

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**

**EFEITOS DE CETAMINA NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA DE LONGA
DURAÇÃO E NÍVEIS DE BDNF NO HIPOCAMPO DE RATOS**

BRUNO KILPP GOULART

Porto Alegre
Dezembro de 2009

BRUNO KILPP GOULART

**EFEITOS DE CETAMINA NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA DE LONGA
DURAÇÃO E NÍVEIS DE BDNF NO HIPOCAMPO DE RATOS**

**Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e
Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre
Dezembro de 2009

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Departamento de Farmacologia, ICBS, UFRGS e no Laboratório de Pesquisas em Câncer no Centro de Pesquisas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Instituto do Câncer Infantil do RS (ICI-RS) e Fundação Sul-Americana para o Desenvolvimento de Novas Drogas Anti-Câncer (Fundação SOAD).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Carmen e Goulart pelo amor e apoio dispensado a mim e por me ensinarem à importância da honestidade, humildade e do respeito, o que com certeza, tornou-me melhor.

Agradeço a meu irmão Paulo, que mesmo distante, sempre foi um exemplo e que direta ou indiretamente me ensinou a amadurecer.

Agradeço ao meu orientador Rafael Roesler, pela confiança, amizade e por dar a mim a oportunidade de defender o título de mestre.

Agradeço a todos aqueles que estiveram ao meu lado, apoiando ou criticando, ajudando ou atrapalhando. Com certeza todas estas formas nos tornam mais fortes e aumentam o sentimento de persistir.

Finalmente mas longe de ser menos importante, agradeço a uma extraordinária pesquisadora. Uma pessoa maravilhosa, uma pessoa com “garra”, uma pessoa que sonhou desde criança que seria cientista e aí está ela, fazendo jus ao seu sonho e com extrema competência. Posso te dizer, Carol, que tenho muita sorte na vida. Digo isso simplesmente por saber que tu estás ao meu lado integralmente. Obrigado por ser esta pessoa maravilhosa, além de linda. Obrigado por fazer parte da minha vida e por me ensinar a ser um homem. *Te quiero!*

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	06
RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
1 INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Aprendizado e Memória.....	09
1.1.1 Memória Declarativa e Não-Declarativa.....	11
1.1.2 Memória de Trabalho	11
1.1.3 Memória de Curta e Longa Duração.....	12
1.2 Mecanismos Importantes na Formação da Memória.....	13
1.2.1 Neurotrofinas.....	14
1.2.1.2 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).....	15
1.2.1.3 Glutamato e seus Receptores.....	16
1.3 Cloridrato de Cetamina.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Grupo Experimental e Teste de Reconhecimento de Novo Objeto....	23
3.3 Avaliação dos Níveis de BDNF no Hipocampo de Ratos.....	26
3.4 Análise Estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
5 DISCUSSÃO.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
7 ANEXO (MANUSCRITO).....	49
8 CURRICULUM LATTES.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinases* (Quinase reguladora de sinal extracelular)

Glu: Glutamato

I.P.: Intraperitoneal

iGluR: *Íon Channel Coupled* (Receptores glutamatérgicos ionotróficos)

mGluR: *Second Messenger Coupled* (Receptores glutamatérgicos metabotróficos)

KA: *Kainate* (Cainato)

LTM: *Long-Term Memory* (Memória de Longa Duração)

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases* (Proteína quinase mitógeno-ativada)

NGF: *Nerve Growth Factor* (Fator de Crescimento Nervoso)

NMDA: *N* metil-D-aspartato

NMDAR: *N* metil-D-aspartato receptor (Receptor do *N* metil-D-aspartato)

NT3: Neurotrofina-3

NT4/5: Neurotrofinas 4/5

p75NTR: *Neurotrophic Receptor* (Receptor de Neurotrofina)

PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinases* (Fosfatidilinositol 3 quinase)

RAS: *RAt Sarcoma virus*, (vírus do sarcoma de rato)

SNC: Sistema Nervoso Central

STM: *Short-Term Memory* (Memória de Curta Duração)

Trk: *Tropomyosin Related Kinase* (Receptores de Quinase Relacionados à Tropomiosina)

RESUMO

A cetamina é uma droga dissociativa utilizada como anestésico humano. Este fármaco é também utilizado como droga de abuso por conter efeitos psicotrópicos.

É sabido que a cetamina é um potente antagonista não competitivo do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo *N* metil-D-aspartato (NMDAr). A diminuição da neurotransmissão do glutamato pelos receptores NMDA está associada com a alteração da percepção, memória e cognição.

As neurotrofinas constituem uma família de fatores de crescimento multifuncionais crucial na sobrevivência, diferenciação, proliferação e manutenção de populações neuronais do sistema nervoso e exercem numerosos efeitos em células não neuronais. O fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) é uma neurotrofina que atua tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico e está relacionada com a sobrevivência dos neurônios, crescimento, diferenciação de novos neurônios e sinapses.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes doses de cetamina na memória de longa duração no modelo de reconhecimento de novo objeto e analisar os níveis de BDNF no hipocampo dos ratos após injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina.

Ratos Wistar machos adultos foram treinados em uma tarefa de reconhecimento de novo objeto e a retenção da memória foi avaliada 24 h após o treino. A administração pós-treino de cetamina prejudicou de forma dose-dependente a retenção da memória de reconhecimento. Experimentos controle mostraram que a cetamina não afetou a memória quando administrada 6 h após o treino ou 24 h antes do treino. Para a dosagem dos níveis de BDNF no hipocampo dorsal, os animais foram treinados e imediatamente receberam salina ou 20 mg/kg de cetamina e foram sacrificados 3 h mais tarde. Um kit de imunoenensaio enzimático tipo sanduíche com anticorpo monoclonal de coelho contra BDNF foi utilizado para a medição dos níveis de BDNF.

Palavras – chave: *memória, hipocampo, cetamina, BDNF, NMDAr*

ABSTRACT

Ketamine is a dissociative drug used as a human anesthetic. This drug is also used as a drug of abuse because it contains psychotropic effects. It is known that ketamine is a potent noncompetitive antagonist of glutamatergic ionotropic receptors type *N*-methyl D-aspartate (NMDAr).

The decrease in the neurotransmission of glutamate receptors is associated with the change of perception, memory and cognition. Neurotrophins constitute a family of multifunctional growth factors crucial for the survival and differentiation, proliferation and maintenance of neuronal populations of the nervous system and has numerous effects in non-neuronal cells. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin that acts both in the central nervous system and peripheral nervous system and is related to neuron survival, growth, differentiation of new neurons and synapses. The objective of this study was to evaluate the effects of different ketamine doses on long-term memory in the novel object recognition model and analyze the levels of BDNF in the hippocampus of rats after injection (ip) of ketamine. Adult male Wistar rats were trained in a task of recognition of new object and memory retention was evaluated 24h after training. The post-training administration of ketamine impaired in a dose-dependent retention of recognition memory. Control experiments showed that ketamine had no effect on memory when administered 6 h after training or 24 h before training. To measure the levels of BDNF in the dorsal hippocampus, the animals were trained and immediately injected with saline or 20 mg / kg of ketamine and sacrificed 3h later. A kit of sandwich enzyme immunoassay with rabbit monoclonal antibody against BDNF was used to measure the levels of BDNF.

Keywords: *memory, hippocampus, ketamine, BDNF, NMDAr*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aprendizado e Memória

Aprendizado é a aquisição de novas informações e novos conhecimentos, enquanto memória é a retenção desta informação (BEAR *et al.*, 2002). A maioria das informações que constituem a memória é aprendida por meio dos sentidos em episódios que costumam ser denominados experiências. Estas são adquiridas pelo processamento interno de memórias pré-existentes, modificadas ou não, que se denomina *insight* (IZQUIERDO, 2004).

A memória compreende a aquisição, a formação, a conservação (armazenamento) e a evocação de informações (IZQUIERDO *et al.*, 2002).

A aquisição é a experiência propriamente dita (CAMMAROTA *et al.*, 1998), seguida pelo processamento da informação, que recebe o nome de consolidação da memória. Esta fase se mostra mais lábil e suscetível a modificações (MCGAUGH, 2000). Uma vez consolidadas, ocorre o armazenamento, ou seja, a preservação da informação (IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH *et al.*, 1996, 2000). O armazenamento envolve diversas estruturas cerebrais, bem como, diferentes processos moleculares (IZQUIERDO *et al.*, 1997; 1999; 2004). Após armazenada, se necessário, ocorre a evocação da memória, o resgate da experiência. Por tanto, a evocação da memória, é a reativação de fragmentos distribuídos no sistema nervoso.

Seis estruturas cerebrais interligadas são fundamentais para o processo de evocação: o córtex pré-frontal, o hipocampo, os córtex entorrinal, parietal e cingulado anterior e a amígdala basolateral (BADDELEY, *et al.*, 1997; IZQUIERDO *et al.*, 1998a; 2000; 2002; VIANNA *et al.*, 2000). (Figura 1).

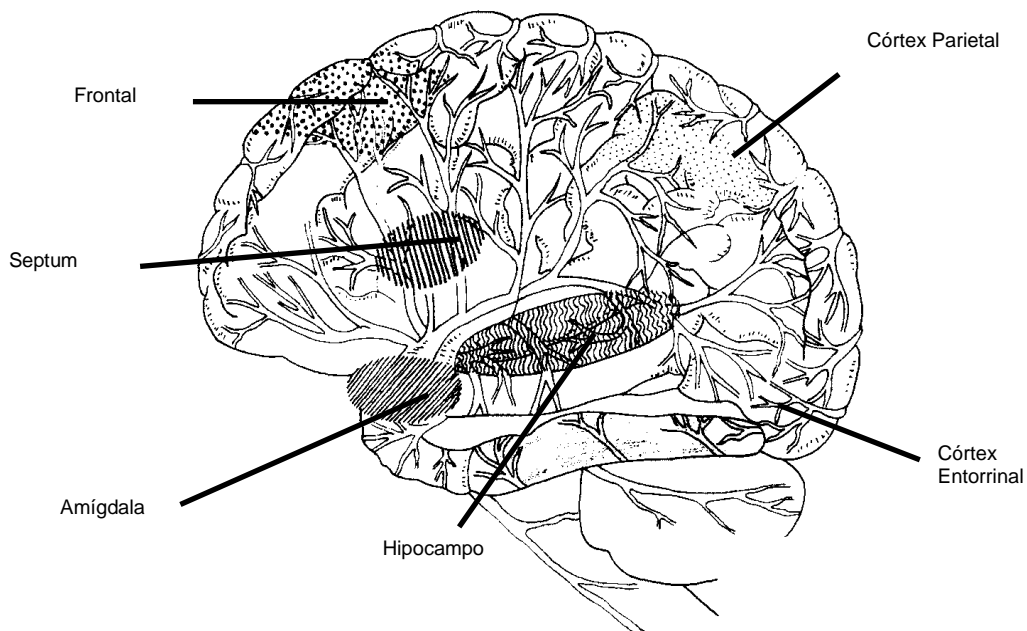


Figura 1. Mapeamento das principais áreas cerebrais envolvidas no processamento das memórias declarativas (Adaptado de IZQUIERDO *et al.*, 2002).

