). O conceito é amplo e consiste na capacidade do SNC em modificar sua estrutura e função em decorrência de experiências anteriores e, além disso, inclui todas as formas de reorganizações duradouras que ocorrem do cérebro (Holtmaat, 2009). Essas reorganizações são observadas sob diferentes aspectos: (i) fisiológicos: envolvem as propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios; (ii) morfológicos: determinam a forma e a estrutura neuronal e glial; (iii) bioquímicas: relacionam

a avaliação das atividades enzimáticas, tradução de sinais e mudança de expressão gênica. Essas adaptações e reorganizações promovem alterações na eficiência sináptica e podem aumentar ou diminuir a transmissão de impulsos, com a conseqüente modulação do comportamento (McMahon e Barrionuevo 2002).

A ideia que a memória está baseada em modificações sinápticas remete a trabalhos de Freud (1895), Pavlov (1926), Hebb (1949) e Ramón y Cajal (1952). Nos últimos anos, essa ideia foi reforçada pelo estudo de fenômenos de plasticidade neuronal, entre eles o potencial de longa duração (*long term potentiation*, LTP) e a depressão de longa duração (*long term depression*, LTD) (Bliss e Lomo 1973; Bliss e Collingridge, 1993).

Os fenômenos de LTP e LTD foram considerados como possíveis bases dos processos de aprendizagem e memória. O mecanismo básico da formação do potencial de longa duração e o da memória declarativa de longa duração é constituído por fenômenos que determinam a alteração duradoura da função das sinapses, ficando assim fortalecida a hipótese que os mecanismos são essencialmente parecidos (Izquierdo 2011).

Denomina-se plasticidade o conjunto de processos fisiológicos, em nível celular e molecular, que explicam a capacidade das células nervosas de mudarem suas respostas a determinados estímulos como função da experiência. Eletrofisiologicamente, a plasticidade se manifesta como LTP ou LTD, e comportamentalmente, através da aquisição de um aprendizado e da formação de uma memória.

No que se refere à duração de retenção da memória, sabe-se que o armazenamento da memória de longa duração em nível celular é associado com expressões gênicas, síntese de proteínas e novas conexões sinápticas. Inibidores de síntese de proteínas podem bloquear a formação de memórias de longa duração, sem todavia afetar as memórias de curta duração (Izquierdo 2011; Kandel 2014).

A busca pela localização espacial da memória existe há mais de um século, e atualmente sabe-se que diversas estruturas encefálicas estão envolvidas com as diferentes etapas (aquisição, consolidação e evocação) da memória, com destaque para o hipocampo, a amígdala, o septo medial, o córtex temporal, o córtex pré-frontal, o estriado e o cerebelo (Lent, 2002).

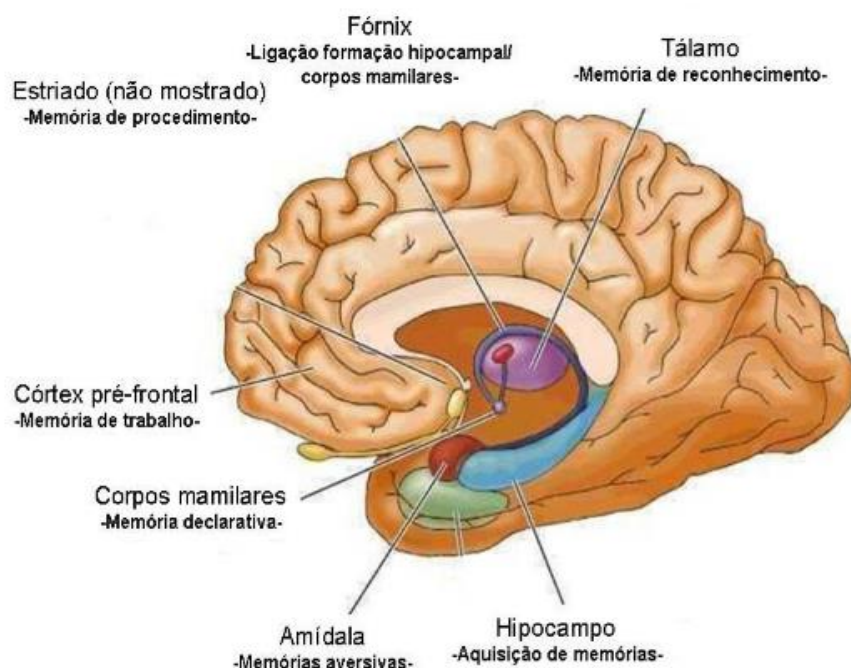


Figura 3- Esquema de distribuição da memória no SNC

A Figura 3 traz a anatomia de regiões morfofuncional relacionada a aspectos compartamentais. Nesta sequência de eventos destacamos que o hipocampo exerce um papel crucial nos processos de aprendizado e memória, principalmente na etapa de consolidação das memórias do tipo explícita ou declarativa em humanos e espacial em roedores (Wang et al 2006), enquanto que o córtex pré-frontal e o local principal da memória de trabalho e a amígdala está relacionada com a memória aversiva.

No clássico caso clínico de Henry Maisson (o paciente H.M.), descrito por Milner e Scoville na década de 50, observou-se que, mesmo com a retirada do lobo temporal medial, o paciente permaneceu com sua memória de curto prazo e sua memória para eventos passados, o que efetivamente ficou prejudicado é que o mesmo não possuía mais a capacidade de transformar as novas informações da memória de trabalho em memórias de longa duração, evidenciando o papel fundamental do lobo temporal, em especial do hipocampo e da amígdala no processo de aquisição e consolidação da memória.

O hipocampo uma região do lobo temporal do cérebro, antigamente chamada de corno de Ammom (CA), é uma região alongada e curva situada no assoalho do corno inferior do ventrículo lateral, acima do giro para-hipocampal (Angelo Machado 2014). É composto por

duas áreas principais: corno de Ammon, subdividido em 4 campos (CA1, CA2, CA3, CA4), e o giro denteado (GD) (Figura 4). O termo “formação hipocampal” inclui o GD, o subículo, o hipocampo propriamente dito, além do córtex entorrinal, perirrinal e paraipocampal (Angelo Machado 2014). Um aspecto que confere extrema importância à região do hipocampo é o fato de ser a única área do SNC a que foram identificadas células tronco neurais em mamíferos adultos além da zona subventricular e dos ventrículos laterais (Zhao 2008).

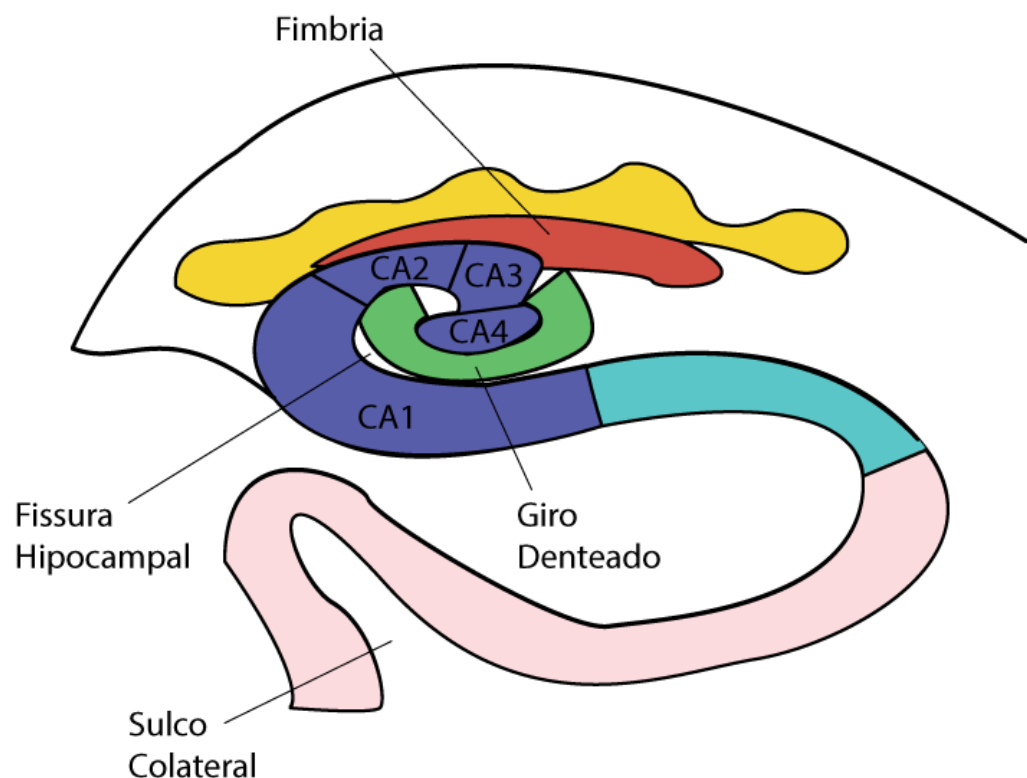


Figura 4 - Formação Hipocampal

Dentre as formas de memória que utilizam a sequência de processos hipocampais, há 3 que são muito utilizadas nos modelos animais:

- 1- As diversas variedades de medo condicionado, em que os animais são treinados pela exposição reiterada e prolongada a um estímulo condicionado sensorial determinado (um tom, uma luz) ou indeterminado (um ambiente);

2- A família de aprendizagens espaciais em que o estímulo condicionado e um conjunto de estímulos visuais são colocados à distância do animal, nos quais a resposta instrumental consiste em percorrer certa distância na água (labirinto de Morris) ou em um labirinto de braços;

3- A memória de reconhecimento, quer de objetos, quer de outros animais da mesma espécie.

O principal modulador da memória é o conjunto de sistemas inibidores GABAérgicos (associados ao ácido gama-aminobutírico, GABA) presentes na região CA1 do hipocampo, no córtex entorrinal, parietal, cingulado anterior, cingulado posterior e córtex pré-frontal anterolateral e corticomediais. (Izquierdo 2011). Agindo em cada um desses lugares, o GABA, principal neurotransmissor inibitório do cérebro, inibe todos os processos envolvidos na formação ou na evocação dos diversos tipos de memória por uma ação sináptica direta sobre os receptores GABA_A. A inibição GABAérgica é instantânea porque é mediada por um receptor ionotrópico, com efeito hiperpolarizador sobre as células devido a entrada rápida de cloro (Izquierdo 2011). Se suficientemente intensa, a inibição gerada pelo sistema GABAérgico efetivamente suprime toda e qualquer intervenção da transmissão glutamatérgica sobre a formação e evocação da memória.

1.4-Estimulação Ambiental

Em estudos de memória e aprendizado, uma ferramenta comumente utilizada é a estimulação ambiental. Esta técnica em que se submete animais de laboratório a ambientes enriquecidos, com objetos com os quais possam interagir, praticar exercícios e efetuar explorações foi introduzida por Edward Bennett e seus colaboradores em Berkeley, na década de 1960 (Krech, 1964). A famosa roda giratória dos hamsters de estimulação teve sua origem nessa técnica.

Deste tratamento foram observados vários efeitos orgânicos: desde o aumento do número de sinapses no córtex cerebral e no hipocampo, até aumento real do número de células nervosas no GD de camundongos estimulados durante os primeiros 25 dias de vida., preconiza-se a aplicação de estímulos semelhantes em humanos, para exercitar o cérebro e estimular a neurogênese em regiões que possam ter sido comprometidas por lesões anteriores (Jensen 2009).

O uso de ambientes enriquecidos, embora não tenha aumentado a capacidade de memória ou capacidade mental em crianças hígdas, revelou um enorme poder no tratamento de crianças ou adolescentes com lesões cerebrais. A estimulação constante, paciente e acompanhada de carinho tem conseguido recuperar de forma notável déficits gravíssimos (Jensen 2006). Há casos relatados de crianças que tratadas com estímulos sensoriais repetidos em ambientes enriquecidos conseguiram, apesar das lesões cerebrais, desempenho escolar igual ou superior à média (Izquierdo 2011). Sendo a explicação possível para as melhoras a estimulação do crescimento e de ramificações de axônios e dendritos, e a formação de novas sinapses substituindo as desaparecidas via aumento de BDNF (Netto 2010; Izquierdo 2011; Bekinschtein 2011).

Tem-se demonstrado ao longo do tempo que o enriquecimento ambiental com exercícios físicos e com desafios cognitivos podem regular a atividade neurogênica no GD do hipocampo mesmo na vida adulta (Aimone, 2011), o ambiente enriquecido produz uma grande variedade de alterações morfológicas e funcionais no hipocampo e neocórtex (Lambert 2005) aumenta as ramificações dentriticas, os contatos sinápticos, neurotransmissão e o tamanho dos neurônios na área do neocortex, além de favorecer a potenciais de longo prazo (LPT) no hipocampo, a neurogenese, os níveis de neurotrofinas e o gene de expressão CREB (Lambert 2005).

Há um marcado aumento do BDNF frente ao exercício, à interação social e ao ambiente complexo presente nos ambientes enriquecidos com um aumento das proteínas sinápticas (sinapsina I e Sinaptofisina) que tem sua repostas controladas pelo BDNF (Bekinschtein 2011), essas evidências sugerem que o BDNF possa ser um marcador biológico dos efeitos do enriquecimento ambiental.