As memórias são classificadas de acordo com seu conteúdo (declarativas ou explícitas, procedurais ou implícitas) (SQUIRE, 1992), de acordo com sua natureza (memória de trabalho) (McGAUGH, 1966; GOLD & McGAUGH, 1977; CHERKIN, 1968), e ainda, de acordo com sua duração (memória de curta duração, do inglês *short-term memory* – *STM* e memória de longa duração, do inglês *long-term memory* - *LTM*) (GOLD & McGAUGH, 1977; GOLDMAN-RAKIC, 1992).

1.1.1 Memória Declarativa e Não-Declarativa

As memórias declarativas ou explícitas estão relacionadas a fatos, acontecimentos, lugares, objetos e pessoas, e requerem atenção e esforço consciente (IZQUIERDO, 2002).

As memórias não-declarativas ou implícitas são associadas a habilidades motoras aprendidas, e sua evocação é sempre inconsciente (BARCO *et al.*, 2006).

O processamento das memórias declarativas envolve o hipocampo, o córtex entorrinal, regiões vizinhas do córtex temporal inferior e outras áreas corticais. Entre as memórias declarativas, as mais aversivas, emocionais ou alertantes são fortemente moduladas pelos núcleos basal e lateral do complexo amigdalíneo, na ponta do lobo temporal (amígdala basolateral). As memórias não-declarativas são processadas preponderantemente pelo neo-estriado, pelo cerebelo e por sistemas a eles associados (SCOVILLE & MILNER, 1957; IZQUIERDO, 2004).

Memórias declarativas geralmente são fáceis de formar, porém também são facilmente esquecidas, e lesões no hipocampo e no lobo temporal afetam este tipo de memória (SQUIRE, 1992). Em oposição a esta, a formação de memórias não-declarativas tende a requerer repetição e prática durante um período maior, porém há menor probabilidade de serem esquecidas.

1.1.2 Memória de Trabalho

As memórias de trabalho constituem a interface entre a percepção da realidade pelos sentidos e a formação e evocação de memórias. As memórias de trabalho duram de segundos a no máximo de dois a três minutos, e são

responsáveis por gerenciar nossa realidade. Elas determinam se a informação é útil para o organismo e se devem ser armazenadas, se existem outras informações semelhantes em nossos arquivos de memória e, por último, se esta informação deve ser descartada quando já existe ou se não possui utilidade (VOGT, 2009).

Neurônios do córtex pré-frontal ântero-lateral reconhecem o início e o fim de cada experiência e os distinguem do meio. Isso é feito com a intervenção de circuitos que ligam o córtex pré-frontal com o córtex temporal inferior, principalmente o entorrinal, o hipocampo e a amígdala basolateral. O funcionamento destes circuitos é rápido, e, assim, o cérebro reconhece se a informação que está sendo colhida no momento é nova e importante e/ou requer uma resposta imediata ou não (IZQUIERDO, 2004, p.367).

1.1.3 Memória de Curta e Longa Duração

As memórias de curta duração (STM) são do tipo declarativas, persistem por minutos a poucas horas e são vulneráveis a perturbações, enquanto que as memórias de longa duração (LTM) podem ser recordadas por dias, semanas ou anos após terem sido armazenadas (IZQUIERDO *et al.*, 2002) (Figura 2). A formação da LTM ocorre em aproximadamente 3 a 6 horas e envolve processos moleculares na região CA1 do hipocampo e suas conexões (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; O'CONNELL *et al.*, 1997).

Durante muito tempo a memória de curta duração foi relatada como um processo diretamente relacionado à formação da memória de longa duração. Atualmente, estudos demonstram que a STM pode ser reprimida sem afetar a

LTM, ou seja, ambas ativam fenômenos diferentes, recrutando eventos celulares e moleculares de forma distinta (IZQUIERDO *et al.*, 1999).

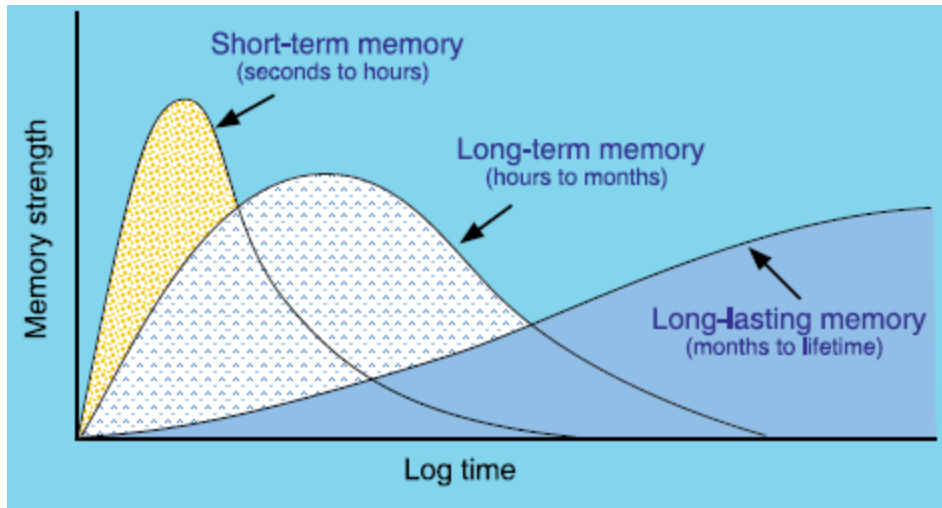


Figura 2. Fases da consolidação da memória de curta e longa duração, propondo que a consolidação de nova memória é dependente do tempo e sugerindo que as memórias de curta e longa duração se formam por processos independentes (Adaptado de McGAUGH *et al.*, 2000).

1.2 Mecanismos Importantes na Formação da Memória

O córtex pré-frontal ântero-lateral é crucial para LTM, mas não está envolvido na STM. O hipocampo, córtex entorrinal e parietal são cruciais para todos os tipos de memória, com receptores diferentes envolvidos em cada um. A amígdala não está envolvida na STM, mas desempenha um papel fundamental na modulação da fase inicial da LTM (IZQUIERDO *et al.*, 1999).

Estudos recentes indicam que fatores neurotróficos são importantes para a consolidação e evocação da memória. WALZ e colaboradores (2000) mostraram melhora na consolidação após infusão de fator de crescimento nervoso (*Nerve Growth Factor* - NGF). Resultados recentes também sugerem

que o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* - BDNF) é fundamental para a formação de STM e LTM (ALONSO *et al.*, 2002a, b).

1.2.1 Neurotrofinas

As neurotrofinas formam uma família de fatores de crescimento que tem um papel crucial na sobrevivência, diferenciação, proliferação e manutenção das populações neuronais no sistema nervoso (KRÜTTGEN *et al.*, 2006).

Em mamíferos esta família consiste em quatro membros, incluindo BDNF, NGF, neurotrofina-3 (NT3) e neurotrofinas 4/5 (NT4/5) (BOTHWELL, 1995).

Essas neurotrofinas se ligam a duas diferentes classes de receptores de membrana: os receptores de quinase relacionados à tropomiosina (*tropomyosin related kinase*, ou Trk), e o receptor de neurotrofina p75NTR (BIBEL & BARDE, 2000). A ativação dos receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelulares como RAS, MAPK/ERK e PI3K (BOTHWELL, 1995; ATWAI *et al.*, 2000; BIBEL & BARDE, 2000; BARNABÉ-HEIDER & MILLER, 2003; ABUJAMRA *et al.*, 2006).

Todas as neurotrofinas se ligam com baixa afinidade ao p75NTR, porém cada uma delas possui um receptor de ligação com maior especificidade. O NGF se liga ao receptor TrkA, BDNF e NT-4/5 se ligam a TrkB, NT-3 ativa TrkC que pode ativar, com baixa afinidade outros receptores Trk (HUANG & REICHARDT, 2001) (Figura 3).

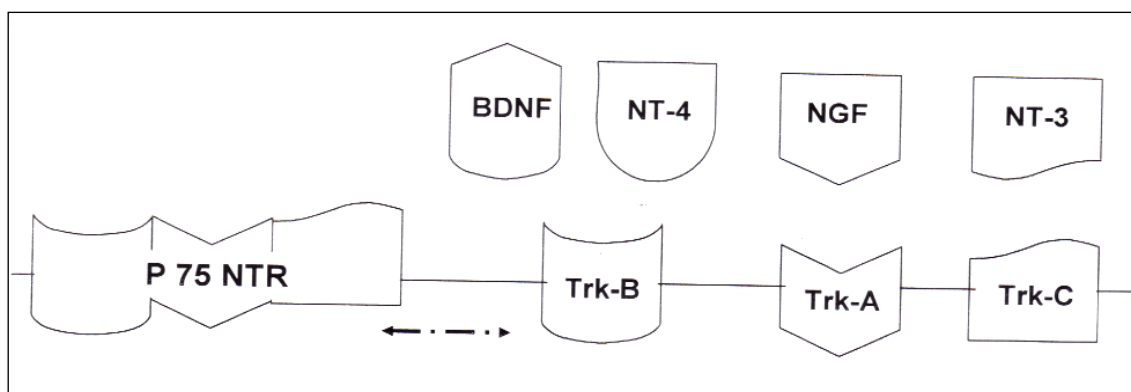


Figura 3. Neurotrofinas e seus receptores específicos. NGF se liga ao receptor TrkA, BDNF e NT-4/5 se ligam a TrkB, NT-3 ativa TrkC. (adaptado de NAKAGAWARA, 2001).

1.2.1.2 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

O BDNF é um polipeptídeo que possui um importante papel na sobrevivência, crescimento e diferenciação de novos neurônios e é amplamente expresso no cérebro de mamíferos (SCHINDER & POO, 2000; TYLER *et al.*, 2002). Em particular, é fundamental para a plasticidade sináptica e processos de formação de memória em adultos (ALONSO *et al.*, 2002; YAMADA & NABESHIMA, 2003; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

BDNF induz a potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo (PANG *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 1997), uma forma de plasticidade sináptica importante para formação de LTM (MORRIS, 2003; WHITLOCK *et al.*, 2006).

Esse polipeptídeo é sintetizado nos corpos celulares dos neurônios sensoriais primários e expresso pelos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro no corno dorsal (ZHAO & ZHANG, 2005). É transportado do terminal central pelos aferentes primários, liberado na porção dorsal espinhal ligando-se ao receptor TrkB por neurônios sensoriais de segunda ordem. Atua como

modulador da plasticidade sináptica do sistema nervoso central e periférico, regulando a excitabilidade e maturação neuronal (SZAPACS *et al.*, 2004).

Sabe-se também que esta neurotrofina exerce uma atividade modulatória na sinapse hipocampal e que está diretamente envolvida com a memória e aprendizado (SCHINDER & POO, 2000; HUANG & REICHARDT, 2001; MALCANGIO & LESSMANN, 2003).

A deleção ou inibição do gene de BDNF produz uma deficiência na memória de longa duração. Esta deficiência na função sináptica pode ser corrigida por aplicação exógena de BDNF (PATTERSON *et al.*, 1996; FIGUROV *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que BDNF pode estar envolvido com receptores de glutamato, uma vez que BDNF aumentou a rapidez de resposta de receptores glutamatérgicos NMDA via receptores pós-sináptico de TrkB (LEVINE & KOLB, 2000; POO, 2001), enquanto que o bloqueio dos receptores de glutamato NMDA no hipocampo prejudicou LTM em testes de esQUIVA inibitória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

1.2.1.3 Glutamato e seus Receptores

O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido na formação da memória e aprendizado. Além disso, o glutamato pode destruir neurônios do SNC por ativação excessiva de receptores excitatórios sobre a superfície dendrítica e somal (OZAWA *et al.*, 1998; NEWCOMER & KRYSTAL, 2001).

Duas classes principais de receptores de glutamato, ionotrópicos e metabotrópicos, foram identificados. Receptores glutamatérgicos ionotrófico (iGluR, *íon channel coupled*) e metabotrófico (mGluR, *second messenger*

coupled) são diferentemente distribuídos em sítios pré e pós sinápticos para contribuir na comunicação neuronal e processos de sinalização, funções fundamentais para o aprendizado e a formação da memória (RIEDEL *et al.*, 2003; CAROBREZ, 2003) (Figura 4).

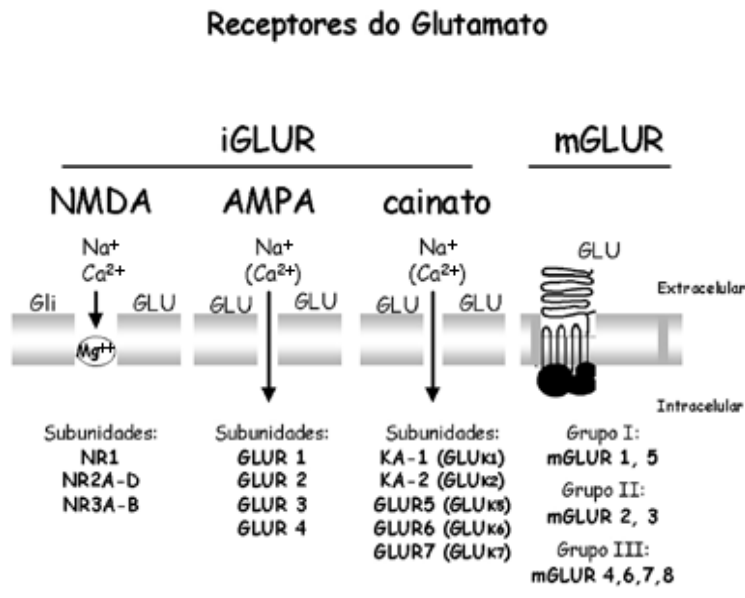


Figura 4. Receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato e as composições das subunidades (Adaptado de CAROBREZ 2003).

Três diferentes tipos de receptores glutamatérgicos são inicialmente ativados seguidos por mudanças em mensageiros secundários e cascatas bioquímicas conduzidas pelo aumento da atividade de proteínas quinases A, C, G e cálcio-calmodulina proteína quinase II, ocorrendo, assim, mudanças nas subunidades dos receptores de glutamato (IZQUIERDO & MEDINA, 1998; 1999).

Glutamato exerce atividade excitotóxica através de três subtipos de receptores ionotrópicos. Estes três receptores são nomeados a partir dos seus

agonistas a que são diferencialmente sensíveis: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico (AMPA) e cainato (*kainate* - KA) (STRAYER & NELSON, 2008). Destes três, o receptor NMDA tem sido o mais amplamente estudado e o mais freqüentemente implicados em doenças do SNC (OLNEY, 1990; CHOI *et al.*, 1992; NEWCOMER & KRYSTAL, 2001).

Existe uma sequência de eventos bioquímicos, verificados no hipocampo de ratos, necessários para a formação da memória. Diferentes estudos genéticos e farmacológicos mostram que os receptores glutamatérgicos de tipo NMDA estão intensamente envolvidos neste processo (ROESLER *et al.*, 2003; 2005). Receptores NMDA estão amplamente distribuídos no cérebro e densamente no hipocampo e neo-córtex (CHROBAK *et al.*, 2008).

O receptor NMDA é composto por diferentes subunidades, tais como, NR1, subunidade NR2 que por sua vez é dividida em A, B, C, D e subunidade NR3 A e B (CULL-CANDY *et al.*, 2001) (Figura 5).

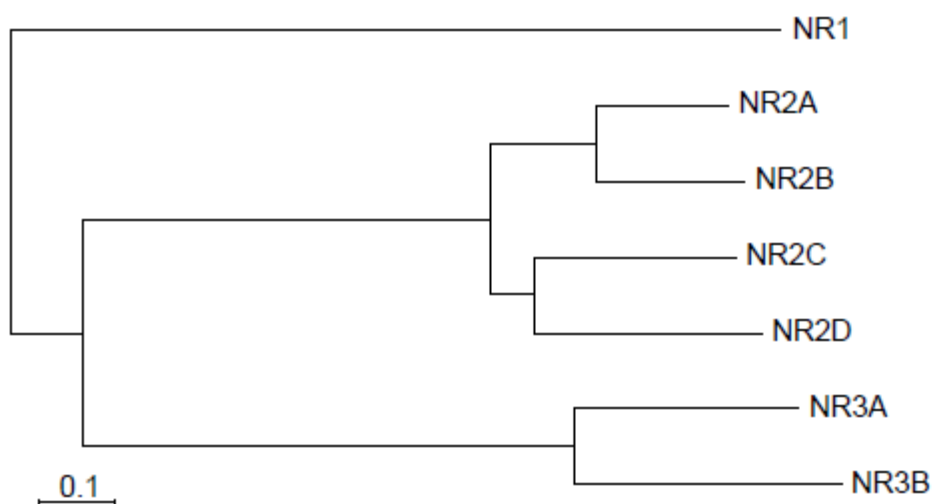
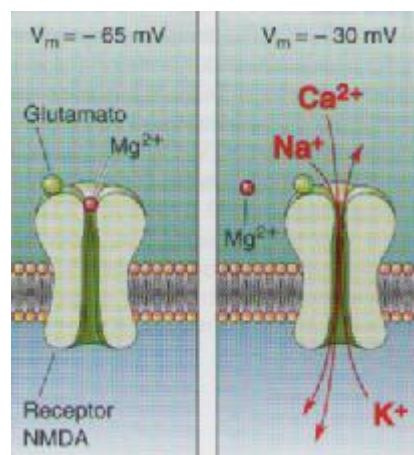


Figura 5. Diversidade de subunidades dos receptores NMDA (adaptado de CULL-CANDY *et al.*, 2001).

Quando o canal ativado por NMDA é aberto, Ca^{++} e Na^+ são internalizados na célula, que libera K^+ . Quando o glutamato liga-se ao receptor NMDA, o poro abre-se normalmente. Em potenciais normais de repouso o canal torna-se bloqueado por íons Mg^{++} e tal bloqueio impede a livre passagem de outros íons através do canal. O Mg^{++} sai do poro somente quando a membrana está despolarizada. Portanto, correntes iônicas de entrada através do canal NMDA são dependentes de voltagem, além de serem ativadas por transmissor. Tanto a ligação de glutamato quanto a despolarização devem ocorrer simultaneamente para que o canal permita a passagem de corrente (BEAR, 2004; NAKAZAWA, 2001) (Figura 6).



(a) Glutamato (b) Glutamato e Despolarização

Figura 6. Fluxo de corrente iônica de entrada através do canal ativado por NMDA. (a) O glutamato causa a abertura do canal, mas, no potencial de membrana de repouso, o poro torna-se bloqueado por íons Mg^{++} . (b) A despolarização da membrana libera o bloqueio pelo Mg^{++} e permite que Na^+ e Ca^{++} entrem (adaptado de BEAR, 2004).

Existem algumas drogas que são consideradas antagonistas do receptor NMDA. Algumas delas são fenciclidina (PCP), óxido nítrico, dizocilpina (MK801), memantina e cloridrato de cetamina (ELLISON, 1995; HERMAN *et al.*, 1995).

1.3 Cloridrato de Cetamina

Cloridrato de cetamina é um agente dissociativo que foi utilizado pela primeira vez em humanos em 1965 (DOMINO *et al.*, 1965).

A cetamina é utilizada, também como um agente anestésico em algumas espécies de animais (ANIS *et al.*, 1983). Suas propriedades anestésicas são caracterizadas por boa analgesia, manutenção dos reflexos, pequeno relaxamento muscular e manutenção ou estimulação da pressão arterial e frequência cardíaca (McCARTHY *et al.*, 1965; WEISBROTH & FUDENS, 1972; GLEN, 1973). Este fármaco foi clinicamente aceito por não causar danos cardiorespiratórios quando usados em doses terapêuticas (STRAYER & NELSON, 2008). E é utilizado como um agente *standard* em processos de sedação pediátricos (GREEN & KRAUSS, 2004).

Essa droga deprime a atividade de alguns neurônios seja espontaneamente, evocada pelo nervo aferente, por estimulação natural ou induzida pelo glutamato (CONSEILLER *et al.*, 1972; RAJA & GUYENET, 1982).

É sabido que a cetamina é considerada um antagonista não competitivo do receptor N-methyl-D-aspartate (NMDAr) bloqueando o canal do NMDA ativado pelo glutamato (ANIS *et al.*, 1983; HAAS & HARPER, 1992).

Esse fármaco foi considerado um neuroprotetor em diversos modelos animais com dano cerebral. Ele exerce este papel bloqueando a estimulação

excessiva do NMDAr que por sua vez reduz o influxo de cálcio através do canal do receptor (HIMMELSEHER & DURIEUX, 2005).

Alguns estudos demonstram que o uso recreacional de cetamina está altamente associado com alterações cognitivas e elevação de sintomas psicopatológicos (MORGAN & CURRAN, 2006; MORGAN *et al.*, 2009; RICAURTE & MCCANN, 2005). Além disso, a utilização deste fármaco como droga de abuso tem aumentado, classificando-a como uma das principais drogas de uso recreacional (PAVARIN, 2006; MUETZELFELDT *et al.*, 2008), ver tabela 1.

	Female						Male					
	Lifetime	%	Last year	%	Last month	%	Lifetime	%	Last year	%	Last month	%
Marijuana	558	66.2	436	51.7	351	41.6	915	78.1	737	62.9	624	53.2
Hashish	475	56.3	380	45.1	326	38.7	863	73.6	720	61.4	635	54.2
Cocaine	235	27.9	154	18.3	76	9.0	485	41.4	329	28.1	172	14.7
Popper	163	19.3	61	7.2	20	2.4	378	32.3	186	15.9	65	5.5
Hallucinogenic mushrooms	144	17.1	80	9.5	22	2.6	345	29.4	182	15.5	50	4.3
Ecstasy	143	17.0	80	9.5	37	4.4	318	27.1	190	16.2	117	10.0
Amphetamines	129	15.3	72	8.5	42	5.0	307	26.2	191	16.3	115	9.8
LSD	120	14.2	42	5.0	21	2.5	312	26.6	133	11.3	50	4.3
<i>Salvia divinorum</i>	88	10.4	59	7.0	18	2.1	214	18.3	154	13.1	52	4.4
Opium	86	10.2	49	5.8	24	2.8	246	21.0	126	10.8	68	5.8
Ketamine	73	8.7	42	5.0	23	2.7	150	12.8	88	7.5	51	4.4
Psychiatric medication	53	6.3	20	2.4	8	0.9	114	9.7	47	4.0	23	2.0
Crack	30	3.6	18	2.1	9	1.1	92	7.8	52	4.4	25	2.1
Heroin	45	5.3	23	2.7	14	1.7	137	11.7	67	5.7	42	3.6
Benzodiazepine	19	2.3	8	0.9	4	0.5	55	4.7	30	2.6	13	1.1

Tabela 1. Estatísticas separadas para homens e mulheres quanto ao uso de drogas em sua vida, no último ano e no último mês no Norte da Itália (adaptado de PAVARIN, 2006).