1.5-Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é considerado a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzida principalmente pelas células da glia e pelos núcleos neuronais, sendo expresso em múltiplos tipos celulares do SNC, principalmente é abundante especialmente no hipocampo, córtex cerebral, estriado e amígdala, promovendo ações de sobrevivência das células destas regiões e neurogênese (Ghosh 1994; Saha 2006), desempenhando um papel fundamental na plasticidade neuronal e memória, mediando os principais processos dependentes de estímulo externo, isto é, aprendizado e memória (Frey 2006)

O BDNF é uma pequena proteína e membro da família de neurotrofinas, encontrado no sistema nervoso, onde desempenha papel importante no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso periférico (SNP) e central (SNC), na plasticidade, sobrevivência e proliferação neuronal (Yulug et al., 2009). No encéfalo é abundante especialmente no hipocampo, córtex cerebral, estriado e amígdala, estruturas que estão envolvidas com memória e aprendizagem

O BDNF exerce seus efeitos por meio de receptores tirosina quinase (TrkB), aos quais se liga com grande afinidade, resultando no recrutamento de proteínas que ativam duas vias de sinalização intracelular. Uma destas vias ativa a proteína quinase-1 dependente de fosfatidilinositol-3 (PI-3K), e a proteína quinase B (AKT), que fosforilam e desativam agentes pró-apoptóticos (Santos et al.,2010). O outro caminho envolve a TrkB, que induz a ativação de proteínas intracelulares como, Ras, Raf, MEKs e sinais extracelulares regulados pelas quinases (ERKs) os quais ativam um ou mais fatores de transcrição que irão induzir a transcrição de BDNF, além de regular a expressão de genes envolvidos na formação da LTP (potenciação de longa duração), na modulação da secreção de neurotransmissores (como a serotonina), na plasticidade sináptica, na resistência ao estresse e na sobrevivência celular. Essa atividade é dependente da ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes voltagem dependente de cálcio (Santos et al.,2010). Assim a ativação destas cascatas modulam a proliferação, sobrevivência e manutenção do sistema neuronal, sugerindo que o aumento de BDNF leva a melhoras funcionais como descrito em estudos de ambientes enriquecidos (Santos et al 2010; Bekinschtein 2011),

1.6-Morte celular e sua correlação com as caspases

A partir do momento que ocorre uma lesão intensa numa célula e essa pode não se recuperar, e entrar em um processo irreversível que leva à destruição celular. Dependendo do estímulo lesional pode ocorrer morte celular por necrose ou apoptose que são diferentes morfologicamente; nos seus mecanismos e em sua função na fisiologia e na doença (Yakovlev e Faden 2004). Enquanto que a necrose é sempre um processo patológico com perda de integridade de membrana plasmática, floculação de cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas, a apoptose envolve alterações de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos com ou sem desintegração de organelas e pode ser associada à lesão celular ou com processos fisiológicos de manutenção da homeostase tecidual.

A apoptose pode ser desencadeada por uma série de agressões que iniciam uma cascata bioquímica de sinalização onde temos as caspases como componentes principais, as caspases podem ser iniciadoras (8 e 9), que dão início aos eventos da cascata, ou efetoras (3, 6 e 7) que clivam os elementos intra-celulares (DNA, cromatina, citoesqueleto) (Yakovlev e Faden 2004), e está dividida em via extrínseca (sinal extra-celular se liga a receptores específicos) e via intrínseca (sinais vindos do intra-celular) da apoptose.

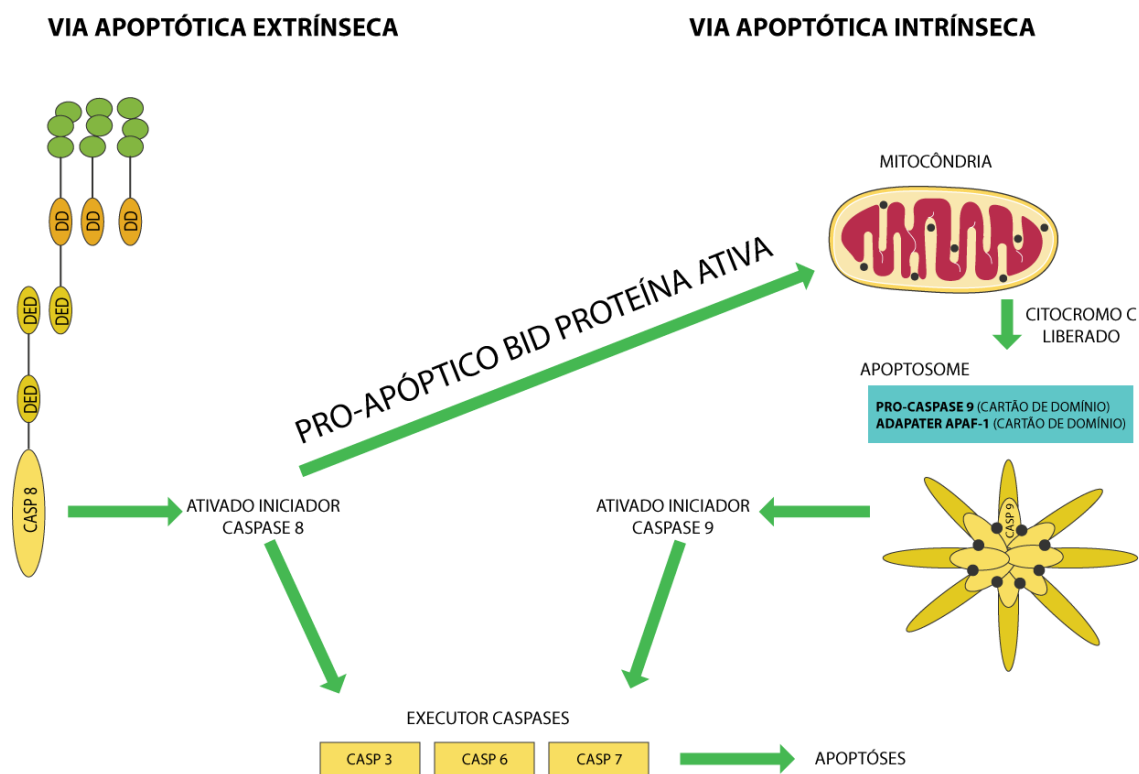


Figura 5- Cascata das Caspases: via intrínseca e via extrínseca

Caspases são enzimas, cisteíno proteases, que possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas (Anazetti 2007), essa especificidade é determinada por 4 resíduos amino-terminais no sítio de clivagem (Hengartner 2000). Elas existem como pró-enzimas inativas que depois sofrem ativação durante o processo apoptótico. A ativação das caspases primeiramente as iniciadoras e depois as efetoras promovem o desmonte da membrana nuclear e do arcabouço das lâminas, hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmática. (Anazetti 2007). Estas alterações são comuns em todas as células em apoptose

explícita, independente do agente indutor do processo. Isto significa que a ação destas caspases representa uma via final comum, onde as caspases efetoras C3, C6 e C7 sempre se fazem presentes, tornando-as bons marcadores de apoptose celular (Thornberry, 1998; Hengartner 2000). Os mecanismos bioquímicos da apoptose compreendem a clivagem de proteínas por hidrólise que envolve as caspases, que normalmente acham-se contidas nas células sob forma de pró-enzimas. Essas enzimas não só hidrolizam proteínas mas também ativam DNases que degradam DNA celular. Mudanças nas membranas plasmáticas das células apoptóticas que passam a expressar determinadas substâncias químicas (fosfatidilserina), as tornam alvo de fagocitose pelos macrófagos, sem a liberação de substâncias que produziriam inflamação local e portanto maior lesão tecidual como no caso de necrose (Hengartner 2000).

1.7- Sevoflurano na prática clínica pediátrica e neurotoxicidade dos anestésicos gerais em estudos clínicos

Em 1972, o sevoflurano foi descrito pela primeira vez (Wallin 1975), tendo seu uso aprovado apenas em 1990 no Japão após extensivos testes clínicos. Dentre as propriedades deste fármaco, incluem-se pequenos efeitos colaterais sobre o sistema cardiorrespiratório com repercussão sistêmica mínima, extensa proteção ao SNC (Barash 2009, Miller 2015) e ainda efeito hepatotóxico ausente (Soubhia 2010)

Atualmente, o sevoflurano tem sido o agente anestésico inalatório mais usado em humanos no mundo (Cesarovic 2010) e o de preferência para realização de anestésias pediátricas devido ao fato de ter o mínimo odor, nenhuma pungência, ser um broncodilatador potente e com baixo coeficiente de partição sangue:gás, isto é, apresenta indução e recuperação da anestesia rápida e suave (Barash 2009, Miller 2015). Estes atributos fazem do sevoflurano um excelente candidato para administração por máscara facial na indução de anestesia em crianças e posterior manutenção da mesma (Barash 2009, Miller 2015).

Um grande estudo clínico retrospectivo com mais de 5000 crianças desenvolvido em 2009 no programa de assistência médica de New York por DiMaggio e colaboradores mostrou que crianças anestesiadas até 3 anos de vida tinham o dobro do diagnóstico de problemas de aprendizagem e linguagem que as que não haviam sido expostas a este procedimento (DiMaggio 2009). Este estudo foi o início de grandes questionamentos sobre a segurança de anestesia em crianças com menos de 3 anos de idade e englobava tanto anestésicos venosos

como inalatórios. Em 2010 outro estudo retrospectivo conduzido por Wilder e colaboradores avaliou as fichas medicas e educacionais de mais de 5000 crianças e constatou diferença significativa na aprendizagem nas crianças submetidas a mais de 1 procedimento anestésico com sevoflurano antes dos 4 anos de idade (Wilder 2010).

Vários estudos retrospectivos foram feitos após estes primeiros serem publicados nos quais foram encontradas evidências entre anestesia nos primeiros anos de vida e posteriores distúrbios de aprendizagem na idade escolar principalmente na pré-adolescência (Flick 2011, Ing 2012, Sprung 2012). Entretanto, outros estudos não encontraram essa conexão como no Bartels em 2009 com gêmeos que apesar de evidenciar diferença significativa de aprendizagem em gêmeos expostos a anestesia de gêmeos não expostos a anestesia, não encontrou diferença entre os gêmeos quando apenas 1 era exposto à anestesia. Sugerindo que outros fatores poderiam ser os responsáveis pela deficiência de aprendizagem que não a exposição anestésica.

Ainda em 2009 outro estudo retrospectivo de Kalkman revelou intenso déficit de aprendizagem em crianças submetidas a cirurgia urológica antes dos 2 anos de vida. Entretanto devido ao pequeno número de pacientes envolvidos no estudo tornou impossível obter conclusões definitivas. Em 2011 Hansen e colaboradores tiveram acesso ao desempenho acadêmico de 2689 crianças dinamarquesas que tinham sido submetidas ao procedimento de herniorrafia inguinal na infância, bem como usaram um grupo controle de 14575 crianças. Inicialmente acharam que as crianças que haviam sido expostas tinham um desempenho acadêmico inferior as crianças controle, mas uma vez que os foram controladas as variáveis de confusão não houve mais diferença estatística entre os grupos. Recentemente um estudo de 2015 de Backeljauwet all usando RM em crianças de 5 a 18 anos que tinham sido submetidas a anestésias antes dos 4 anos de idade mostrou diminuição da densidade da massa cinzenta no córtex e cerebelo como também níveis escore de inteligência menores na submetidas a anestesia em comparação com grupo controle.

Três grandes estudos epidemiológicos de coorte estão sendo realizados no momento no intuito de fornecer maiores esclarecimentos sobre os efeitos tóxicos dos anestésicos inalatórios nos cérebros humanos em desenvolvimento. São eles: o *Pediatric Anesthesia NeuroDevelopment Assesment* (PANDA) considerado o mais robusto, que avalia vários testes psicométricos, de QI, de memória, de habilidades de linguagem e motoras em crianças que realizaram herniorrafias até 3 anos de idade com seus irmãos de idade similar não expostos à anestesia, por enquanto aos 6 anos não apresentam diferenças entre os QIs dos irmãos que serão

avaliados também aos 8 e 15 anos de vida, tendo em consideração que o tempo anestésico foi em média inferior há 80 minutos de exposição; por um estudo da Universidade de Columbia; o *General Anesthesia Safety* (GAS) um estudo do Hospital Infantil de Boston que compara o neurodesenvolvimento de crianças expostas a anestesia geral com sevoflurano com crianças expostas a anestesia espinal com procedimento em média de 60 minutos com resultados esperados para 2018 e o Mayo Safety in Kids (MASK) e um estudo conduzido pela Clínica Mayo que pretende comparar desenvolvimento neurocognitivo de crianças expostas a anestesia com sevoflurano com crianças não expostas, ainda também sem resultados definitivos. (Twaroski 2015).

Apesar de todos os estudos e dos esforços das organizações envolvidas na tentativa de elucidar e relacionar paralelos entre os resultados dos estudos experimentais e estudos clínicos os efeitos da anestesia no cérebro humano em desenvolvimento permanecem incertos. Os dados humanos obtidos nos estudos retrospectivos são ainda insuficientes para corroborar ou refutar os estudos laboratoriais e os estudos de coorte ainda não apresentaram resultados definitivos.

Sendo assim é imperativo cada vez mais que tanto estudos laboratoriais como estudos clínicos sejam feitos para tentar elucidar essa intrigante questão com um conhecimento profundo dos anestésicos inalatórios, seus mecanismos de ação e sua influência no déficit de memória e aprendizado após seu uso em modelos animais e crianças para elucidar suas vias de ação na gênese das lesões, para a partir destes conhecimentos procurar alternativas para as atenuar ou até mesmo evitar seu aparecimento.

Este estudo visa avaliar as funções de memória e cognição bem como neurogênese e apoptose em ratos jovens de 14 dias submetidos à anestesia única por 3 horas com sevoflurano a 3%, bem como se ambientes enriquecidos podem alterar o desfecho das lesões se estas estiverem presentes.

2-JUSTIFICATIVA

Os estudos epidemiológicos ainda não foram capazes até agora de determinar qual seria o anestésico geral mais seguro para a população pediátrica quanto as lesões no SNC (Twaroski 2015). Levando-se em conta que somente nos Estados Unidos são realizadas mais de 4 milhões de cirurgias pediátricas anualmente, a importância clínica destes achados requer nossa atenção, e clama por um entendimento melhor dos mecanismos responsáveis por esses eventos (Jevtrovic-Todorovic 2017) por isso um conhecimento dos anestésicos inalatórios, quanto seu papel na neurodegeneração após seu uso em crianças é significativo.

A busca de elucidações quanto aos déficits de aprendizado e de memória que podem advir de uma única exposição em crianças de até 3 anos à anestesia geral, principalmente com o anestésico inalatório sevoflurano por ser o mais amplamente utilizado em anestesia pediátrica, bem como saber se alguma intervenção pode mudar esse prognóstico, se faz necessária, tendo em vista, que o bom desenvolvimento neurocognitivo é fundamental para estabelecer a formação de um indivíduo sadio, integrado ao seu meio e plenamente feliz.

3-OBJETIVOS

3.1-OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do sevoflurano sobre a memória e cognição em ratos jovens submetidos a anestesia única

3.2-OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar uma revisão sobre o assunto na literatura

Avaliar com testes comportamentais ratos jovens submetidos a anestesia única por 3 horas com sevoflurano 3% 40 dias após a exposição.

Avaliar a quantidade do fator neurotrófico derivado do cérebro BDNF em ratos jovens submetidos a anestesia única por 3 horas com sevoflurano 3% 48 dias após a exposição.

Analisar histologia cerebral em ratos jovens submetidos a anestesia única por 3 horas com sevoflurano 3% 18 horas após exposição

Observar se os animais submetidos a ambientes enriquecidos tem alguma resposta diferente nos testes comportamentais a ao BDNF

4-METODOLOGIA

4.1-MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar jovens de ambos os sexos com 14 dias de vida. Esta idade está relacionada a um sistema nervoso central imaturo compatível a uma criança de 3 anos(ZHU, 2010).

As matrizes (2 machos e 4 fêmeas, foram provenientes do biotério central da UFRGS e mantidos no Biotério de Roedores Convencionais do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) por 1 semana e logo após colocados para cruzamento, em torno de 20 dias nasceram as ninhadas. Os animais ficaram agrupados em gaiolas de polipropileno com sua ninhada e progenitora. No 14º dia de vida realizou-se a exposição ao fármaco, com os ratos jovens pesando cerca de 20 g. No 21º dia de vida, depois as ninhadas foram desmamadas e separadas da mãe e mantido em gaiolas por ninhada e sexo.

Foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7 h), com condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$). Todos os animais tiveram livre acesso a comida e água.

4.2-DESENHO EXPERIMENTAL

Para o primeiro experimento, foram utilizados 60 animais, distribuídos em 5 grupos: Grupo Controle (n=12), grupo controle com estímulo (n=12), Grupo Oxigênio (n=12), Grupo Sevoflurano (n=12), Grupo Sevoflurano com estímulo (n=12).

Grupo controle- número de 12 indivíduos sem tratamento algum que no 40º dia de vida foram submetidos à realização dos testes comportamentais; Grupo controle com estímulo- número de 12 indivíduos sem tratamento algum, que do 21º dia ao 39º dia de vida foram estimulados com a colocação em gaiola labirinto por 1 hora por dia 3 vezes por semana para posterior avaliação da plasticidade neuronal e no 40º dia de vida foram submetidos a realização dos testes comportamentais; Grupo oxigênio - número de 12 indivíduos que foram ao 14º dia de vida colocados em câmara de vidro acoplada ao aparelho de anestesia com liberação contínua de oxigênio 2 l/mim por 3 horas e depois devolvidos a ninhada e no 40º dia de vida foram submetidos a realização dos testes comportamentais; Grupo sevoflurano- número de 12 indivíduos que foram ao 14º dia de vida colocados em câmara de vidro acoplada ao aparelho de

anestesia com liberação contínua de oxigênio 2 l/mim e sevoflurano 3 % por 3 horas e depois foram devolvidos a ninhada e no 40º dia de vida foram submetidos a realização dos testes comportamentais; Grupo sevoflurano com estímulo- número de 12 indivíduos que foram ao 14º dia de vida colocados em câmara de vidro acoplada ao aparelho de anestesia com liberação contínua de oxigênio 2 l/mim e sevoflurano 3 % por 3 horas e depois devolvidos a ninhada. do 21º dia ao 39º dia de vida foram estimulados com a colocação em gaiola labirinto por 1 hora por dia 3 vezes por semana para posterior avaliação da plasticidade neuronal e no 40º dia de vida foram submetidos a realização dos testes comportamentais.

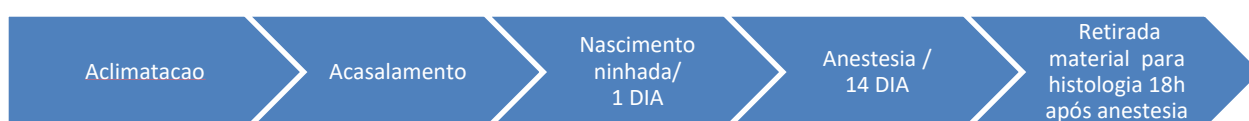
A temperatura da sala cirúrgica durante o período do experimento foi mantida em 36 graus para evitar hipotermia durante a exposição aos gases inalatórios e oxigênio. O aparelho de anestesia utilizado foi o Omeda 200 com vaporizador calibrado Tec 7 de sevoflurano, conforme figura 6. Os animais aleatoriamente foram marcados para identificação do grupo experimental e ninhada a qual pertenciam. Após esse período de 3 horas, o animal foi devolvido a ninhada com a mãe. No 21º dia de vida, depois as ninhadas foram desmamadas e separadas da mãe e mantido em gaiolas por ninhada e sexo. Os grupos estimulados aqui foram do 21º dia ao 39º dia de vida foram colocados em gaiola labirinto por 1 hora por dia 3 vezes por semana, conforme figura 7, e no 40º dia de vida todos os grupos foram submetidos a realização dos testes comportamentais. Após os testes comportamentais finais realizou-se a eutanásia dos animais para isolamento dos hemisférios cerebrais, extração do hipocampo e córtex pré-frontal e avaliação posterior, nos mesmos, do valor do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)



No segundo experimento, foram utilizados 30 animais separados em 3 grupos: grupo controle (n=10); grupo oxigênio (n=10) e grupo sevoflurano (n=10).

Grupo controle- número de 10 indivíduos sem tratamento algum que no 14 dia de vida foram eutanasiados para isolamento dos hemisférios cerebrais e extração de córtex pré-frontal e hipocampo para comparação de lesão histológica cerebral com os indivíduos submetidos à exposição anestésica; Grupo oxigênio - número de 10 indivíduos que foram ao 14º dia de vida colocados em câmara de vidro acoplada ao aparelho de anestesia com liberação contínua de

oxigênio 2 l/mim por 3 horas e após 18 horas foram eutanasiados para isolamento dos hemisférios cerebrais, extração córtex pré-frontal e hipocampo para determinação histológica de lesão cerebral após exposição do oxigênio, o veículo de difusão dos anestésicos inalatórios; Grupo sevoflurano- número de 10 indivíduos que foram ao 14º dia de vida colocados em câmara de vidro acoplada ao aparelho de anestesia com liberação contínua de oxigênio 2 l/mim e sevoflurano 3 % por 3 horas e após 18 horas foram eutanasiados para isolamento dos hemisférios cerebrais e extração de córtex pré-frontal e hipocampo para determinação histológica de lesão cerebral após exposição ao anestésico.



DESENHO EXPERIMENTAL

Experimento	Grupos	Tratamento	Análises	Outras Análises
1 (n = 12 por grupo)	<ul style="list-style-type: none"> Controle Controle + estímulo Oxigênio Sevoflurano Sevoflurano + estímulo 	<ul style="list-style-type: none"> 14º dia de vida: oxigênio ou sevoflurano 3% por 3 horas; Enriquecimento ambiental 	<ul style="list-style-type: none"> avaliação da plasticidade neuronal realização dos testes comportamentais 	<ul style="list-style-type: none"> Avaliação da reversão dos prejuízos cognitivos através da estimulação ambiental
2 (n = 10 por grupo)	<ul style="list-style-type: none"> Controle Oxigênio Sevoflurano 	<ul style="list-style-type: none"> 14º dia de vida: oxigênio ou sevoflurano 3% por 3 horas; 	<ul style="list-style-type: none"> isolamento de córtex pré-frontal e hipocampo para comparação histológica de lesão cerebral 	



Figura 6- Ratos sendo anestesiados por 3 h com sevoflurano 3% no LabNeuro no 14º dia de vida



Figura 7- Ratos colocados na gaiola labirinto 3 vezes por semana para enriquecimento ambiental

4.3-ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

No 40º dia de vida todos os grupos foram submetidos a testes comportamentais de campo aberto, labirinto aquático de Morris e Teste de esquiva passiva, nessa ordem, que são estudos experimentais para avaliação de estresse, de aprendizagem por condicionamento e estudos da aprendizagem como mediador das respostas emocionais de medo. A ordem de realização dos estudos experimentais seguiu o preceito mundialmente aceito que se inicia com testes menos agressivos ao animal e se termina os experimentos com os mais intensos para não haver comprometimento das respostas comportamentais.

4.3.a-Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto (Open Field) utiliza uma caixa retangular, com assoalho dividido em 12 quadrados iguais e a parede frontal feita de vidro que tem como protocolo observar a taxa de deambulação e taxa de excreção de fezes e urina em sessões de 5 minutos, os dados foram obtidos através de um sistema de vídeo (Smart 3.0, Harvard Apparatus) figura 8. No teste de habituação ao campo aberto foram avaliadas a atividade motora exploratória a fim de avaliar se o experimento não causou efeito na atividade motora dos animais anestesiados, os animais foram colocados sob a parte posterior esquerda da área quadrada da caixa para explorar a arena por 5 minutos, durante esse período a distância total percorrida foi registrada e analisada através do programa de filmagem. e o nível de estresse dos animais foi avaliado de acordo com a quantidade de fezes e urina e modo deambulatorio, em relação ao tempo de permanência no centro da caixa que demonstra nível de estresse.

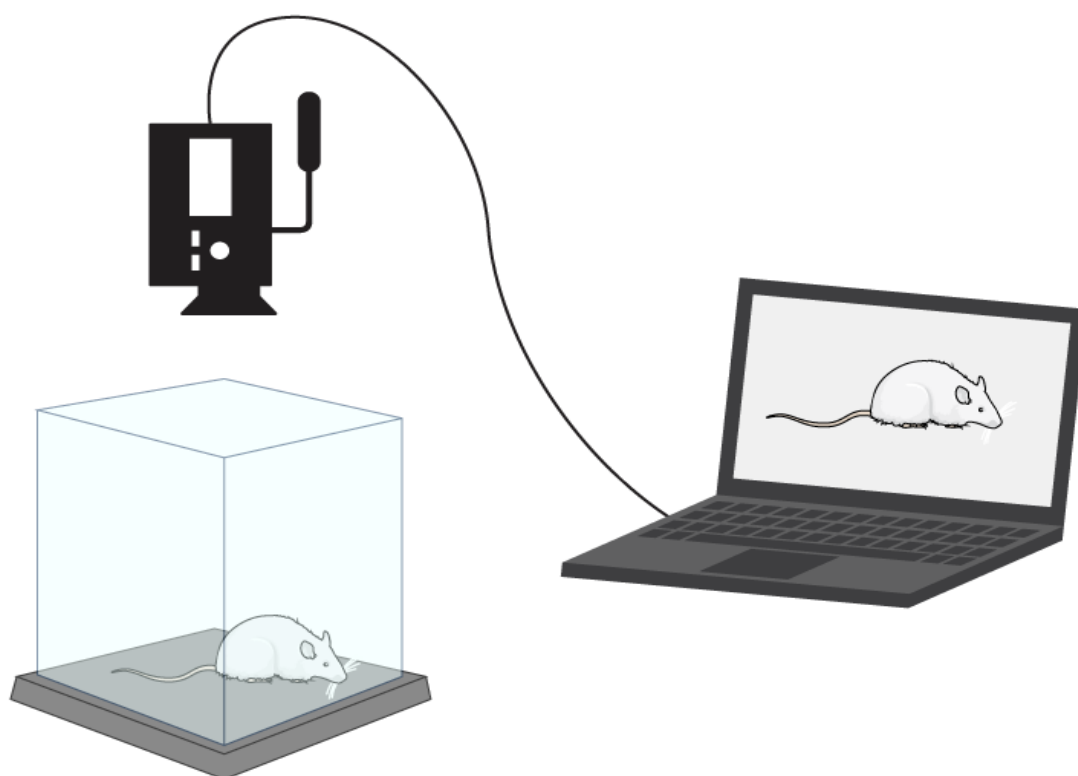


Figura 8- Campo Aberto

4.3.b-Labirinto Aquático de Morris

Utilizamos uma versão modificada do Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Morris 1984) figura 9. Dados obtidos através de um sistema de vídeo (Smart 3.0, Harvard Apparatus). O LAM consiste em um tanque circular (168 cm de diâmetro por 70 cm de profundidade) preenchido com água tingida por tinta atóxica escura e dividido virtualmente em 4 quadrantes iguais no sentido anti-horário. Uma plataforma foi fixada no quarto quadrante virtual e foi mantida em posição durante as sessões de treino. Pistas geométricas coloridas foram dispostas nas paredes da sala do LAM, coincidindo com a posição dos quadrantes para orientação espacial do rato. A água foi mantida a uma temperatura de $24\pm 2^\circ$ C. O teste foi dividido em 5 dias de treino e 1 dia de teste consecutivamente.