2 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos de diferentes doses de cetamina na memória de longa duração no modelo de reconhecimento de novo objeto, utilizando ratos Wistar machos adultos. O papel da cetamina diretamente sobre a consolidação da memória, bem como se existia algum efeito tardio do fármaco quando administrado 24 h antes do treino foi avaliado. Além disso, foram realizados experimentos analisando os níveis de BDNF no hipocampo de ratos, após injeção de cetamina na dose de 20 mg/kg, comparando treino, exposição à habituação ao *open field* e caixa moradia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais foram obtidos através da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa Saúde (FEPPS-RS, Porto Alegre, RS, Brasil). Para este estudo foram utilizados ratos Wistar machos, de 2 a 4 meses, pesando de 200 a 400g. Foram mantidos 5 animais por caixa moradia, com controle do ambiente, em ciclo claro/escuro e comida e bebida *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados na fase clara do ciclo entre as 9:00 e 17:00h e conduzidos de acordo com o NIH *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC).

3.2 Grupo Experimental e Teste de Reconhecimento de Novo Objeto

Ratos têm a tendência natural em explorar novos objetos a que objetos já familiares. Esta preferência pode ser utilizada como um índice de reconhecimento (MUMBY *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, o teste de reconhecimento de novo objeto tem sido bastante utilizado e com sucesso como uma ferramenta para caracterização de alterações cognitivas relacionadas ao envelhecimento, manipulações genéticas, tratamentos neurotóxicos ou induzidas por drogas (DE LIMA *et al.*, 2006).

O *open field* é uma caixa com piso e três paredes de madeira e uma parede de vidro com 46 cm de comprimento, 37,5 cm de largura e 39,5 cm de altura. Para este experimento os animais foram pesados e marcados na cauda com caneta para identificá-los em cada grupo. Os animais foram manipulados individualmente sobre uma toalha no colo do pesquisador por um minuto e

trinta segundos para que ele se acostume com o pesquisador (*handling*). O piso do *open field* foi coberto por uma camada fina de serragem e os animais exploraram a caixa por dois minutos para habituação. A caixa foi higienizada com álcool 70% após cada exposição, retirando todas as fezes e urina deixadas pelo rato. Não retirando toda a serragem já existente. Os objetos foram posicionados em duas extremidades do *open field* com uma distância de 9 cm das paredes.

O animal deveria completar trinta segundos de exploração de ambos os objetos em um período máximo de vinte minutos. Caso ele não atingisse o critério, ele deveria ser excluído do estudo.

Foi considerado como exploração: cheirar o objeto movimentando ativamente as vibrissas, tocar o objeto com o nariz e “morder” o objeto.

Não foi considerado como exploração: o rato subir no objeto e ficar parado sobre ele, o rato ficar tentando descolar a fita adesiva que prende o objeto a caixa e o rato ficar olhando para o objeto sem mover as vibrissas.

A memória de curta duração (STM) foi avaliada 1 h e 30 min após o treino e 24 h após o treino foi testada a memória de longa duração (LTM). Para esta avaliação um dos objetos colocados na caixa para o treino foi trocado por um terceiro novo objeto.

Quatro experimentos distintos foram realizados. No primeiro grupo para o teste de reconhecimento de novo objeto cada animal foi submetido a uma manipulação individual (*handling*) de 1 min e 30 seg no primeiro dia. No dia posterior foi realizada a habituação individual ao *open-field* por 2 minutos. No terceiro dia foi realizado o treino, utilizando o critério de 30 segundos de exploração de ambos os objetos num período máximo de 20 minutos, logo

após o treino foram injetadas i.p. diferentes doses de cetamina (4, 8, 20 mg/kg) e doses de salina - controle. 24 h após o treino os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de novo objeto para avaliação da memória de longa duração (*Long Term Memory*, LTM). No segundo experimento os animais foram manipulados, até o terceiro dia, de forma idêntica ao teste de reconhecimento de novo objeto que avaliou o déficit cognitivo 24 h após o treino. No terceiro dia os animais receberam injeções i.p. de salina ou 20 mg/kg de cetamina 6 h após o treino, diferentemente do primeiro experimento, com a finalidade de avaliarmos se a droga estava agindo diretamente na consolidação da memória. 24 h após o treino os animais foram testados com a mesma tarefa de reconhecimento de novo objeto. Este teste foi identificado como Controle de Efeito Inespecífico. O terceiro experimento foi denominado Controle de Efeito Tardio, com o propósito de analisar algum tipo de dano na memória relacionado à toxicidade do anestésico. Para isso foi elaborado um experimento onde os animais foram submetidos ao *handling* de 1 min e 30 seg no primeiro dia e no segundo dia a habituação individual ao *open-field* com duração de dois minutos. Neste mesmo dia foi administrado i.p. doses de 20 mg/kg de cetamina ou salina-controle nos animais 24 h antes do treino. No terceiro dia os animais foram treinados utilizando os mesmos critérios dos experimentos anteriores e testados 1 h e 30 min após o treino para avaliação da memória de curta duração (*Short Term Memory*, STM). No quarto dia os animais foram testados para avaliação de LTM com a substituição do novo objeto por um terceiro novo objeto, seguindo o protocolo anterior.

3.3 Avaliação dos Níveis de BDNF no Hipocampo de Ratos

Diferentes grupos foram elaborados para este experimento. Grupos expostos simplesmente a caixa moradia, grupos expostos durante dez minutos ao *open-field* e grupos submetidos ao treino de reconhecimento de objeto. Para a avaliação dos níveis de BDNF hipocampal os animais foram tratados com salina-controle ou 20 mg/kg de cetamina, sacrificados por decapitação 3 h após a injeção e os cérebros retirados. Fatias dos cérebros (hipocampo) foram homogeneizadas com PBS, 1mM de PMSF e 1mM de EGTA e congeladas a -80° C. Para a realização da técnica as amostras foram descongeladas. Uma curva padrão com diluições seriadas 1:2 de 0 até 7 utilizando-se o diluente da amostra (n° do catálogo 60240) foi preparada e adicionada na placa em duplicatas num volume de 100 uL. As amostras foram também inoculadas com o mesmo volume em cada poço. A placa foi coberta e incubada de 2°C a 8°C *overnight*. Após o período de incubação, o meio foi removido e a placa foi lavada quatro vezes com 250 µL do tampão de lavagem (n° do catálogo 60245). Imediatamente, 100 µL de anticorpo monoclonal biotilado de rato anti-BDNF humano (n° do catálogo 60583) foi acrescido na placa em uma concentração 1:1000, permanecendo incubado por 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as lavagens foram repetidas. Então, 100µL da solução diluída com streptavidina-HRP conjugada (n° do catálogo 60582) numa concentração 1:1000 foi adicionada e incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, a solução foi retirada e houve uma nova lavagem como descrito anteriormente. Uma nova incubação ocorreu, desta vez por 15 minutos, usando 100 µL da solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (n° do catálogo 60096). A reação foi finalizada,

acrescentando 100 μ L da solução de parada (n° do catálogo 60260) por poço, seguida da leitura da placa em 450nm.

3.4 Análise Estatística

Os dados referentes aos testes de reconhecimento de novo objeto estão expressos como mediana (amplitude interquartílica). As comparações entre grupos foram realizadas utilizando um teste de Kruskal-Wallis, análise de variância seguida pelo teste de Mann-Whitney U, bicaudal quando necessário. As comparações dentro do mesmo grupo foram realizadas pelos testes de Wilcoxon. Os dados relacionados à avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo de ratos foram expressos como média \pm erro padrão da media (SEM). Comparações de parâmetros entre os diferentes grupos experimentais foram realizados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de testes *pos hoc* adequados quando ANOVA revelou diferenças significativas entre os grupos. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística.

4 RESULTADOS

Considerando a ação antagonista da cetamina nos receptores NMDA, objetivamos avaliar os efeitos de diferentes doses de cetamina na memória de longa duração dos animais quando submetidos ao teste de reconhecimento de novo objeto. A administração pós-treino de diferentes doses de cetamina (4, 8 ou 20 mg/Kg) prejudicou de forma dose-dependente a retenção da memória de reconhecimento de novo objeto (figura 7).

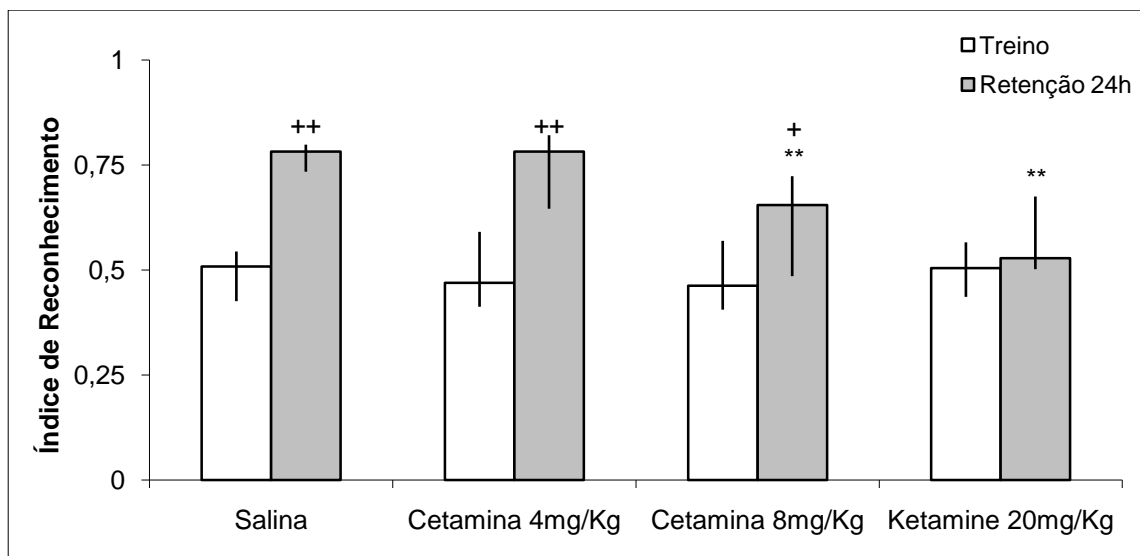


Figura 7. Avaliação da administração de diferentes doses de cetamina na formação da memória de longa duração pelo teste de reconhecimento. Os grupos foram divididos em grupo salina-controle e 4, 8 e 20 mg/kg de cetamina. Todos os grupos foram treinados e testados. ** $P < 0,01$, diferença significativa nas doses de 8 e 20mg/kg de cetamina (Mann–Whitney U -test); ** $P < 0,01$, diferença significativa entre os grupos Treino e Teste na dose de 4mg/kg (Wilcoxon); + $P < 0,05$, na dose de 8mg/kg há diferença significativa entre os grupos Treino e Teste (Wilcoxon).

Após a avaliação da resposta dose-dependente os animais foram submetidos a dois diferentes testes controle, visando entender de que forma a cetamina prejudicou a formação da memória.

Este teste, denominado Controle de Efeito Inespecífico, demonstrou que a cetamina não afetou a memória quando administrada 6h após o treino, indicando que este fármaco atua diretamente na consolidação da memória (figura 8).