No primeiro dia de treino, cada rato foi colocado em cada quadrante com a face virada para a parede do tanque, nadando por 120 segundos ou até encontrar a plataforma escondida. Passados 60 segundos, os animais foram novamente posicionados na banheira no próximo quadrante. Essa etapa foi repetida por mais 4 dias consecutivos com a tendência que se o processo de aprendizado se consolidou a probabilidade de achar a plataforma escondida ficou cada vez maior, diminuindo conseqüentemente o tempo de latência. No 6 dia, chamado dia teste, a plataforma foi retirada do tanque e o animal foi colocado no segundo quadrante e analisado por 90 segundos o tempo de permanência em cada quadrante do tanque esperando-se que se o aprendizado foi consolidado ele tenha permanecido por mais tempo no 4 quadrante onde anteriormente estava posicionada a plataforma escondida.

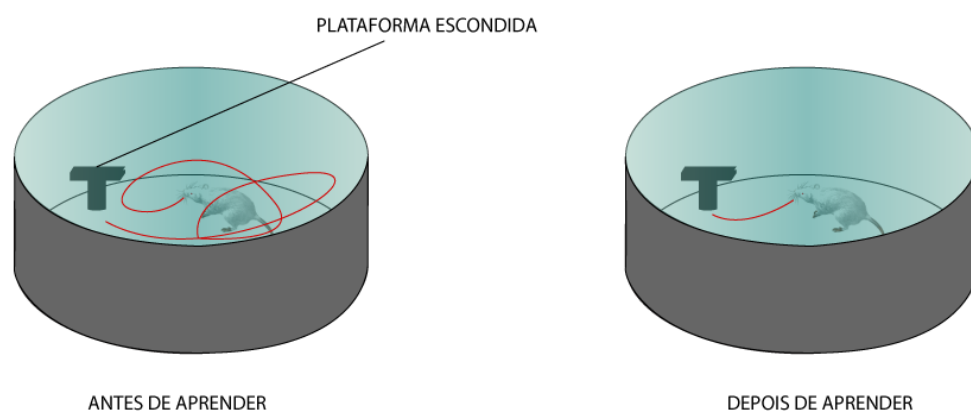


Figura 9- Labirinto Aquático Morris

4.3.c-Esquiwa Passiva

O aparelho utilizado para o treino de esquiwa passiva, o Step-Down, consiste em uma caixa de ferro (30 x 5,0 x 15 cm) com a parede frontal de vidro, possui o assoalho formado por barras. O aparato é conectado a um painel que permite ao experimentador ter controle sobre a intensidade da estimulação elétrica a qual o animal foi submetido figura 10.

O rato realizou uma sessão de treinamento individual, na qual foi colocado no centro da caixa de esquiwa passiva para que exploresse a mesma, quando passou 3 minutos recebeu três choques de 0,5 mA com 20 segundos de intervalo entre os choques e permaneceu na caixa até completar 5 minutos.

Para avaliar a retenção da memória de medo condicionado controlado de longa duração os ratos foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 horas após o treino. O procedimento utilizado na sessão teste foi idêntico àquele empregado na sessão treino, exceto que o animal não foi submetido ao choque com o tempo de freezing do animal sendo medido, quanto maior o tempo de freezing maior é a memória aversiva desencadeada pela sessão do dia anterior.



Figura 10- Esquiwa Passiva

4.4-ANÁLISE BIOQUÍMICA de BDNF

Para avaliar se houve aumento de BDNF após estímulo ambiental levando à estimulação de neurogênese e plasticidade neuronal após os testes comportamentais finais realizou-se a eutanásia dos animais para isolamento dos hemisférios cerebrais, extração do hipocampo e córtex pré-frontal e avaliar nos mesmos o valor quantitativo do BDNF. A eutanásia foi realizada conforme diretrizes de prática de eutanásia do CONCEA, e foi feita por decaptação na

guilhotina. Os tecidos do SNC (Cortex pre-frontal e Hipocampo) foram pesados e homogeneizados utilizando homogenizador manual em solução tampão. Os homogeneizados resultantes foram centrifugados durante 10min a 4500rpm. Os níveis de BDNF foram determinados por ELISA usando Kit reagente para dosagem (Rat BDNF ELISA Kit Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante. Os níveis de BDNF foram medidos e expressos por pg/ml do homogeneizado do tecido.

4.5- ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para avaliar se houve lesão cerebral após exposição anestésica, foi realizado estudo histológico do córtex pré-frontal e hipocampo de ratos eutanasiados 18 horas após o segundo experimento, sendo esta a média de tempo que as lesões, após agressões aos tecidos do SNC, tendem a aparecer.

A apoptose e ou necrose das células do córtex pré-frontal e hipocampo foi avaliada com lamina histológicas de preparado de tecido desta região. As amostras foram fixadas em formol a 10%, após emblocadas em parafina e coradas pela hematxilina e eosina (HE). O estudo histológico foi realizado em microscópio ótico – Carl Zeiss

Foi avaliado como tendo ocorrido necrose, se havia presença em 50 campos ao acaso de cada lâmina de perda de integridade de membrana plasmática, floculação de cromatina, inchaço ou lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas e avaliado apoptose se havia alterações de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos com ou sem desintegração de organelas

As lesões foram graduadas em cruces variando de ausente (-) até ++++ dependendo de sua intensidade. Estes valores foram transformados em números para aplicação de testes estatísticos da seguinte maneira: ausência=0 / +=1 / ++=2 / +++=3 / ++++=4.

4.6-ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram testados quanto a sua normalidade e homocedasticidade, através dos testes de D'Agostino & Pearson e Bartlett, respectivamente. Após, foram analisados através de ANOVA comparando-se as médias dos grupos amostrados, quando relevante o teste de *post-hoc* Tukey foi realizado. Para dados não paramétricos foi

utilizado Kuskal-Wallis seguido do teste Dunn para múltiplas comparações, com exceção da análise de treino de 5 dias do LAM no qual foi utilizado o teste de Friedman. Em todos os casos foi considerado valor de $p < 0,05$ para diferenças significativas.

4.7-ASPECTOS ÉTICOS

Os aspectos éticos referentes ao uso de animais em pesquisa foram rigorosamente seguidos. Este estudo foi realizado sob a aprovação do CEUA da Universidade Federal do Rio Grande, CNPJ 94877.586/0001-10, em conformidade com a lei ° 11.794/08, com certificado de aprovação n° P030/2016, conforme segue em anexo. Os técnicos e acadêmicos do Laboratório de Neurociências do ICB - FURG apresentam formação técnica e capacitação para executar os experimentos acima descritos.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AIMONE, James B.; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 589-596, 2011.

ANAZETTI, Maristella Conte; MELO, Patrícia Silva. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

BARASH, Paul G. (Ed.). **Clinical anesthesia**. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

BADDELEY, Alan. Working memory: looking back and looking forward. **Nature reviews neuroscience**, v. 4, n. 10, p. 829-839, 2003.

BEKINSCHTEIN, Pedro et al. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable?. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2011. p. 536-542.

BLISS, Tim VP; LØMO, Terje. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of physiology**, v. 232, n. 2, p. 331-356, 1973.

BLISS, Timothy V.; COLLINGRIDGE, Graham L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31, 1993.

BOSCOLO, A. et al. The abolishment of anesthesia-induced cognitive impairment by timely protection of mitochondria in the developing rat brain: the importance of free oxygen radicals and mitochondrial integrity. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 3, p. 1031-1041, 2012.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

CAMMAROTA, Martín et al. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. **Neurochemical research**, v. 22, n. 4, p. 499-505, 1997.

CAMPAGNA, Jason A.; MILLER, Keith W.; FORMAN, Stuart A. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 21, p. 2110-2124, 2003.

CESAROVIC, Nikola et al. Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. **Laboratory animals**, v. 44, n. 4, p. 329-336, 2010.

CUI, Yin et al. Repeated administration of propofol upregulated the expression of c-Fos and cleaved-caspase-3 proteins in the developing mouse brain. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 648, 2011.

CULLEY, Deborah J. et al. Long-term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane–nitrous oxide anesthesia in rats. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 100, n. 2, p. 309-314, 2004.

CULLEY, Deborah J. et al. Impaired acquisition of spatial memory 2 weeks after isoflurane and isoflurane-nitrous oxide anesthesia in aged rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 99, n. 5, p. 1393-1397, 2004.

ERIC, R. Kandel; JAMES, H. Schwartz; THOMAS, M. Jessel. Principles of neural science. **Center for Neurobiology and Behavior. College of Physician & Surgeon of Columbia University**, 2014

FANG, Fang; XUE, Zhanggang; CANG, Jing. Sevoflurane exposure in 7-day-old rats affects neurogenesis, neurodegeneration and neurocognitive function. **Neuroscience bulletin**, v. 28, n. 5, p. 499-508, 2012.

FRANKS, N. P. et al. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 607-614, 1994.

FRANKS, Nicholas P.; LIEB, William R. Seeing the Light Protein Theories of General Anesthesia. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 101, n. 1, p. 235-237, 2004.

FREY, Benício N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life sciences**, v. 79, n. 3, p. 281-286, 2006.

GATHERCOLE, Susan E. et al. The structure of working memory from 4 to 15 years of age. **Developmental psychology**, v. 40, n. 2, p. 177, 2004.

GHOSH, Anirvan; CARNAHAN, Josette; GREENBERG, Michael E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1618-1624, 1994.

GRASSHOFF, Christian; RUDOLPH, Uwe; ANTKOWIAK, Bernd. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 18, n. 4, p. 386-391, 2005.

HAN, Xiao-Dan et al. Single sevoflurane exposure increases methyl-CpG island binding protein 2 phosphorylation in the hippocampus of developing mice. **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 1, p. 226-230, 2015.

HEAD, Brian P. et al. Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 110, n. 4, p. 813-825, 2009.

HEMMINGS, H. C.; JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna. Special issue on anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity. 2013.

HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HOLTMAAT, Anthony; SVOBODA, Karel. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 647-658, 2009.

ING, Caleb et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. **Pediatrics**, p. peds. 2011-3822, 2012.

IZQUIERDO, Ivan. Memória. rev. e ampl. **Porto Alegre: Artmed**, 2011.

IZQUIERDO, Iván Antonio et al. Memória: tipos e mecanismos—achados recentes. **Revista USP**, n. 98, p. 9-16, 2013.

JENSEN, Eric. **Enriqueça o cérebro**. Penso Editora, 2009.

JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 876-882, 2003.

JEVTOVIC-TODOROVIC, V. et al. Anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity: an expert group report and statement based on the BJA Salzburg Seminar. **British journal of anaesthesia**, v. 111, n. 2, p. 143-151, 2013.

JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna; PAULE, Merle G. Introduction to the Special Issue “Developmental Neurotoxicity Associated with Pediatric General Anesthesia: Preclinical Findings”. 2017.

KANDEL, Eric et al. **Princípios de Neurociências-5**. AMGH Editora, 2014.

KRECH, David; ROSENZWEIG, Mark R.; BENNETT, E. L. Chemical and anatomical plasticity of brain. **Science**, v. 146, p. 610-619, 1964.

LAMBERT, Talley J.; FERNANDEZ, Stephanie M.; FRICK, Karyn M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 83, n. 3, p. 206-216, 2005.

LENT, Robert; DE NEURÔNIO, Cem Bilhões; FUNDAMENTAIS DE NEUROCIÊNCIA, Conceitos. Atheneu. **Rio de Janeiro**, p. 97-132, 2016.

LOCKHART, Robert S.; CRAIK, Fergus I. Levels of processing: A retrospective commentary on a framework for memory research. **Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie**, v. 44, n. 1, p. 87, 1990.

LOEPKE, Andreas W.; SORIANO, Sulpicio G. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1681-1707, 2008.

MACHADO, Angelo BM. **Neuroanatomia funcional**. Atheneu, 2014

MCGAUGH, James L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MCMAHON, David BT; BARRIONUEVO, German. Short-and long-term plasticity of the perforant path synapse in hippocampal area CA3. **Journal of neurophysiology**, v. 88, n. 1, p. 528-533, 2002.

MILLER, Ronald D. Tratado de anestesia. In: **Tratado de anestesia**. Manole, 2015

PEROUANSKY, Misha. The Quest for a Unified Model of Anesthetic Action A Century in Claude Bernard's Shadow. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 117, n. 3, p. 465-474, 2012.

RAMÓN Y CAJAL, S. Histology of the Nervous System, vol. II. 1911.

REDOLAR-RIPOLL, Diego et al. Intracranial self-stimulation facilitates memory consolidation, but not retrieval: its effects are more effective than increased training. **Behavioural brain research**, v. 129, n. 1, p. 65-75, 2002.

SAHA, Ramendra N.; LIU, Xiaojuan; PAHAN, Kalipada. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 212-222, 2006.

SANCHEZ, Victoria et al. General anesthesia causes long-term impairment of mitochondrial morphogenesis and synaptic transmission in developing rat brain. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 115, n. 5, p. 992-1002, 2011.

SANTOS, AR.; COMPRIDO, D.; DUARTE, CD. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. **Progress. Neurobiology**, v. 92, p. 505-16. 2010.

SATOMOTO, Maiko et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 110, n. 3, p. 628-637, 2009.

SCHUCHARDT, Kirsten; MAEHLER, Claudia; HASSELHORN, Marcus. Functional deficits in phonological working memory in children with intellectual disabilities. **Research in developmental disabilities**, v. 32, n. 5, p. 1934-1940, 2011.

SHEN, Xia et al. Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 118, n. 3, p. 502-515. 2013.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memory: From mind to molecules**. New York, W.H. Freeman, 2000.

THORNBERRY, Nancy A.; LAZEBNIK, Yuri. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

TWAROSKI, Danielle; BOSNJAK, Zeljko J.; BAI, Xiaowen. MicroRNAs: new players in anesthetic-induced developmental neurotoxicity. **Pharmaceutica analytica acta**, v. 6, p. 357, 2015.

UEHARA, Emmy; LANDEIRA-FERNANDEZA, Jesus. Um panorama sobre o desenvolvimento da memória de trabalho e seus prejuízos no aprendizado escolar. **Ciências & Cognição**, v. 15, n. 2, p. 31-41, 2010.

WALLIN, Richard F. et al. Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent. **Anesthesia & Analgesia**, v. 54, n. 6, p. 758-766, 1975.

WANG, Liang et al. Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: evidence from resting state fMRI. **Neuroimage**, v. 31, n. 2, p. 496-504, 2006.

WANG, Shinmin; GATHERCOLE, Susan E. Working memory deficits in children with reading difficulties: memory span and dual task coordination. **Journal of Experimental Child Psychology**, v. 115, n. 1, p. 188-197, 2013.

YAKOVLEV, Alexander G.; FADEN, Alan I. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 5-16, 2004.

YON, J.-H. et al. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. **Neuroscience**, v. 135, n. 3, p. 815-827, 2005.

YU, Deshui; LIU, Bin. Developmental anesthetic neurotoxicity: from animals to humans?. **Journal of anesthesia**, v. 27, n. 5, p. 750-756, 2013.

YU, Deshui et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. **Neuroscience letters**, v. 534, p. 41-46, 2013.

YULUG, B.; OZAN, E.; GONUL, SA.; KILIC, E. Brain-derived neurotrophic factor, stress and depression: A minireview. **Brain Research Bulletin**, v. 78, p. 267-69, 2009.

ZHANG, Yiyang et al. The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 6, p. 4025-4037, 2010.

ZHAO, Chunmei; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008.

ZHU, Gang et al. Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Distinct Impacts of Sevoflurane on Different Subfields of Immature Hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, 2017.

ZHU, Changlian et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 1017-1030, 2010.

6-ARTIGO 1- será submetido à Pediatric Anesthesia como focused review

Focused Reviews- Focused reviews should be approximately 1500 words and cover a concise topic which is of relevance to pediatric anesthesia. It should convey a small number of key points that must be based on solid evidence. It should have a short summary of under 200 words.

Pediatric Anesthesia

© John Wiley & Sons Ltd



Edited By: A. Davidson

Impact Factor: 2.254

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2016: 17/31 (Anesthesiology); 33/121 (Pediatrics)

NEUROTOXICITY ASSOCIATED WITH PEDIATRIC GENERAL ANESTHESIA: CURRENT OUTLOOK

Andrea Soubhia¹, Marcos F. Cordeiro², Sara S. Fernandes¹, Daniela M. Barros², Susi Heliene L. Medeiros¹

¹ Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

Correspondence concerning this article should be addressed to Andrea Fogaça Soubhia -Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Rua Visconde de Paranaguá 102 - Rio Grande, RS, 96203-900, Brasil.

e-mail: andsoubhia@yahoo.com.br

ABSTRACT

Findings from the last two decades strongly suggest that general anesthetics are not as innocuous as previously thought, being associated with neurodegenerative effects when administered during early stages of the development of the central nervous system (CNS). The current level of evidence do not make it possible determine the safer general anesthetic to be used in the pediatric population. This review aims to compile and analyze the material that has been published on the mechanisms of neurotoxicity in animals and humans, as well as to assess the current practice carried out by physicians. The precise mechanisms of action by which anesthetics might cause neurotoxicity are still uncertain. Many hypotheses were raised, but it is known that there are two critical factors behind neuronal injury: the stage of brain development in the moment of exposure to the drug and the magnitude of this exposure, which includes both frequency and intensity. To this moment, evidences concerning the toxic effects of anesthetics in the developing brain are strong but need more clinical support. It is imperative that more pre-clinical and clinical studies are performed to better elucidate the mechanisms of action o anesthetics and its influence in memory and learning deficits following administration during the main stages of brain development. From this knowledge, new alternatives can be proposed and developed to attenuate or even completely avoid the negative side effects.

Key-words- sevoflurane; neurotoxicity, pediatric anesthesia,

INTRODUCTION

Findings from the last two decades strongly suggest that general anesthetics are not as innocuous as previously thought, being associated with neurodegenerative effects when administered during early stages of the development of the central nervous system (CNS). These effects imply in impairments in the cognitive development of young individuals, generating negative side effects in learning and memory that can represent important deficits through life (Satomoto 2009, Fang 2012, Yu 2013).

In May of 2011, the Food and Drugs Administration (FDA) called attention for the concerns on the safety of the use of anesthetics in newborns, nurselings, and children. In June of the next year, an international panel of experts in anesthesiology was reunited for the discussion of the accumulating evidence on the negative effects that anesthetics can cause in the developing brain, and its long lasting cognitive and behavioral deficits (Hemmings and Jevtovic-Todorovic, 2013).

An increasing number of reports have been associating inhalational anesthetics with neurodegeneration, memory loss, and learning impairments. Evidences like these raised many concerns among physicians, especially amid surgeons and anesthesiologists, once the safety of the use of these anesthetics in pediatric patients was put into question. Animal models and children repeatedly exposed to high concentrations of anesthetics at early age are more susceptible to develop CNS damages, because of the enhanced synaptogenesis of earlier brain development stages (Yon JH 2005).

In the last twenty years, numerous studies, both with animals and humans, were conducted aiming to elucidate the mechanisms by which the anesthetics can lead to cognitive deficits. However, to this moment, there are no concrete evidences or definitive consensus on the toxic effects of inhalational anesthetics in the developing human brain, and for this reason many clinical physicians are still not properly informed on the subject by regulatory agencies such as the FDA.

The current level of evidence do not make it possible determine the safer general anesthetic to be used in the pediatric population (Twaroski 2015). Considering that in the United States alone more than 4 million pediatric surgeries are performed every year, the clinical importance of this subject demands special attention, looking for a much deeper understanding of the mechanisms of action and possible consequences (Jevtrovic-Todorovic 2017). This

review aims to compile and analyze the material that has been published on the mechanisms of neurotoxicity in animals and humans, as well as to assess the current practice carried out by physicians.

MECHANISMS OF NEUROTOXICITY IN ANIMAL MODELS

The precise mechanisms of action by which anesthetics might cause neurotoxicity are still uncertain. Many hypotheses were raised, but it is known that there are two critical factors behind neuronal injury: the stage of brain development in the moment of exposure to the drug and the magnitude of this exposure, which includes both frequency and intensity (Jevtovic-Todorovic 2013).

Rats exposed to isoflurane were repeatedly observed to show significant memory deficits, a hindrance that worsened with time (Zhu 2010, Culley 2014). Many mechanisms have been identified and proposed to be behind these effects.

Memory deficits were observed in parallel with a decrease in the number of hippocampal stem cells and a persistent reduction in neurogenesis in this region (Zhu 2010, Culley 2014). Reduced availability of neurotrophic factors, such as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), are associated with the decrease of synaptic density. This outcome was observed in the developing hippocampus of rats subjected to anesthetics, both inhalational and intravenous, leading to a significant reduction in cellular microtubules and alterations in the transport of substances that are essential to the development and survival of neurons (Head 2009).

The generalized neurodegeneration in the brain of rats in development was also associated with the increase of GABA activation and/or reduction in the excitation of N-methyl-D-aspartate (Jevtoc-Todorovic et al. 2013). Anesthetics that stimulate GABA_A receptors, like isoflurane, sevoflurane and propofol, raise the intracellular calcium levels, which can lead to an alteration in the potential of membrane of mitochondria, ultimately resulting in neuronal dysfunction and death (Zhang 2010, Sanchez 2011). These anesthetics are also associated with the increment in reactive oxygen species (ROS) in the brain, leading to ischemic damage and raising neuronal lipid peroxidation in more susceptible regions, as the hippocampus subiculum (Boscolo 2012). It was also reported that neurotoxicity and cognitive underdevelopment in mice subjected to general anesthesia were consequent of neuroinflammation, and the treatment with anti-inflammatories was able to reduce the cognitive impairments (Cui 2011).

Sevoflurane was recently shown to phosphorylate the methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) in the hippocampus, leading to cellular death. This effect was reverted with the pretreatment with a partial NMDAR antagonist, suggesting that the epigenetic alterations induced by sevoflurane may execute an important function in neurotoxicity (Ham 2015). Recently, MicroRNAs have been suggested to be responsible for a negative feedback mechanism in targets for gene expression of neuroprotective molecules, this way leading to neurodegenerative effects (Twaroski 2015). Another current topic under investigation is the location of the injuries in the endoplasmatic reticulum of animals subjected to anesthesia by sevoflurane and its implications in hippocampal lesions (Gang Zhu 2017).

Despite all these findings, the precise mechanisms by which anesthetics cause neurotoxicity remain uncertain. What is known for sure is that the exposure to anesthetics can induce neuronal apoptosis both in the hippocampi and in the brain cortex, leading to long lasting effects (Loepke 2008, Shen 2013).

FINDINGS FROM STUDIES WITH HUMAN SUBJECTS AND CLINICAL IMPORTANCE

A large retrospective clinical study with more than five thousand children showed that children anesthetized at the age of three or earlier were diagnosed with learning and language problems twice as often (DiMaggio 2009). In the same year, another retrospective study with a reduced sample size identified a strong learning deficit in children subjected to urologic surgery with two years of age or less (Kalkman 2009). These pioneering studies marked the beginning of serious uncertainties about the safety of anesthetizing children.

In 2010, the medical and educational records of more than five thousand children were evaluated in another retrospective study, identifying a significant decrease in school performance of children subjected to more than one anesthetic procedure before completing four years of age (Wilder 2010). After these findings, many other studies followed, some of which identifying that the poorer scholar performance was persistent, being noticeable many years later, especially during the preadolescence (Flick 2011, Ing 2012, Sprung 2012).

The persistence of the impairments triggered by the early use of anesthetics could be observed in numerous studies. Children subjected to anesthesia at least once, for surgery or diagnostic exam before completing three years of age, showed more problems with reasoning, language, and memory at the age of ten (Ing and Dimaggio, 2012). The academic performance

of children subjected to inguinal herniorrhaphy during infancy was also seen to be inferior when compared to controls (Hansen et al. 2011). In a recent study, lower intelligence scores were once again observed in children with five to eighteen years old that were subjected to anesthesia before completing four years of age, in addition to reduced density of gray matter in the brain cortex and in the cerebellum, as observed by magnetic resonance (Backeljauwetall 2015). Interestingly, another study showed that even though twins exposed to anesthetics at early ages had learning deficits, no differences were found when just one of the siblings was exposed, suggesting the involvement of other factors (Bartels 2009).

Three major epidemiological studies of cohorts are currently being conducted in order to provide further clarification on the toxic effects of inhalational anesthetic in the developing human brain. They are: The Pediatric Anesthesia Neurodevelopment Assesment (PANDA) considered the most robust, which compare various psychometric tests, QI, memory and language skills in children who have operated herniorrafia up to 3 years of age with their brothers with similar age not exposed to the anesthesia, for now, at age of 6 years, no differences between the IQs of the brothers had been identified, they will be assessed also at 8 and 15 years of life, taking into consideration that the anesthetic time was at a lower average of 80 minutes of exposure; Study of the Columbia University, General Anesthesia Safety (GAS) A study of the Boston children's Hospital that compares the neurodevelopment of children exposed to general anesthesia with sevoflurane with children exposed to spinal anesthesia with procedure on average of 60 minutes with expected preliminary results for 2018; Mayo Safety in Kids (MASK), a study conducted by the Mayo Clinic that aims to compare the neurocognitive development of children exposed to anesthesia with sevoflurane with unexposed children, also without definitive results. (Twaroski 2015).

CONCLUSIONS

Despite all evidences and efforts from organizations involved in the attempt to elucidate the effects of anesthetics in the developing brains, the conclusions are still uncertain. To this moment, evidences concerning the toxic effects of anesthetics in the developing brain are strong but need more clinical support. Moreover, the concerns on the potential development of neurotoxicity by the use of anesthetics must be handled with care, once surgical procedures cannot be performed without anesthetics, and these interventions are often necessary to enhance life quality or even avoid death.

Data obtained from studies with humans are still insufficient to corroborate or refute the pre-clinical studies, because they have conflicting results. The retrospective studies used many different tests to evaluate the cognitive capacity, making it difficult to trace parallels between results, with that in mind, it is clear the importance of the large prospective cohort studies that are currently under preparation.

That said, taking into consideration the large number of pre-clinical evidences, there is a strong feeling of acceptance that both inhalational and venous anesthetics, when applied during brain development stages, can lead to neuroapoptosis and late and permanent cognitive dysfunction, not only in rodents but likely in human as well.

It is imperative that more pre-clinical and clinical studies are performed to better elucidate the mechanisms of action of anesthetics and its influence in memory and learning deficits following administration during the main stages of brain development. From this knowledge, new alternatives can be proposed and developed to attenuate or even completely avoid the negative side effects.

REFERENCES

BACKELJAUW, Barynia et al. Cognition and brain structure following early childhood surgery with anesthesia. **Pediatrics**, v. 136, n. 1, p. e1-e12, 2015.

BARTELS, Meike; ALTHOFF, Robert R.; BOOMSMA, Dorret I. Anesthesia and cognitive performance in children: no evidence for a causal relationship. **Twin research and human genetics**, v. 12, n. 3, p. 246-253, 2009.