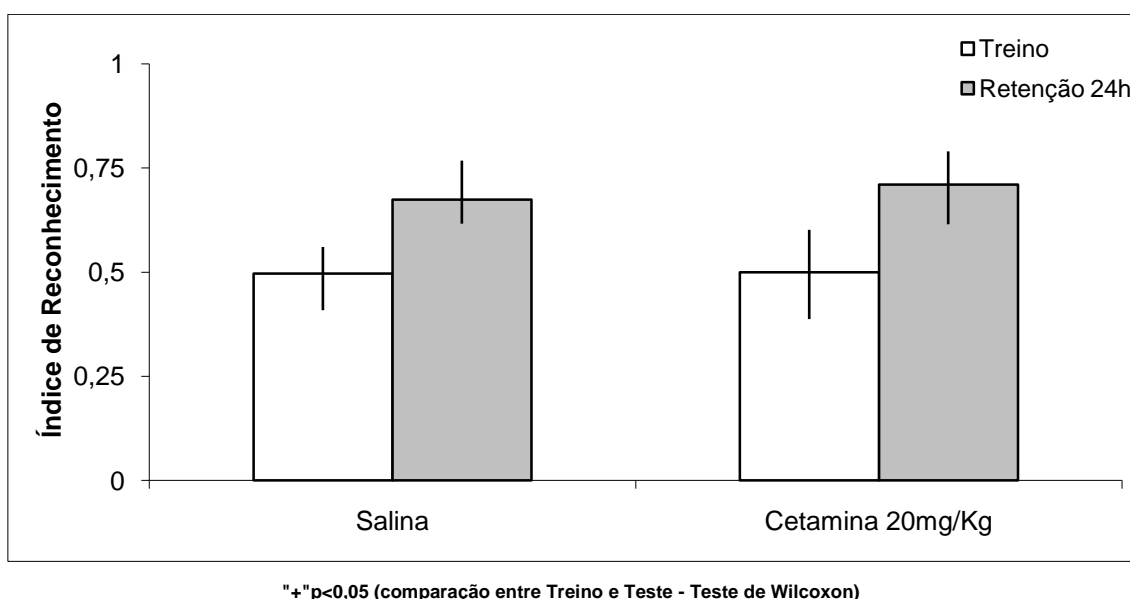


Figura 8. Avaliação dos efeitos de cetamina injetadas i.p 6h após o treino. Não houve diferença significativa entre os grupos teste-salina e teste-cetamina após 24h de retenção da memória. Os grupos quando comparados entre si (treino-salina X teste-salina e treino-cetamina X teste-cetamina) apresentaram aprendizado. Comparação entre treino e teste através do Teste de Wilcoxon ("+"p<0,05).

O terceiro experimento controle, denominado Controle de Efeito Tardio, onde os animais foram injetados com 20 mg/kg de cetamina (dose mais efetiva) 24 h antes do treino, mostrou que tanto na avaliação da memória de curta

duração (STM) quanto na avaliação da memória de longa duração (LTM), não houve nenhum declínio no aprendizado (figura 9).

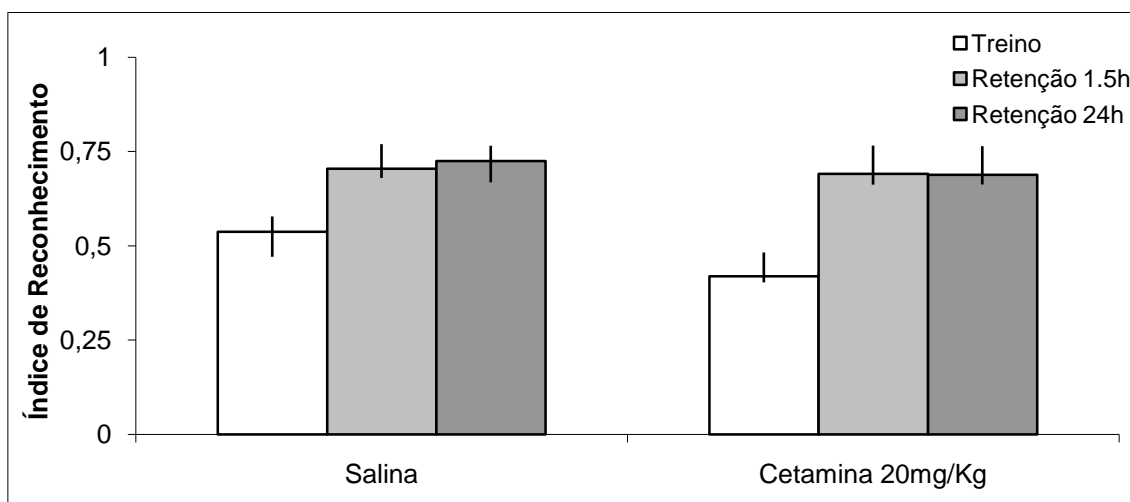


Figura 9. Avaliação dos efeitos de cetamina na STM e LTM quando injetas i.p 24h antes do treino. Não houve diferença significativa quando os grupos teste-salina 1.5h e teste-salina 24h foram comparados. O mesmo ocorreu com a comparação dos grupos teste-cetamina 1,5h e teste-cetamina 24h. Os grupos treino e teste quando comparados entre si apresentam diferença significativa demonstrando o aprendizado. Comparação entre Treino e Teste - Teste de Wilcoxon ("+" $p < 0,05$).

No quarto experimento, que visou avaliar os níveis de BDNF no hipocampo de ratos, percebemos um aumento significativo desta neurotrofina quando os animais foram submetidos ao aprendizado (figura 10).

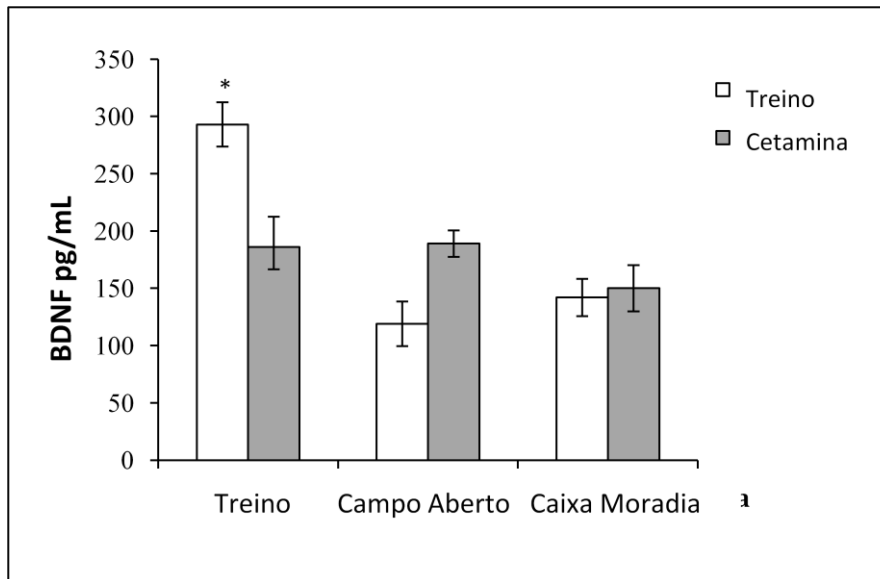


Figura 10. Avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo de ratos três horas após administração i.p de cetamina ou salina. Houve diferença significativa entre o grupo treino-salina em relação a todos os outros grupos quando analisados por teste de Turkey ($p < 0,000$).

5 DISCUSSÃO

Diferentes estudos já foram realizados para relacionar a utilização da cetamina com o déficit cognitivo. Trabalhos como de WANG e colaboradores (2006) mostraram que doses anestésicas de cetamina afetaram a consolidação da memória quando avaliados pelo teste *T-maze*, enquanto que subdoses desta droga não interferiram na recuperação da memória.

Doses agudas de cetamina prejudicaram a memória episódica e o processamento semântico, mas não a manutenção da informação da memória de trabalho, sugerindo que doses agudas de cetamina podem afetar não somente a memória explícita como também algumas tarefas de memória implícita (MORGAN *et al.*, 2009).

GARCIA e colaboradores (2008) testaram os efeitos da administração crônica de cetamina no teste de condicionamento aversivo e relataram que a administração repetida desta droga prejudicou a memória aversiva e teve efeito duradouro na codificação de estímulos sensoriais.

Outros autores demonstraram que o tratamento agudo com cetamina também prejudicou a memória de condicionamento aversivo, sugerindo que esse déficit é causado pelo bloqueio dos receptores NMDA (NMDARs), que são necessários para o condicionamento pavloviano (PIETERSEN *et al.*, 2006).

A cetamina provocou a neurodegeneração apoptótica generalizada depois de repetidas administrações (SCALLET *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005), e se mostrou neurotóxica com efeito dose e tempo dependente da exposição à droga (ZOU *et al.*, 2009).

Os nossos experimentos sugerem que baixas doses de cetamina não interferem no aprendizado quando os animais são avaliados no teste de reconhecimento de novo objeto, demonstrando que o antagonista não competitivo do NMDAr afeta a retenção da memória de forma dose dependente.

Para a memória ser consolidada é necessário aproximadamente seis horas após uma nova experiência. Para testarmos de que forma a cetamina age interferindo no aprendizado, nós injetamos 20 mg/kg deste fármaco seis horas após o treino de reconhecimento de objeto. Neste experimento, verificamos que cetamina atua diretamente na consolidação da memória, pois foi constatado que não houve diferença na retenção da memória dos animais tratados e não-tratados.

Estudos com linhagens celulares cerebrais tratadas com diferentes doses de cetamina sugerem um aumento dose-dependente de neurotoxicidade, e que cetamina em altas doses induz morte celular (WANG *et al.*, 2005).

O nosso experimento denominado Controle de Efeito Tardio, que teve como objetivo avaliar se existiria algum déficit neuronal causado por uma administração única da dose mais efetiva do fármaco (20 mg/kg), não mostrou nenhum tipo de dano na retenção da memória de curta e longa duração quando a cetamina é administrada 24 h antes do treino de reconhecimento de novo objeto, corroborando com a hipótese de que cetamina age diretamente na consolidação da memória.

GARCIA e colaboradores (2008) demonstraram que administração aguda de cetamina aumentou os níveis de BDNF no hipocampo de ratos no

teste de nado forçado, e que, administração crônica, mas não aguda com outros antagonistas não competitivos do receptor glutamatérgico NMDA induzem aumento de expressão de BDNF.

BEKINSCHTEIN e colaboradores (2007) caracterizaram o BDNF como essencial para indução da persistência da memória de longa duração.

Outros estudos sugerem que déficits cognitivos e alterações da extinção da memória aversiva encontrados em modelos de depressão e ansiedade podem estar diretamente relacionados à diminuição de BDNF no hipocampo (HELDT *et al.*, 2007). E, avaliações da expressão de BDNF demonstraram que essa neurotrofina é restrita a região CA1 do hipocampo durante o um contexto de aprendizado (HALL *et al.*, 2000).

Os nossos resultados do teste de BDNF e cetamina mostraram que o treino de reconhecimento de novo objeto aumentou os níveis de BDNF hipocampal sem alteração destes níveis quando os animais tratados ou não tratados foram simplesmente expostos à caixa moradia ou ao *open-field*. A finalidade destes dois últimos grupos era mostrar os níveis basais de BDNF quando expostos a um novo contexto (*open-field*) ou simplesmente não expostos (caixa-moradia) e compará-los com os grupos submetidos ao treino. Mostramos também que a administração de 20 mg/kg de cetamina interfere nos níveis de BDNF hipocampal após o treino de reconhecimento quando relacionada com o grupo salina-controle pós treino.