BOSCOLO, A. et al. The abolishment of anesthesia-induced cognitive impairment by timely protection of mitochondria in the developing rat brain: the importance of free oxygen radicals and mitochondrial integrity. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 3, p. 1031-1041, 2012.

CUI, Yin et al. Repeated administration of propofol upregulated the expression of c-Fos and cleaved-caspase-3 proteins in the developing mouse brain. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 648, 2011.

CULLEY, Deborah J. et al. Long-term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane–nitrous oxide anesthesia in rats. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 100, n. 2, p. 309-314, 2004.

CULLEY, Deborah J. et al. Impaired acquisition of spatial memory 2 weeks after isoflurane and isoflurane-nitrous oxide anesthesia in aged rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 99, n. 5, p. 1393-1397, 2004.

DIMAGGIO, Charles et al. A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children. **Journal of neurosurgical anesthesiology**, v. 21, n. 4, p. 286, 2009.

FANG, Fang; XUE, Zhanggang; CANG, Jing. Sevoflurane exposure in 7-day-old rats affects neurogenesis, neurodegeneration and neurocognitive function. **Neuroscience bulletin**, v. 28, n. 5, p. 499-508, 2012.

FLICK, Randall P. et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery. **Pediatrics**, p. peds. 2011-0351, 2011.

HAN, Xiao-Dan et al. Single sevoflurane exposure increases methyl-CpG island binding protein 2 phosphorylation in the hippocampus of developing mice. **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 1, p. 226-230, 2015.

HANSEN, Tom G. et al. Academic Performance in Adolescence after Inguinal Hernia Repair in Infancy A Nationwide Cohort Study. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 114, n. 5, p. 1076-1085, 2011.

HEAD, Brian P. et al. Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 110, n. 4, p. 813-825, 2009.

ING, Caleb et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. **Pediatrics**, p. peds. 2011-3822, 2012.

JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 876-882, 2003.

JEVTOVIC-TODOROVIC, V. et al. Anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity: an expert group report and statement based on the BJA Salzburg Seminar. **British journal of anaesthesia**, v. 111, n. 2, p. 143-151, 2013.

JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna; PAULE, Merle G. Introduction to the Special Issue "Developmental Neurotoxicity Associated with Pediatric General Anesthesia: Preclinical Findings". 2017.

LOEPKE, Andreas W.; SORIANO, Sulpicio G. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1681-1707, 2008

SANCHEZ, Victoria et al. General anesthesia causes long-term impairment of mitochondrial morphogenesis and synaptic transmission in developing rat brain. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 115, n. 5, p. 992-1002, 2011.

SATOMOTO, Maiko et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 110, n. 3, p. 628-637, 2009.

SHEN, Xia et al. Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 118, n. 3, p. 502–515-502–515, 2013.

SPRUNG, Juraj et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder after early exposure to procedures requiring general anesthesia. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2012. p. 120-129.

TWAROSKI, Danielle; BOSNJAK, Zeljko J.; BAI, Xiaowen. MicroRNAs: new players in anesthetic-induced developmental neurotoxicity. **Pharmaceutica analytica acta**, v. 6, p. 357, 2015.

WILDER, Robert T. et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 110, n. 4, p. 796-804, 2009.

YU, Deshui; LIU, Bin. Developmental anesthetic neurotoxicity: from animals to humans?. **Journal of anesthesia**, v. 27, n. 5, p. 750-756, 2013.

YU, Deshui et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. **Neuroscience letters**, v. 534, p. 41-46, 2013.

ZHAO, Chunmei; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008.

ZHU, Gang et al. Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Distinct Impacts of Sevoflurane on Different Subfields of Immature Hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, 2017.

ZHU, Changlian et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 1017-1030, 2010.

6-ARTIGO 2 será submetido à Behavioural Brain Research como artigo científico



ISSN: 0166-4328

Behavioural Brain Research

Official journal of the [International Behavioral Neuroscience Society](#)

Impact Factor 3.002

SEVOFLURANE ANESTHETIC EFFECT ON LEARNING AND MEMORY IN YOUNG RATS AND REVERSION OF THE IMPAIRMENTS BY ENVIRONMENTAL ENRICHMENT

Andrea Soubhia¹, Marcos F. Cordeiro², Sara S. Fernandes¹, Guaraciaba R. Sousa⁵, Carolina S. Peixoto², Jaqueline F. Oliveira⁴, Jean P. Oses³ Daniela M. Barros², Susi Heliene L. Medeiros¹

¹ Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

³ Translational Science on Brain Disorders, Clinical Neuroscience Lab, Department of Health and Behavior, Catholic University of Pelotas ,UCPEL.

⁴ Programa de pós-graduação em saúde e comportamento, Universidade católica de pelotas UCPEL

⁵ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Correspondence concerning this article should be addressed to Andrea Fogaça Soubhia -Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Rua Visconde de Paranaguá 102 - Rio Grande, RS, 96203-900, Brasil.

e-mail: andsoubhia@yahoo.com.br

ABSTRACT

Recent findings associate the early exposure to inhalational anesthetics, such as sevoflurane, with neurodegeneration and cognitive impairments. Once stimulation via enriched environments is known to improve neuronal growth and the formation of new synapses, we tested whether exposure to enriched environments could revert the negative effects associated with early anesthesia by sevoflurane. Animals from the Sevoflurane group were subjected to deep anesthesia by sevoflurane 3% for 3 h when reached 14 days, while rats from the Oxygen group were only exposed to the oxygen and Controls were kept in the animal facility. Eighteen hours after exposure, the hippocampi and pre-frontal cortex (PFC) of part of the animals were prepared for histopathological analysis. Animals that passed this stage were tested for environmental enrichment. Rats from the Stimulus groups (Stimulus and Sevoflurane+Stimulus) were placed together in large cages with tube labyrinths for one hour three days per week from the days 21 to 39. Animals were then subjected to behavioral tasks starting on day 40. Histopathological alterations were present only in the brain structures of animals exposed to sevoflurane, with apoptotic cells detected in all histological slides.

Concerning the behavioral assessment, even though no differences were observed in the locomotor activity, exploratory behavior or anxiety in the open field task, in the Morris water maze the Sevoflurane group took more time to perform the task in all five training days ($p < 0.05$), while rats of the Sevoflurane+Stimulus group performed similar to controls. Memory impairments could also be observed in the inhibitory avoidance task, where Sevoflurane animals were the only ones to show a significant reduction in the freezing time during the test session ($p < 0.05$). BDNF levels were significantly increased in the PFC of animals of both stimulated groups, while it was higher only in the hippocampi of Sevoflurans+Stimulus rats. In conclusion, we provided further confirmation on the impairments caused by early exposure to sevoflurane, and showed the promising effects of recreation, exercise, and social interaction, even when intermittent, as a treatment.

Keywords: enriched environment, inhalational anesthetics, learning, memory, pediatry.

INTRODUCTION

Findings from the last decades strongly suggest that general anesthetics, when administered at early stages of the development of the central nervous system (CNS), can lead to neurodegeneration, impairing the cognitive development of animals and children, causing important deficits in learning and memory (Fang et al., 2012; Satomoto et al., 2009; Yu et al., 2013), making their use not as innocuous as previously thought, bringing important sequels through life. Considering that in the United States alone more than 4 million pediatric surgeries are performed every year, the clinical importance of this subject demands special attention, looking for a much deeper understanding of the mechanisms of action and possible consequences (Jevtovic-Todorovic et al., 2017).

The precise mechanisms of action by which inhalational anesthetics might cause neurotoxicity are still uncertain. Many hypotheses were raised, but it is known that there are two critical factors behind neuronal injury: the stage of brain development in the moment of exposure to the drug and the magnitude of this exposure, which includes both frequency and intensity (Jevtovic-Todorovic et al., 2013). Animal models and children repeatedly exposed to high concentrations of anesthetics at early age are more susceptible to develop CNS damages, because of the enhanced synaptogenesis of earlier brain development stages (Yon et al., 2005). What is known for sure is that the exposure to anesthetics can induce neuronal apoptosis both

in the hippocampi and in the brain cortex, leading to long lasting effects (Loepke and Soriano, 2008; Shen et al., 2013).

The search for new alternatives to attenuate or avoid the negative effects of early exposure to anesthetics is much needed. Among the proposed treatments, stimulation via exercise, social interaction, and recreation is one of the most promising approaches, once it is affordable and lacks contraindications. This kind of stimulation was already reported to raise the levels of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), induce neuronal growth, and increase the formation of dendritic spines and new synapses (Bekinschtein et al., 2011).

This study aims to evaluate the cognitive functions and the structural integrity of the brain of juvenile rats subjected to deep anesthesia with sevoflurane, and whether environmental enrichment can revert these effects.

METHODS

Experimental model

The progenitor adult Wistar rats, 2 males and 4 females, were prevented from the central bioterium of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), and were kept in the animal facility of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the Federal University of Rio Grande (FURG). The day the progenies were born was considered as day 0. On day 21, the progenies were weaned and separated in cages by brood and gender. The animals were kept in a light/dark cycle of 12 h, with controlled temperature (23 ± 1 °C) and humidity ($55\pm 5\%$), and with free access to food and water. All protocols were previously approved by FURG Ethics Committee on Animal Use (CEUA) under the certification number P030/2016.

Experimental design

Thirty rats were sexed and then randomly separated into three groups, in order to distribute a similar number of males and females in each group. The groups were labeled Control, Oxygen and Sevoflurane. Animals from the Sevoflurane group were subjected to deep anesthesia by sevoflurane 3% for 3 h under a glass dome attached to the anesthetic apparatus, with continuous oxygen liberation at 2 L/min. The temperature of the surgical room during the experiment was kept at 36 °C to avoid hypothermia during the exposure to the inhalational

gases. The anesthetic apparatus was Omeda 200 with a calibrated Tec 7 sevoflurane vaporizer. Rats from the Oxygen group were only exposed to the oxygen, while animals from the Control group were kept in the animal facility. Eighteen hours after anesthesia, all animals were decapitated for the isolation of the hippocampi and PFC, for the preparation of histological slides.

Other 60 animals were randomly assigned to 5 groups of 12 animals each: Control, Oxygen, Sevoflurane, Stimulus and Sevoflurane+Stimulus. On day 14, animals from the Sevoflurane groups (Sevoflurane and Sevoflurane+Stimulus) were subjected to deep anesthesia in the same aforementioned conditions. Animals from the Stimulus groups (Stimulus and Sevoflurane+Stimulus) were placed together in large cages enriched with tube labyrinths for one hour three days per week from the days 21 to 39. Animals from all groups were then subjected to behavioral tasks starting on day 40, being these the only activities experienced by animals of the Control group.

Histopathology

The hippocampi and PFC were rapidly isolated from the brains of 14 days-old animals. The structures were fixed in formaldehyde 10%, processed, embedded in paraffin and cut at 6 μm using a microtome (Leica RM2255) for the preparation of histological slides. After staining with hematoxylin and eosin, the slides were analyzed by a pathologist, who evaluated 50 random regions of each slide. The lesions were classified according to severity, ranging from 0 (no detectable injuries) to 4 (numerous or severe injuries).

Behavioral assessment

Open field

The open field task is used to evaluate the locomotor activity and exploratory behavior of the animals. The apparatus consisted of a wooden box with the floor measuring 30 x 22 cm. The activity of the animal was recorded for 5 min using a camera placed on the ceiling of the room. Locomotor activity and area of predominance (central vs. peripheral) were measured by a video analysis system (Smart 3.0, Harvard Apparatus). After each trial, the number of fecal pellets was counted and the box was cleaned with alcohol 70%.

Morris Water Maze

The Morris Water Maze (MWM) task was performed to evaluate the spatial memory of the animals. A circular water tank measuring 168 cm diameter was filled with water until reaching 70 cm of profundity. During all sessions, the water temperature was maintained at 24 ± 2 °C. The water was stained black using a non-toxic colorizer, and visual cues were placed in the walls of the room. Test sessions were filmed using a camera fixed on the ceiling, and image data was analyzed using the same video analysis system used in the open field. The tank was virtually divided into four quadrants numbered anti-clockwise. A platform was placed in the fourth quadrant, having its surface hidden just below water level.

The training sessions consisted of four trials per animal. For each trial, the rat was placed in the tank starting from a different quadrant, with an interval of 60 s between trials. The time taken to find the platform was measured, with a time limit of 2 min. If the platform could not be found, a researcher placed the animal on the platform for 20 s before the next attempt. After five days of training, the test was carried out. In this session, platform was removed, the animal was placed in the second quadrant and the time spent on the fourth quadrant (target quadrant, TQ) was measured, with more time in the TQ meaning that the animal remembered the original position of the platform.

Inhibitory avoidance task

This test was performed to evaluate the aversive memory. The apparatus consisted of a steel box (30 x 5 x 15 cm) with steel bars on the floor. One of the walls was made of glass, to allow visualization. For the training session, animals were allowed to explore the box for three min, after then being subjected to three quick electric shocks (0.5 mA) with 20 s intervals between them. The animals remained on the box until the completion of 5 min. There were no electrical shocks in the test session, and the time of freezing behavior was measured.

Biochemical parameters

After the behavioral assessment, the animals were decapitated for the collection of the brain and further isolation of the hippocampi and the PFC. BDNF was measured from the hippocampi and PFC. Following isolation, the structures were weighted, homogenized in a buffer solution, and centrifuged at 4500 rpm for 10 min. BDNF levels were determined by using

a kit (Rat BDNF ELISA Kit, Sigma-Aldrich), and the adopted protocols followed the instructions provided by the manufacturer.

Statistical analysis

Obtained data was tested for normality and homocedasticity using the D'Agostino & Pearson and Bartlett tests, respectively. When applicable, data was analyzed using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Non-parametric data was analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for multiple comparisons. MWM data was analyzed using Friedman's test. In all cases, data are represented as mean \pm SEM and differences were considered as statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Microscopic analysis of histological slices of the brain tissue showed that all animals from the Sevoflurane group had apoptotic cells both in the hippocampi and in the PFC, being this the only group with any histopathological alterations (Fig 1).

Total traveled distance in the open field task was not different among the experimental groups (Fig 2A). Similarly, the two parameters used to evaluate stress were not statistically different between groups, with similar time spent in each zone (central or peripheral) (Fig 2B) and number of fecal pellets (data not shown).

In order to evaluate if the animals were able to recall the localization of the platform from the previous training sessions in the MWM, we have quantified the time spent to find the platform from the first training session of the day (starting at quadrant 1). With this approach, we could observe that animals from the Sevoflurane group needed more time than the other groups to find the platform (Fig 3A). Similarly, animals from this group also took longer to find the platform in the end of each training session in all 5 days (Fig 3B). Combined, these results suggest that animals from the Sevoflurane group not only had more difficulties to remember the placement of the platform from previous trainings, but also had more difficulties to learn it within the same training session. Interestingly, no statistically differences were found in the test session, as time spent in the TQ was not significantly different from the other groups (Fig 3C).

Freezing time was significantly lower in animals from the Sevoflurane group in comparison to all other groups (Fig 4). This once again shows that animals from this group had

more difficulty to recall past events, in this case by not evocating the fear memory associated with the previous experiences within the box.

Hippocampal BDNF levels were significantly higher in animals from the Sevofluane+Stimulus group in comparison to all other groups (Fig 5A), and it was also higher in both stimulated groups when BDNF was quantified from the PFC (Fig 5B). These results suggest an important effect from the enriched environment on the biochemistry of the brain, with greater effect on animals subjected to anesthesia at early age.

DISCUSSION

In this study we evaluated the effects of the early anesthesia with sevoflurane in rats, and whether exposure to an enriched environment could revert its negative effects.

The only experimental group with histopathological alterations was the Sevoflurane group, where apoptosis was detected in both the hippocampi and the PFC of all animals, while necrosis was found in only one of the ten analyzed hippocampi. Apoptosis is an irreversible programmed event of self-destruction that takes place when a cell is damaged beyond recovery. The biochemical mechanisms underlying apoptosis include the cleavage of proteins by hydrolysis, a process that involves caspases, present in the cells as pro-enzymes. These enzymes not only hydrolyze the proteins but as well activate DNAses that degrade cellular DNA. Changes in the plasmatic membrane of apoptotic cells express phosphatidylserine, making them targets to macrophages. These enzymes not only hydrolyze but also activate proteins that degrade DNA cellular DNAses. Changes in plasma membranes of apoptotic cells which express certain chemicals (phosphatidylserine), make them a target for phagocytosis by macrophages, without the release of substances that would produce local inflammation and therefore greater injury as in the case of tissue necrosis (Thornberry, 1998; Hengartner 2000). Sevoflurane may act in different ways to promote apoptotic damage instead of necrosis, being the assessment of the initiator caspases a relevant approach for the evaluation of the genesis of the injury.

Total traveled distance in the open field task was similar among all groups, suggesting that the treatments did not lead to differences in the exploratory behavior or to motor impairments. This second point is important, once differences in the locomotor activity would have led to misinterpretations in the MWM task, designed to assess cognitive outcomes only. Concerning this, MWM results showed that animals from the Sevoflurane group spent more time to find the platform in all training sessions, even though this time became shorter after

each day until no more differences could be identified among groups in the test day. The difficulty to find the platform during the training session evinces a problem to retrieve short-term memories, such as the working memory.

The working memory has been receiving special attention due to its impact on learning (Wang and Gathercole, 2013). It is a system of limited capacity that allows the temporary storage and manipulation of verbal or visual information necessary for complex tasks, such as comprehension, learning, reasoning, and planning (Baddeley, 2003). The process of redeeming information from long-term memories and establish associations with the new information is the reason why it is denominated as working memory (Baddeley, 2003). Malfunctioning of one or more components of the working memory is associated with learning disabilities and poor school performance (Uehara and Landeira-Fernandez, 2010). Children with learning disabilities may have limitations to properly and precisely store or organize information to perform motor or academic tasks (Uehara and Landeira-Fernandez, 2010). The association between working memory and the academic progress in language and mathematics is well established (Gathercole et al., 2004; Schuchardt et al., 2011). The PFC is anatomically associated with the working memory, while the hippocampus is associated with long-term memories (Lent, 2004). The MWM task makes extensive use of the working memory, once the animals must spatially guide themselves within the tank by using the visual cues, while the long-term memory is used to remember the trial performed on the day before.

Animals subjected to early anesthesia with sevoflurane that were later exposed to an enriched environment performed similar to controls in all behavioral tasks. Similar effects were already observed in children with brain injuries, that were able to perform equally or even better than the average in cognitive tests after treatment with repeated sensory stimuli in an enriched environment (Izquierdo, 2011). This effect is possibly a combination of physical exercise, social interaction, recreation and exposure to a complex environment, serving as stimuli for the growth and ramification of axons and dendritic spines and the formation of new synapses via increase of BDNF (Bekinschtein et al., 2011; Izquierdo, 2011). In accordance to that, our findings give evidence between the association between enriched environment, increase in BDNF levels and improvement of cognitive performance.

Even though animals from the Sevoflurane group showed more difficulties during the training sessions, their performance was not significantly different from animals from the other groups on the test day. This finding suggests that even with the memory impairments, the task

could be learnt after enough repetition. In fact, animals from this group performed increasingly better after each day of training. Spatial and long term learning, associated with the hippocampus, were not as impaired as the working memory, associated to the PFC and responsible for the association and speed to perform the task (Kandel, 2014). Memory impairments due to early exposure to sevoflurane were also observed in the inhibitory avoidance task, giving more evidence for the difficulty to learn from events from the previous days.

BDNF levels were increased in the PFC of animals from both groups exposed to the enriched environment. These findings are in accordance to the literature, once environmental stimuli are associated with better memory. The physical exercise and social interaction provided by the enriched environments were seen to increase the levels of synaptic proteins (synapsin I and synaptophysin), both controlled by BDNF (Bekinschtein et al., 2011). The activation of these signaling pathways modulate proliferation, survival, and maintenance of the neuronal system, suggesting the increase in BDNF levels leads to the functional improvements described in studies with enriched environments (Bekinschtein et al., 2011; Frey et al., 2006; Santos et al., 2010).

Our results show that even though early exposure to sevoflurane led to apoptosis and behavioral impairments in learning and memory, at least the latter were reversible after enough stimulation. Importantly, even though animals from the Sevoflurane group needed more time to learn the MWM task, they could perform similarly to the other groups after 5 days of training. In fact, the repeated exposure to a problem situation that demanded reasoning, like the MWM training, could have served as a stimulus for the brain to recover, at least partially.

Differently from other reports (Bekinschtein et al., 2011; Santos et al., 2010) the exposure to the enriched environment in our study was not continuous, but intermittent (1 hour per day 3 times per week). Nevertheless, this exposure protocol was enough to revert all complications detected in the non-stimulated animals exposed to sevoflurane.

In conclusion, we confirmed that early anesthesia with sevoflurane is associated with neurodegeneration, leading to the apoptosis of brain cells along with important deficits in learning and memory. However, stimulation with enriched environments that allow exercising and social interactions, even when limited to few times per week, can represent a method that

is effective and without contraindications that can be used as a treatment for the neurological impairments triggered by sevoflurane and other similar anesthetics in pediatric patients.

REFERENCES

- Baddeley, A., 2003. Working memory: looking back and looking forward. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 829–839. doi:10.1038/nrn1201
- Bekinschtein, P., Oomen, C.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2011. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 536–542. doi:10.1016/j.semcdb.2011.07.002
- Fang, F., Xue, Z., Cang, J., 2012. Sevoflurane exposure in 7-day-old rats affects neurogenesis, neurodegeneration and neurocognitive function. *Neurosci. Bull.* 28, 499–508. doi:10.1007/s12264-012-1260-4
- Frey, B.N., Andrezza, A.C., Ceresér, K.M.M., Martins, M.R., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Quevedo, J., Kapczinski, F., 2006. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 79, 281–286. doi:10.1016/j.lfs.2006.01.002
- Gathercole, S.E., Pickering, S.J., Ambridge, B., Wearing, H., 2004. The structure of working memory from 4 to 15 years of age. *Dev. Psychol.* 40, 177–190. doi:10.1037/0012-1649.40.2.177
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776. doi:10.1038/35037710
- Izquierdo, I., 2011. *Memória*, 2nd edition. ed. ARTMED, Poto Alegre, Brazil.
- Jevtovic-Todorovic, V., Absalom, A.R., Blomgren, K., Brambrink, A., Crosby, G., Culley, D.J., Fiskum, G., Giffard, R.G., Herold, K.F., Loepke, A.W., Ma, D., Orser, B.A., Planel, E., Slikker, W., Soriano, S.G., Stratmann, G., Vutskits, L., Xie, Z., Hemmings, H.C., 2013. Anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity: an expert group report and statement based on the BJA Salzburg Seminar. *Br. J. Anaesth.* 111, 143–151. doi:10.1093/bja/aet177
- Jevtovic-Todorovic, V., Bushnell, P.J., Paule, M.G., 2017. Introduction to the special issue “Developmental neurotoxicity associated with pediatric general anesthesia: Preclinical findings.” *Neurotoxicol. Teratol.* 60, 1. doi:10.1016/j.ntt.2017.02.001
- Kandel, E.R. (Ed.), 2014. *Princípios de Neurociência*, 5th ed. ed. Porto Alegre, Brazil.

Lent, R., 2004. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. Atheneu, São Paulo, Brazil.

Loepke, A.W., Soriano, S.G., 2008. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth. Analg.* 106, 1681–1707. doi:10.1213/ane.0b013e318167ad77

Santos, A.R., Comprido, D., Duarte, C.B., 2010. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog. Neurobiol.* 92, 505–516. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.08.004

Satomoto, M., Satoh, Y., Terui, K., Miyao, H., Takishima, K., Ito, M., Imaki, J., 2009. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* 110, 628–637. doi:10.1097/ALN.0b013e3181974fa2

Schuchardt, K., Maehler, C., Hasselhorn, M., 2011. Functional deficits in phonological working memory in children with intellectual disabilities. *Res. Dev. Disabil.* 32, 1934–1940. doi:10.1016/j.ridd.2011.03.022

Shen, X., Dong, Y., Xu, Z., Wang, H., Miao, C., Soriano, S.G., Sun, D., Baxter, M.G., Zhang, Y., Xie, Z., 2013. Selective Anesthesia-induced Neuroinflammation in Developing Mouse Brain and Cognitive Impairment: *Anesthesiology* 118, 502–515. doi:10.1097/ALN.0b013e3182834d77

Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316.

Uehara, E., Landeira-Fernandez, J., 2010. Um panorama sobre o desenvolvimento da memória de trabalho e seus prejuízos no aprendizado escolar. *Ciênc. Cognição* 15.

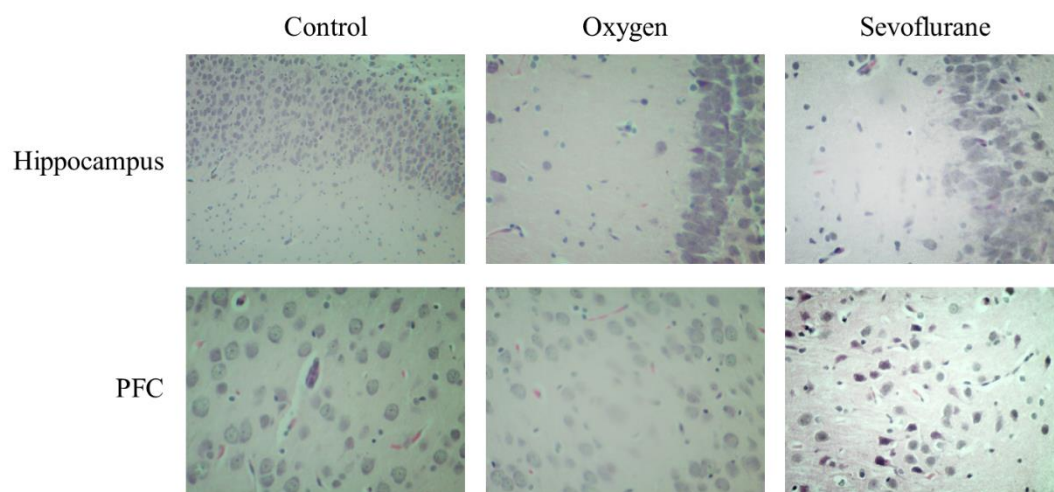
Wang, S., Gathercole, S.E., 2013. Working memory deficits in children with reading difficulties: Memory span and dual task coordination. *J. Exp. Child Psychol.* 115, 188–197. doi:10.1016/j.jecp.2012.11.015

Yon, J.-H., Daniel-Johnson, J., Carter, L.B., Jevtovic-Todorovic, V., 2005. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 135, 815–827. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.064

Yu, D., Jiang, Y., Gao, J., Liu, B., Chen, P., 2013. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 534, 41–46. doi:10.1016/j.neulet.2012.12.033

FIGURE CAPTIONS

Figure 1



	Apoptosis severity score (occurrence, Sevoflurane group, n = 10)				
	0	1	2	3	4
Hippocampus	0	4	3	3	0
PFC	0	1	6	3	0