Nós sugerimos, então, que o aprendizado aumenta a concentração de BDNF no hipocampo, e que a cetamina, em tarefas que necessitam de aprendizado, interfere no aumento da concentração desta neurotrofina. Estes

resultados validam o teste de reconhecimento de novo objeto como uma nova ferramenta para avaliação de níveis de BDNF.

Como já mencionado anteriormente, a cetamina além de ser empregada clinicamente é também utilizada de forma recreacional. A forma como este fármaco pode ser administrado é abundante já que a cetamina pode ser injetada, inalada, queimada quando misturada com tabaco ou outras drogas e/ou ingerida. A utilização indiscriminada desta droga faz com que seus usuários não tenham controle de doses e fiquem expostos a possíveis danos.

Por exemplo, o caso de um homem adulto que teve o diagnóstico de cistite após iniciar a utilização recreacional de cetamina, descrito por COLEBUNDERS & VAN ERPS (2008) num *case report*.

Além disso, YEUNG e colegas (2009) constataram a presença de agregados de células brancas mononucleares nos rins, bexiga urinária, pelve e ureter de camundongos que receberam administrações semanais de 30 mg/kg de cetamina, sugerindo que essa longa exposição pode causar propensão a infecção urinária.

As características histopatológicas de pacientes diagnosticados com cistite que utilizavam cetamina recreacionalmente foi avaliada por OXLEY e colaboradores (2009), que concluíram que a cetamina pode induzir mudanças no urotélio semelhante ao que é visto em carcinomas *in situ*. Entretanto, o risco de desenvolvimento de neoplasia ainda permanece desconhecido.

A utilização da cetamina tem sido também estudada como um possível modelo experimental de esquizofrenia. Esta droga induz sintomas semelhantes ao da esquizofrenia em pacientes saudáveis e aumentam estes sintomas em pacientes esquizofrênicos (KRYSTAL *et al.*, 1994) principalmente pelo fato de

disfunções relacionadas ao glutamato, e especificamente, a hipofunção no receptor NMDA estarem envolvidas na patofisiologia da esquizofrenia (ROWLAND *et al.*, 2005).

Uma melhor compreensão das conseqüências fisiológicas e cognitivas deste antagonismo pode fornecer melhores modelos de psicose e terapia cognitiva.

Neste estudo sugerimos que a cetamina interage diretamente na consolidação da memória, sendo esta de forma dose-dependente. A cetamina quando administrada 24h antes do treino não apontou nenhuma diferença no aprendizado, apoiando a hipótese de que este fármaco atua na consolidação da memória. Vimos pela primeira vez, que o teste de reconhecimento de novo objeto mostra-se uma excelente ferramenta para avaliação da concentração de BDNF, já que nesta tarefa há o aumento deste polipeptídeo quando ocorre a exploração aos objetos, corroborando com a hipótese de que consolidação da memória exige a participação do fator neurotrófico derivado do cérebro proposta por LEE e colaboradores (2004).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJAMRA, A. L.; SPANJAARD, R. A.; AKINSHEYE, I.; ZHAO, X.; FALLER, D. V. & GHOSH, S. K. Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology*, 345(2):390-403, 2006.

ALONSO M, VIANNA, M. R. M.; DEPINO, A. M.; E SOUZA, T. M.; PEREIRA, P.; SZAPIRO, G.; VIOLA, H.; PITOSI, F.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, 12:551–560, 2002a.

ALONSO, M.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, 22: 663-674, 2002b.

ANIS, N. A.; BERRY, S. C.; BURTON, N. R. & LODGE, D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmac*, 79,565-575, 1983.

ATWAL, J. K.; MASSIE, B.; MILLER, F. D. & KAPLAN, D. R. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron*, 27(2):265-277, 2000.

BADDELEY, R.; ABBOTT, L. F.; BOOTH, M. C.; SENGPIEL, F.; FREEMAN, T.; WAKEMAN, E. A. & ROLLS, E. T. Responses of neurons in primary and inferior temporal visual cortices to natural scenes. *Proc Biol Sci*, 264(1389):1775-1783, 1997.

BARCO, A.; BAILEY, C. H. & KANDEL, E. R. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem*, 97:1520–1533, 2006.

BARNABÉ-HEIDER, F. & MILLER, F. D. Endogenously-produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci*, 23(12):5149-5160, 2003.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L. M.; BEVILAQUA, L. R.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53:261– 277, 2007.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. Neurociencias: desvendando o sistema nervoso. 2° ed., Porto Alegre: Artmed, 2002.

BIBEL, M. & BARDE, Y. A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14: 2919–2937, 2000.

BOTHWELL, M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 18:223–253, 1995.

CAMMAROTA, M.; BERNABEU, R.; LEVI DE STEIN, M.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Learning specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Europ J Neurosci*, 10:2669-2676, 1998.

CAROBREZ, A. P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. *Rev Bras Psiquiatr*, 25(2):52-58, 2003.

CHERKIN, A. Kinetics of memory consolidation: role of amnesic treatment parameters. *Proc Natl Acad Sci*, 63:1094–1101, 1968.

CHOI, J. J.; HUANG, G. J.; SHAFIK, E.; WU, W. H. & MCARDLE, J. J. Imipramine's selective suppression of an L-type calcium channel in neurons of murine dorsal root ganglia involves G proteins. *J Pharmacol Exp Ther*, 263(1):49-53, 1992.

CHROBAK, J. J.; HINMAN, J. R. & SABOLEKTHE, H. R. Revealing past memories: proactive interference and ketamine-induced memory deficits. *J Neurosci*, 28(17):4512– 4520, 2008.

COLEBUNDERS, B. & VAN ERPS, P. Cystitis due to the use of ketamine as a recreational drug: a case report. *J Med Case Reports*, 26:219-221, 2008.

CONSEILLER, C.; BENOIST, J. M.; HAMANN, K. F.; MAILLARD, M. C. & BESSON, J. M. Effects of ketamine (CI 581) on cell responses to cutaneous stimulations in laminae IV and V in the cat's dorsal horn. *Eur J Pharmacol*, 18(3):346-352, 1972.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S. & FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3):327-335, 2001.

DE LIMA, M. N.; LUFT, T. ROESLER, R. & SCHRÖDER N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett*, 405(1-2):142-146, 2006.

DOMINO, E. F.; CHODOFF, P. & CORSSSEN, G. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man. *Clin Pharmacol The*, 6:279-291, 1965.

ELLISON, G. The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Brain Res Rev*, 20(2):250-267, 1995.

FIGUROV, A.; POZZO, M.; OLAFSSON, P.; WANAG, T. & LU, B. Regulation of synaptic response to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*, 381:706-709, 1996.

GLEN, J. B. The use of ketamine (CI-581) in feline anaesthetic practice. *Vet Rec*, 92:65-68, 1973.

GOLD, P. E. & MCGAUGH, J. L. Hormones and memory. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 17:127-143, 1977.

GOLDMAN-RAKIC P. Prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia: the relevance of working memory. In: BJCarroll&JEBarrett (Eds), *Psychopathology and the Brain*, Raven Press, NewYork:1-23, 1992.

GREEN, S. M. & KRAUSS, B. Ketamine is a safe, effective, and appropriate technique for emergency department paediatric procedural sedation. *Emerg Med J*, 21(3):271-272, 2004.

HAAS, D.A. & HARPER, D. G. Ketamine: a review of its pharmacologic properties and use in ambulatory anesthesia. *Anesth Prog*, 39(3):61-68, 1992.

HALL, J.; THOMAS, K. L. & EVERITT, B. J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci*, 3(6):533-535, 2000.

HELDT, S. A.; STANEK, L.; CHHATWAL, J. P. & RESSLER, K. _Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *J Mol Psychiatry*, 7:656-670, 2007.

HERMAN, B. H.; VOCCI, F. & BRIDGE, P. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. Medication development issues for opiate addiction. *Neuropsychopharmacology*, 13(4):269-293, 1995.

HIMMELSEHER, S. & DURIEUX, M. E. Revising a dogma: ketamine for patients with neurological injury? *Anesth Analg*, 101(2):524-534, 2005.

HUANG, E. J. & REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24:677–736, 2001.

IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. *Behav Neural Biol*, 51:171-202, 1989.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem*, 63:19–32, 1995.

IZQUIERDO, I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 68:285–316, 1997b.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. On brain lesions, the milkman and sigmunda. *Trends Neurosci*, 21:423-426, 1998.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A. & MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393:635-636, 1998a.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A. & BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11, 1999.

IZQUIERDO, I.; QUILFELDT, J.; ZANATTA, M. S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P. K. & MEDINA, J. H. Sequential role of hippocampus, amygdala, entorhinal and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats, *Eur J Neurosci*, 9:786-793, 1997a.

IZQUIERDO, I.; VIANNA, M. R. M.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; ARDENGHI, P.; SANT'ANNA, M. K.; RODRIGUES, C.; MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Short and long-term memory are differentially affected by

metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 73:141-149, 2000.

IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R. M.; COITINHO, A.; SILVA, T. D.; CHOI, H.; MOLETTA, B.; MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Molecular Pharmacological Dissection of Short- and Long-Term Memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22:269-287, 2002.

KANG, H.; WELCHER, A. A.; SHELTON, D. & SCHUMAN, E. M. Neurotrophins and time: Different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 19:653–664, 1997.

KRÜTTGEN, A.; SCHNEIDER, I. & WEIS, J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol*, 16(4):304-310, 2006.

KRYSTAL, J. H.; KARPER, L. P.; SEIBYL, J. P.; FREEMAN, G. K.; DELANEY, R.; BREMNER, J. D.; HENINGER, G. R.; BOWERS, M. B. JR. & CHARNEY, D. S. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, 51(3):199-214, 1994.

LEE, J.L.; EVERITT, B.J. & THOMAS, K.L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304(5672): 829-830, 2004.

LEVINE, E. S. & KOLB, J. E. Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 62:357–362, 2000.

MALCANGIO, M. & LESSMANN, V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 24:116–121, 2003.

McCARTHY, D.A.; CHEN, G.; KAUMP, D.H. & ENSOR, C. General anaesthetic and other pharmacological properties of 2-(O-chlorophenyl)-2-methylaminocyclohexanone HCl (CI-58 1). *J New Drugs*, 5: 21 -33, 1965.

MCGAUGH, J .L; CAHILL, L. & ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems, *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 93:13508–13514, 1996.

MCGAUGH, J. L. Memory-a century of consolidation. *Science*, 287:248-251, 2000.

MCGAUGH, J. L. Time–dependent processes in memory storage. *Science*, 153:1351–1359, 1966.

MORGAN, C. J. A. & CURRAN, H. V. Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacol*, 188:408–424, 2006.

MORGAN, C. J. A.; MUETZELFELDT, L. & CURRAN, H. V. Ketamine use, cognition and psychological wellbeing: a comparison of frequent, infrequent and ex-users with polydrug and non-using controls. *Addiction*, 104, 77–87, 2009.

MORRIS, R. G. Long-term potentiation and memory. *Philos Trans R Soc London Ser B*, 358:643–647, 2003.

MUETZELFELDT, L.; KAMBOJ, S. K.; REES, H.; TAYLOR, J.; MORGAN, C. J. & CURRAN, H. V. Journey through the K-hole: phenomenological aspects of ketamine use. *Drug Alcohol Depend*, 95(3):219-229, 2008.