Figure 2

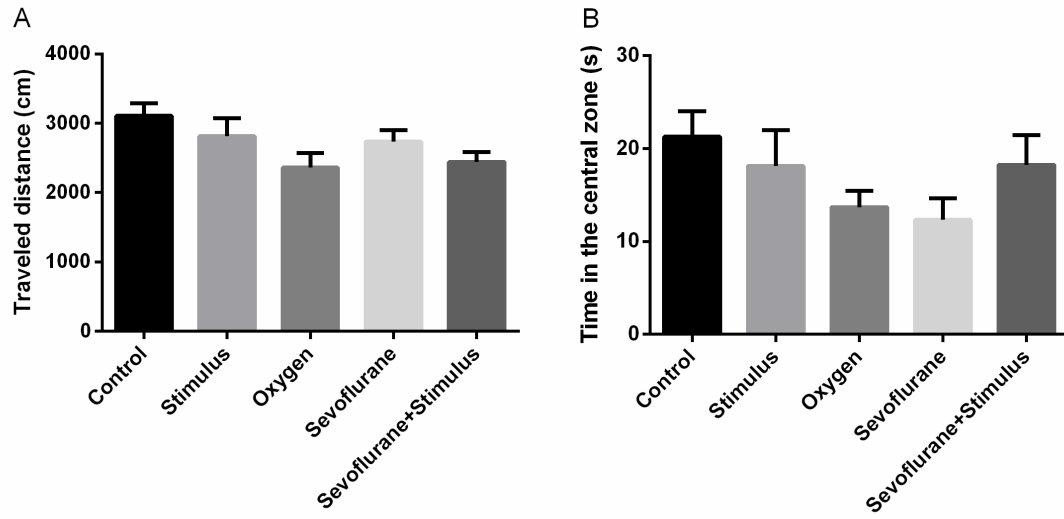


Figure 3

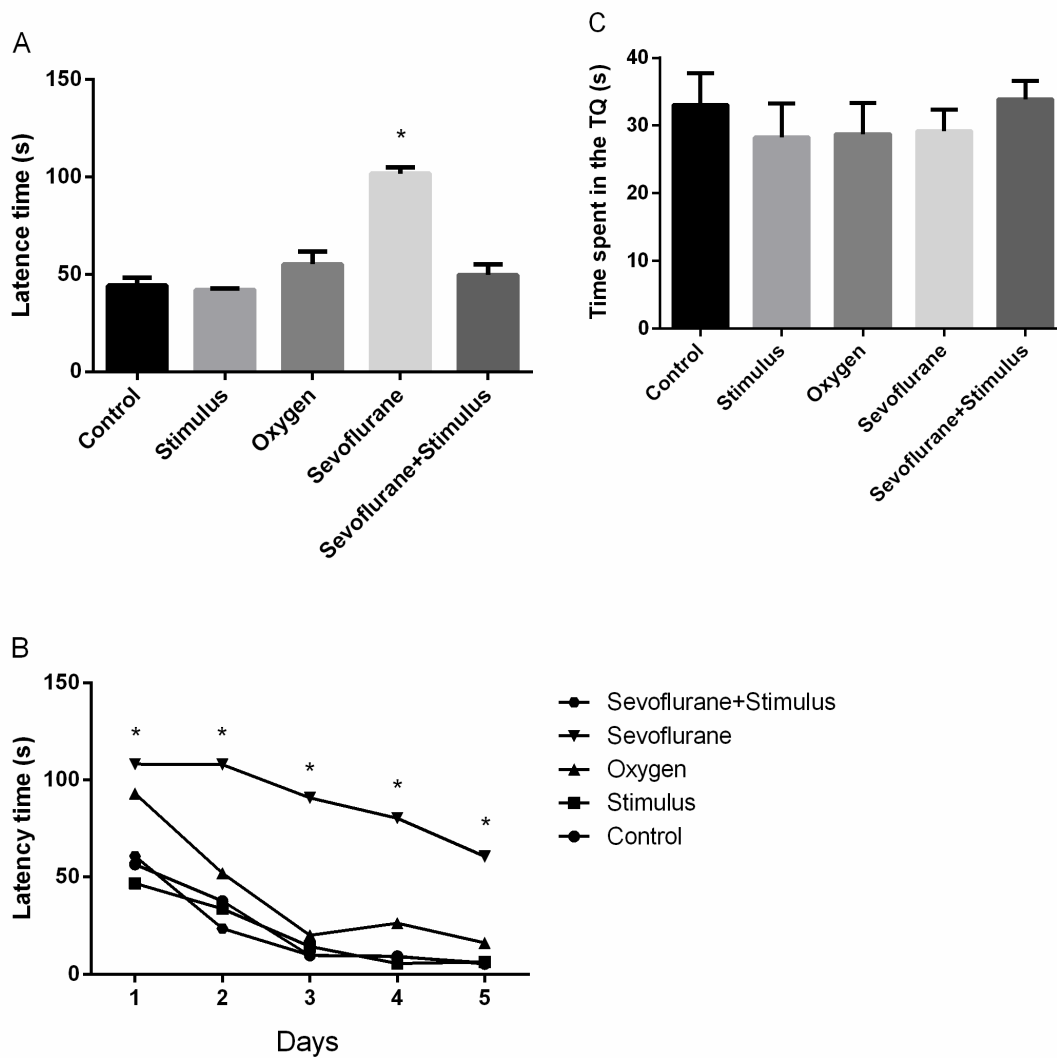


Figure 4

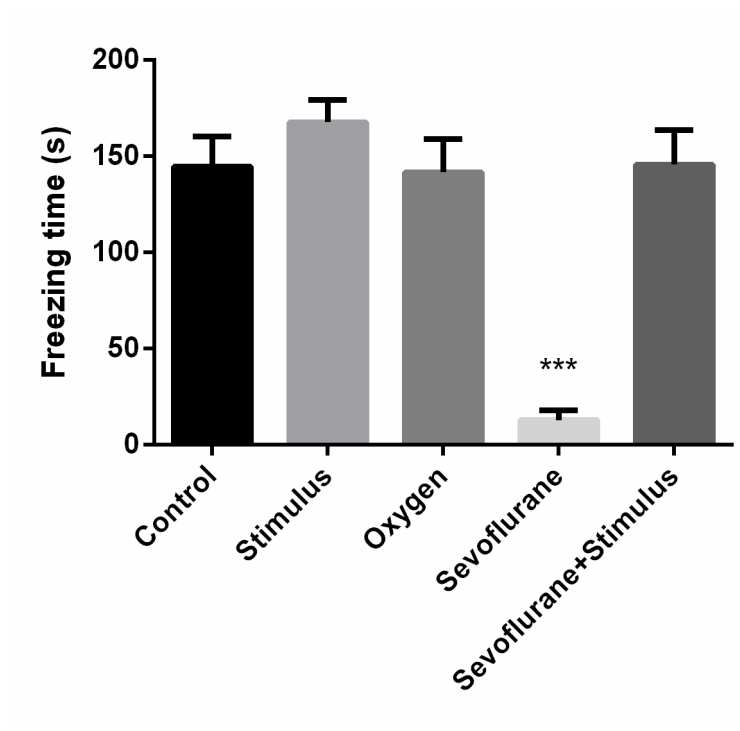


Figure 5

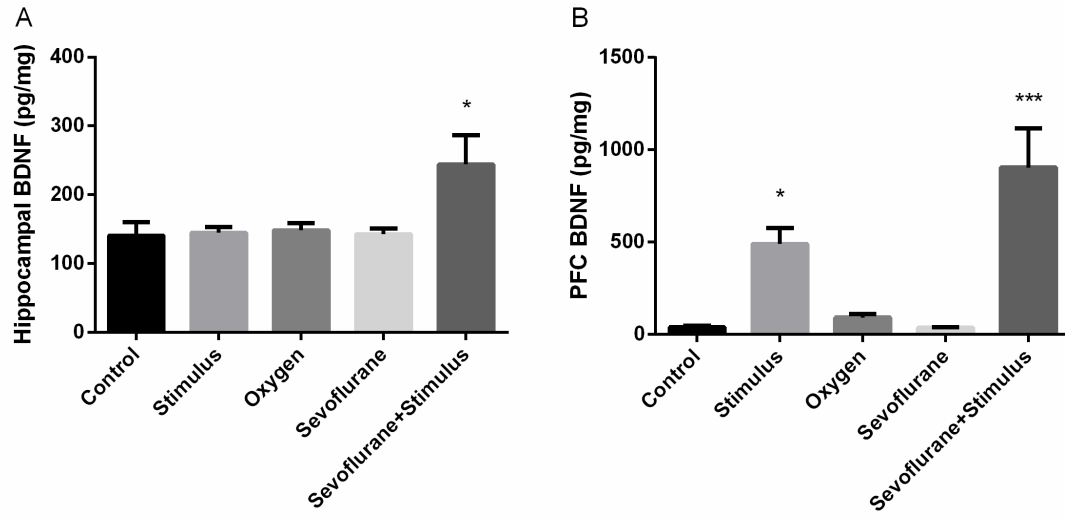


Figure 1. Apoptosis of brain cells following early exposure to sevoflurane. Representative micrographs of the hippocampi and pre-frontal cortex (PFC) of 14 days-old rats 18 hours after deep anesthesia with sevoflurane. Apoptotic cells could be identified in both brain structures of all animals exposed to sevoflurane, while no histopathological alterations could be identified in the brains of controls or animals exposed to oxygen. Staining by hematoxylin and eosin. The accompanying table shows the occurrence of severity scores per structure of the histological slides analyzed (n = 10). Data only from anesthetized animals is provided, once no alterations could be identified in the other treatments (score 0 in all sample, n = 8 per group).

Figure 2. Neither early anesthesia with sevoflurane nor environmental stimulation led to alterations in locomotor activity or in anxiety-like behavior in the open field task. Locomotor activity was measured by the total traveled distance within 5 min (A), while anxiety-like behavior was assessed by the time spent in the central zone of the box, with more time spent in the peripheral zone meaning more anxiety (B) (n=12-13).

Figure 3. Spatial learning and memory impairments caused by early anesthesia with sevoflurane, as tested with the Morris water maze (MWM), were ameliorated following stimulation with environmental enrichment. Animals were trained for five days in the MWM task, and each training session consisted of four trials. Non-stimulated animals exposed to sevoflurane (Sevoflurane group) needed more time to complete the task both in the first trial (A) and by the end of the training (B) in comparison to controls and animals treated with environmental stimulation (* = $p < 0.05$ vs. Control and Sevo+Stimulus, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc for multiple comparisons). In the test day, however, animals from all groups spent a similar amount of time in the target quadrant (TQ), suggesting that the task could be learnt by animals of all groups after the 5-day training (C) (n = 12-13).

Figure 4. Aversive memory acquisition was impaired after early exposure to sevoflurane. Animals anesthetized with sevoflurane at early age not exposed to environmental enrichment (Sevoflurane group) showed a reduced freezing time in the test session in the inhibitory avoidance task. On the other hand, animals exposed to sevoflurane that were stimulated (Sevoflurane+Stimulus) performed similar to controls (***) = $p < 0.001$ vs. Control and Sevoflurane+Stimulus, ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, n = 12-13).

Figure 5. Early anesthesia with sevoflurane followed by intermittent exposure to an enriched environment led to higher BDNF levels both in the hippocampi and in the pre-frontal cortex (PFC). While the increase in BDNF was only observed in the hippocampi of stimulated animals anesthetized with sevoflurane (Sevoflurane+Stimulus) (A), this effect was observed in the PFC of these animals and the ones only exposed to the enriched environment (Stimulus group) (B) (* = $p < 0.05$ and *** = $p < 0.001$ vs. Control and Sevoflurane, ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, $n = 6$).

8-CONCLUSÃO

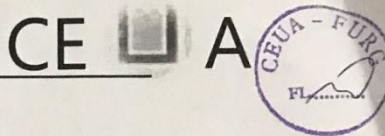
Concluindo podemos observar que a anestesia com sevoflurano nos ratos de 14 dias de vida gerou neurodegeneração causando déficit de aprendizagem e memória nos testes comportamentais e alterações histológicas significativas com apoptose moderada em todos os indivíduos expostos, bem como detectamos também que o uso de ambiente enriquecido de forma intermitente se mostrou uma boa ferramenta para o tratamento dessas lesões podendo se tornar uma alternativa viável e sem efeitos colaterais para a população alvo, sendo que esses achados podem ser relevantes para anestesia neonatal e pediátrica.

9-ANEXOS

Aprovação CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br



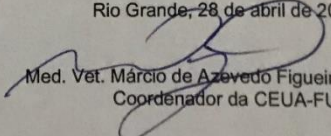
CERTIFICADO Nº P030/2016

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos de anestésico sevofluorane no aprendizado e na memória de ratos jovens", protocolo nº 23116.006768/2015-80, sob a responsabilidade de Susi Lauz - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 27 de abril de 2016 (Ata 005/2016).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq032/2015
COLABORADORES	Andrea Fogaça Soubhia
VIGÊNCIA DO PROJETO	30/06/2017
ESPÉCIE/ LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
NÚMERO DE ANIMAIS	02 machos e 04 fêmeas adultos; 24 filhotes
PESO/ IDADE	Adultos: 300 g / 3 meses Filhotes: 14 dias
SEXO	02 machos; 04 fêmeas; 24 filhotes (não importa o sexo)
ORIGEM	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL)/Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS)
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Julho de 2017

Rio Grande, 28 de abril de 2016.


Med. Vet. Marcio de Azevedo Figueiredo
Coordenador da CEUA-FURG