MUMBY, D. G.; GASKIN, S.; GLENN, M. J.; SCHRAMEK, T. E. & LEHMANN, H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem*, 9(2):49-57, 2002.

NAKAGAWARA, A. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*, 169:107-114, 2001.

NEWCOMER, J. W & KRYSTAL, J. H. NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus*, 11(5):529-542, 2001.

O'CONNELL, C.; O'MALLEY, A. & REGAN, C. M. Transient learning-induced ultrastructural change in spatially-clustered dentate granule cells of the adult rat hippocampus. *Neurosci*, 76:55–62, 1997.

OLNEY, J. W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30:47–71, 1990.

OXLEY, J. D.; COTTRELL, A. M.; ADAMS, S. & GILLATT, D. Ketamine cystitis as a mimic of carcinoma in situ. *Histopathology*, 55(6): 705-708, 2009.

OZAWA, S.; KAMIYA, H. & TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 54(5):581-618, 1998.

PANG, P. T.; TENG, H. K.; ZAITSEV, E.; WOO, N. T.; SAKATA, K.; ZHEN, S.; TENG, K. K.; YUNG, W. H.; HEMPSTEAD, B. L. & LU, B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306:487–491, 2004.

PATTERSON, S.; ABEL, T.; DEUEL, T.; MARTIN, K.; ROSE, J. & KANDEL, E. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16:706-709, 1996.

PAVARIN, R. M. Substance use and related problems: a study on the abuse of recreational and not recreational drugs in Northern Italy. *Ann Ist Super Sanita*, 42(4):477-484, 2006.

PIETERSEN, C. Y.; BOSKER,, F. J.; POSTEMA, F.; FOKKEMA, D. S.; KORF, J. & DEN BOER, J. A. Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30(7):1209–1218, 2006.

POO, M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, 2:24–32, 2001.

RAJA, S. N. & GUYENET, P.G. Action of phencyclidine on synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Res*, 236(2):289-304, 1982.

RICAURTE, G.A & MCCANN, U. D. Recognition and management of complications of new recreational drug use. *Lancet*, 365(9477):2137-2145, 2005.

RIEDEL, G.; PLATT, B. & MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, 140(1-2):1-47, 2003.

ROESLER, R.; REOLON, G. K.; LUFT, T.; MARTINS, M. R.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M. R. M. & QUEVEDO, J. NMDA Receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochem Res*, 30(11):1407–1411, 2005.

ROESLER, R.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M. R. M.; QUEVEDO, J.; BROMBERG, E.; KAPCZINSKI, F. & FERREIRA, M. B. C. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats *Brain Res*, 975:207–213, 2003.

ROWLAND, L. M.; ASTUR, R. S.; JUNG, R. E.; BUSTILLO, J. R.; LAURIELLO, J. & YEO, R. A. Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology*, 30(3):633-639, 2005.

SCALLET, A. C.; SCHMUED, L. C.; SLIKKER, W. JR.; GRUNBERG, N.; FAUSTINO, P. J.; DAVIS, H.; LESTER, D.; PINE, P. S.; SISTARE, F. & HANIG, J. P. Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. *Toxicol Sci*, 81(2):364-370, 2004.

SCHINDER, A. F. & POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 23:639–645, 2000.

SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1):11-21, 1957.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis of findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev*, 99:195–221, 1992.

STRAYER, R. J. & NELSON, L. S. Adverse events associated with ketamine for procedural sedation in adults. *Am J Emerg Med*, 26(9):985-1028, 2008.

SZAPACS, M.; MATHEWS, T.; TESSAROLLO, L.; ERNEST, W.; MAMOUNAS, L. & ANDREWS, A. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods*, 140(1-2):81-925, 2004.

TYLER, W. J.; ALONSO, M.; BRAMHAM, C. R. & POZZO-MILLER, L. D. From acquisition to consolidation: On the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem*, 9:224–237, 2002.

VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; WALZ, R. MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades *An Acad Bras Ci*, 72: 353-364, 2000.

VOGT, A.; KAPPOS, L.; CALABRESE, P.; STÖCKLIN, M.; GSCHWIND, L.; OPWIS, K. & PENNER I. K. Working memory training in patients with multiple sclerosis - comparison of two different training schedules. *Restor Neurol Neurosci*, 27(3):225-235, 2009.

WALZ, R.; LENZ, G.; ROESLER, R.; VIANNA, M. R.; MARTINS, V.; BRENTANI, R. R.; RODNIGHT, R. & IZQUIERDO, I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci*, 12:2185-2189, 2000.

WANG, C.; SADOVOVA, N.; FU, X.; SCHMUED, L.; SCALLET, A.; HANIG, J. & SLIKKER, W. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in ketamine-induced apoptosis in rat forebrain culture. *Neurosci*, 132(4):967-977, 2005.

WANG, J. H.; FU, Y.; WILSON, F. A. & MA, Y. Y. Ketamine affects memory consolidation: differential effects in T-maze and passive avoidance paradigms in mice. *Neurosci*, 140(3):993-1002, 2006.

WEISBROTH, S. H. & FUDENS, J. H. Use of ketamine hydrochloride as an anaesthetic in laboratory rabbits, rats, mice and guinea pigs. *Lab Anim Sci*, 22: 904-906, 1972.

WHITLOCK, J. R.; HEYNEN, A. J.; SHULER, M. G. & BEAR, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313:1093–1097, 2006.

YAMADA, K. & NABESHIMA, T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, 91:267–270, 2003.

YEUNG, L. Y.; RUDD, J. A.; LAM, W. P.; MAK, Y. T. & YEW, D. T. Mice are prone to kidney pathology after prolonged ketamine addiction. *Toxicol Lett*, 191(2-3):275-278, 2009.

ZHAO, L.; YE, T. & ZHANG, Y. Combination of morphine with low-dose naloxone for intravenous patient-controlled analgesia. *J Neurosci*, 12(1):100-105, 2005.

ZOU, X.; PATTERSON, T. A.; DIVINE, R. L.; SADOVOVA, N.; ZHANG, X.; HANIG, J. P.; PAULE, M. G.; SLIKKER, W. JR. & WANG, C. Prolonged exposure to ketamine increases neurodegeneration in the developing monkey brain. *Int J Dev Neurosci*, 27(7):727-731, 2009.

7 ANEXO (MANUSCRITO)

Neuroscience

SECTION: **Neuropharmacology**

Ketamine Impairs Recognition Memory Consolidation and Prevents Learning-Induced Increases in Hippocampal BDNF Levels

Bruno Kilpp Goulart ^{a,b,c} Gustavo Kellermann Reolon ^{a,b,c} Caroline Brunetto de Farias ^{a,b,c} Maria Noemia de Lima ^{b,d} Viviane Rösner Almeida ^{a,b,c} Flávio Kapczinski ^{b,e} Nadja Schröder ^{b,f} Rafael Roesler ^{a,b,c}

^a Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^b National Institute for Translational Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil; ^c Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^d NeuroAssay Research and Development Ltd., Porto Alegre, RS, Brazil; ^e Laboratory of Molecular Psychiatry, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^f Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil.

Full address

Rafael Roesler, PhD

Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences,
Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS,
Campus Centro/UFRGS), 90046-900 Porto Alegre, RS (Brazil)

Tel. +55 51 3308 3183, Fax: +55 51 3308 3121

E-mail: rroesler@terra.com.br

List of Abbreviations

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

NMDA: N-methyl D-aspartate

NMDAr: N-methyl D-aspartate receptor

Ip: intraperitoneal

STM: short-term memory

LTM: long-term memory

Abstract

Ketamine is a potent noncompetitive antagonist of glutamatergic ionotropic receptors type *N*-methyl *D*-aspartate (NMDAr). The decrease in the neurotransmission of glutamate receptors is associated with the change of perception, memory and cognition. Here we show that systemic administration of ketamine impairs the consolidation of novel object recognition (NOR) memory in rats. NOR training was associated with an increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the dorsal hippocampus, which was prevented in rats given ketamine. This study shows that ketamine impairs memory formation in a dose-dependent manner, possibly by preventing learning-induced increases in BDNF levels.

Key Words: Ketamine • Long Term Memory • Brain-Derived Neurotrophic Factor • NMDAr • Novel Object Recognition

Introduction

Ketamine hydrochloride is a dissociative agent that was first used in humans in 1965 (Domino et al., 1965). Currently, ketamine acts medically as an anesthetic, mainly for animals (hence its nickname—the ‘horse tranquilizer’) (Morgan et al., 2009). Administration of ketamine causes anesthesia, analgesia, suppression of fear and anxiety, and amnesia (Bergman, 1999). Ketamine is also used how a misuse substance and there are an increasing number of young people are taking this drug recreationally (DrugScope 2005) and there is evidence that some users may develop dependence (Hurt and Richie, 1994). These substances abuses are a leading cause of physical and mental health problems, as well as social-economic problems for youngsters (Pavarin 2006). Morgan and colleagues (2008) have indicated that recreational ketamine use may be associated with marked cognitive impairments and elevated psychopathological symptoms.

Ketamine acts as a noncompetitive antagonist of glutamate mediated by its interaction with N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr) (Anis et al, 1983). It has been proposed that their symptomatology is a consequence of NMDA receptor hypofunction (Olney et al., 1999), and affect memory with its disruption of long-term potentiation in the hippocampus (Morgan et al, 2009).

Furthermore, neurotrophins, and particularly brain-derived neurotrophic factor (BDNF), have been shown important for maintaining survival of neuronal populations in the central nervous system (CNS) (Huang and Reichardt, 2001), in synaptic plasticity and the selection of functional neuronal connections in the CNS (Castrén et al., 2007). Garcia and colleagues (2008) demonstrated that acute administration of ketamine increased BDNF levels in the hippocampus of

rats in forced swimming test, and, chronic administration, but not acute with others non-competitives antagonists of NMDA receptor for glutamate, induced increasing of BDNF expression and BDNF immunoreactive fibers in the hippocampus of rodents (Nibuya et al, 1996; De Foubert et al., 2004). It has been reported that ketamine injected at sub-anesthetic doses impaired rats recognition memory (Pitsikas et al., 2008; Verma and Moghaddam, 1996), although another study did not support this finding (Robinson and Crawley, 1993).

At the moment, there is no experimental evidence concerning the role of ketamine on recognition memory, neither any study demonstrated the BDNF levels in hippocampus of rats treated with ketamine in recognition task. So, the main aim of the present study was to evaluated the effects induced by administration of ketamine in rats by the recognition task as well as the levels of BDNF post administration of ketamine in hippocampus of rats.

Experimental Procedures

Animals and drug administration

Male Wistar rats were obtained from State Foundation in Health Production and Research (FEPPS-RS, Porto Alegre, RS, Brazil). The animals were maintained in groups of five in a plastic cage with sawdust bedding in a room at temperature of 22 ± 1 °C and a 12h light/dark cycle and were supplied with standardized pellet food and tap water ad libitum. All behavioral experiments took place between 09:00 and 17 h. The animals were divided into different groups of ten animals each: Control group that received intra peritoneal (i.p.)

injection of vehicle (saline solution), and ketamine (Dopalen, Vetbrands, Brasil) groups that received i.p. injections of ketamine 4, 8, 20 mg/kg body weight, respectively. The injections (1.0 ml/kg) took place immediately after training. The minimal possible number of animals was used and their suffering was minimized. All experimental procedures were approved by the institutional research ethics and animal care committee and performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Novel object recognition memory

The novel object recognition (NOR) procedure uses the natural preference for novel objects displayed by rats and mice to assess cognitive alterations in rodent models of neurodevelopmental and neurodegenerative disorders or those induced by drugs.

Twenty-four hours after open field exploration (see below), animals were trained and tested in a novel object recognition task as previously described (Schröder et al., 2003; Reolon et al., 2006). Training in the object recognition task took place in the same arena used for the open field exploration, except that the arena floor was covered with sawdust during the recognition memory task training and test trials. The open field is an 40x45 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The open field exploration was thus used as a context habituation trial for the recognition memory task. The object recognition test required that the rats recall which of two plastic objects they had been previously familiarized with. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats

into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9cm from the walls. Animals were left to explore the objects until they had accumulated 30 seconds of total object exploration time. In a long-term memory test given 24 h after training, the rats explored the open field for a maximum time of 5 minutes in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $TB/(TA+TB)$ [TA=time spent exploring the familiar object A; TB=time spent exploring the novel object B]. Between trials, the objects and the open field were cleaned with alcohol 70%. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

Rat hippocampal BDNF level measurement.

Different groups were prepared for this experiment. Groups exposed only to plastic cage, groups exposed for ten minutes to open-field and groups submitted to the training of object recognition.

To evaluate the BDNF levels hippocampal, animals were treated with saline control or 20 mg/kg ketamine, 3 h after injection, rats were killed and the skulls were removed and hippocampus was dissected and stored at $- 80^{\circ}$ for biochemical analyses. BDNF levels in the hippocampus were measured by anti-BDNF sandwich-ELISA, according to the manufacturer instructions (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Briefly, rat hippocampus was homogenized in phosphate-buffered solution with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM ethyleneglycoltetraacetic acid. Microtiter plates (96-well flat-

bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:2 in sample diluent and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg/ml of BDNF. The plates were then washed four times with sample diluent and a monoclonal anti-BDNF rabbit antibody diluted 1:1000 in sample diluent was added to each well and incubated for 3 h at room temperature. After washing, a peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (horseradish peroxidase enzyme; diluted 1:1000) was added to each well and incubated at room temperature for 1 h. After addition of streptavidin enzyme, substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and stop solution, the amount of BDNF was determined by absorbance in 450 nm. The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density and BDNF concentration. BDNF was expressed as pg of BDNF per ml of serum obtained from hippocampal homogenate. Total protein was measured by Bradford's method using bovine serum albumin as a standard.

Statistics

Data are expressed as median (interquartile ranges). Comparisons between groups were performed using a Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney U tests, two-tailed when necessary. Comparisons within the same group were performed by Wilcoxon tests. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance (de Lima et al., 2005a,b,c, 2006, 2008; Dias et al., 2007). The data related to the assessment of the levels of BDNF in the hippocampus of rats were expressed as mean \pm S.E.M. Comparison of parameters between the different experimental groups were performed by one-way ANOVA followed by appropriate post hoc tests when ANOVA revealed significant difference between groups (Garcia et al., 2008).

Results

Effects of ketamine in retention of novel object recognition memory

The post-training administration of different doses of ketamine (4, 8, 20 mg/kg) impaired in a dose-dependent retention of novel object recognition memory (all p s < 0.005 compared to control) (Figure 1).

Fig. 1 should be inserted here

Effects of ketamine in memory consolidation

Ketamine was administrated 6 h after training to evaluated a late effects control. This test showed that ketamine had no effect on memory indicating that this drug acts directly on memory consolidation (Figure 2).

Fig. 2 should be inserted here

Effects of ketamine in short and long-term memory

The animals were injected with ketamine 20 mg/kg 24 h before training. This experiment shows that both the evaluation of short-term memory (STM) and in the evaluation of long-term memory (LTM), there is no decline learning (Figure 3).

Fig. 3 should be inserted here

BDNF levels detection in rats hippocampus

To evaluate the role of ketamine in the BDNF levels in rats hippocampus, we administrated ketamine (20mg/kg) or saline immediately after the exposition of the animals: or only into the plastic cage, or into the open-field, or in the novel object recognition training. After 3 hours, the animals were sacrificed and we removed and dissected the hippocampus collected the rats hippocampus, followed by BDNF levels analysis. Bars represent means \pm S.E.M. of 6 rats (Figure 4).

Fig. 4 should be inserted here

Discussion

This study suggests that ketamine interacts directly in memory consolidation, as a dose-dependent. The ketamine when administered 24 h before training does not indicate significant difference in learning. For memory to be consolidated it takes about 6 h after a new experience (Izquierdo et al., 2000). To test how ketamine interferes in learning, we injected (20 mg/kg) ketamine, 6 h after the training on novel object recognition test. In this experiment, we found that ketamine acts directly on memory consolidation, and there was no significant difference in memory retention of the animals treated and untreated. Our findings are in agreement with Wang et al. (2006) showed that ketamine anesthetic doses affects memory consolidation when assessed by T-maze test, while that low doses did not interfere with retrieval memory.

Low doses of ketamine did not affect the learning when animals were valued in the novel object recognition test, demonstrating that the noncompetitive antagonist NMDAr acts on memory retention as doses-dependent, corroborating with findings about brain cell lines treated with different doses of ketamine causing neurotoxicity in a dose-dependent as well induced cell death (Wang et al., 2005).

To our knowledge, these findings are the first that suggest the novel object recognition test how a good tool for assessing the BDNF levels. Thereby, we found increase of BDNF during the exploration of objects, confirming the hypothesis that memory consolidation requires brain-derived neurotrophic factor, also proposed by Lee and colleagues (2004).

Acute doses of ketamine impairs episodic memory and semantic processing, but not the maintenance of information in working memory, suggesting that acute doses of ketamine may affect not only the explicit memory as well as some implicit memory tasks (Morgan et al., 2009). Other authors have shown that acute treatment with ketamine also impairs the memory of aversive conditioning, suggesting that this deficit is caused by blockage of NMDA receptors (NMDARs), that are necessary for pavlovian conditioning (Pietersen et al., 2006).

In order to measure the effect in short and long-term memory by a single administration of the most effective dose of ketamine (20 mg / kg), we administered ketamine 24 hours before the training on the novel object recognition test. Thereby, we noted there were no damages on memory retention, ratifying the hypothesis that ketamine acts directly on memory consolidation (Wang et al., 2006).

Garcia et al. (2008) tested the effects of chronic administration of ketamine in aversive conditioning test and reported that repeated administration of this drug impairs aversive memory and had a lasting effect on the encoding of sensory stimuli. Furthermore, they showed that acute doses of ketamine increased BDNF levels in rats hippocampus on the forced swim test, and that chronic administration but not with acute administration with others non-competitive antagonists of NMDA stimulated BDNF overexpression.

In order to evaluate the role of ketamine in the BDNF levels in rats hippocampus, we administrated ketamine (20mg/kg) or saline immediately after the exposition of the animals: or only into the plastic cage, or into the open-field, or in the novel object recognition training. After 3 hours, we collected the rats

hippocampus, followed by BDNF levels analysis. Our results indicate that BDNF levels are higher when tasks that involved learning are required, as in the novel object recognition training, wherever we found increase of concentrations of BDNF. However, the group that has been treated with ketamine (20 mg/kg) in the same conditions had lower levels of this protein. Additional experiments are required to further examine the functional interactions between the BDNF and ketamine signaling.

Bekinschtein and colleagues (2007) characterized the BDNF as essential for induction of persistent long-term memory. Other studies suggest that cognitive deficits and changes in extinction of aversive memory found in models of depression and anxiety can be directly related to the decrease of BDNF in the hippocampus (Heldt et al., 2007), and assessments of the expression of BDNF demonstrated that this neurotrophin is restricted to the CA1 region of hippocampus during a learning context (Hall et al., 2000).

In summary, the present study demonstrates that (i) ketamine impairs memory of dose-dependent manner; (ii) the administration of ketamine 24 h before training did not interfere in learning; (iii) the treatment with high doses of ketamine interacts directly with the memory consolidation; and (iv) the BDNF protein levels in rat hippocampus without ketamine administration during the learning is increased when we compare with the animals that received ketamine (20 mg/kg) in the same conditions.

Acknowledgements

This research was supported by CNPq; the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the Children's Cancer Institute (ICI-RS, Porto Alegre, Brazil).

References

Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D (1983), The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 79:565–575.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007), Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53:261–277.

Bergman SA (1999), Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. *Anesth Prog* 46:10–20.

Castrén E, Vöikar V, Rantamäki T (2007), Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7:18–21.

de Foubert G, Carney SL, Robinson CS, Destexhe EJ, Tomlinson R, Hicks CA, Murray TK, Gaillard JP, Deville C, Xhenseval V, Thomas CE, O'Neill MJ, Zetterström TSC (2004), Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neurosci* 128:597–604.

de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schröder N (2005a), Pre or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 156:139-143.

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N (2005b), Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl, *Exp Gerontol* 40:506-511.

de Lima MN, Luft T, Roesler R, Schröder N (2006), Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett* 405:142–146.

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Graziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, Bromberg E, Schröder N (2005c), Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol* 196:177-183.

Dias CP, de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, Guimarães MR, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N (2007), Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neurosci* 146:1719-1725.

Domino EF, Chodoff P, Corssen G (1965), Pharmacologic effects of CI-581 A new dissociative anesthetic in man. *Clin Pharmacol Ther* 6: 279-291.

DrugScope (2005) UK drug situation 2005.
http://www.drugscope.org.uk/news_item.asp?intID=1241

Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J (2008), Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 140–144.

Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J (2008), Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103: 502–506.

Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000), Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3(6):533-535.

Heldt SA, Stanek I, Chhatwal JP, Ressler K (2007), Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *J Mol Psychiatry* 7:656-670.

Huang EJ and Reichardt LF (2001), Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci* 24:677-736.

Hurt PH, Ritchie EC (1994), A case of ketamine dependence. *Am J Psychiatry* 151:779.

Izquierdo I, Vianna MRM, Barros DM, Mello e Souza T, Ardenghi P, Sant'anna MK, Rodrigues C, Medina JH, Izquierdo I (2000), Short and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 73:141-149.

Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004), Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304(5672):829-830.

Morgan CJA, Muetzelfeldt L, Curran HV (2008), Ketamine use, cognition and psychological wellbeing: a comparison of frequent, infrequent and ex-users with polydrug and non-using controls. *Addiction* 104: 77–87.

Morgan CJA, Muetzelfeldt L, Curran HV (2009), Ketamine use, cognition and psychological wellbeing: a comparison of frequent, infrequent and ex-users with polydrug and non-using controls. *Addiction* 104: 77–87.

Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996), Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16:2365-2372.

Olney, JW, Newcomer, JW, Farber, NB (1999), NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33: 523–533.

Pavarin RM (2006), Substance use and related problems: a study on the abuse of recreational and not recreational drugs in Northern Italy. *Ann Ist Super Sanità* 42:477-484.

Pietersen CY, Bosker FJ, Postema F, Fokkema DS, Korf J, Den Boer JA (2006), Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(7):1209–1218.

Pitsikas N, Boultadakis A (2009), Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology* 57:1–7.

Reolon GK, Braga LM, Camassola M, Luft T, Henriques JA, Nardi NB, Roesler R (2006), Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua*^{-/-} mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis. *Brain Research* 1076:225-230.

Robinson JK and Crawley JN (1993), Intraventricular galanin impairs delayed nonmatching-to-sample performance in rats. *Behav Neurosci* 107:458-467.

Schröder N, O'Dell SJ, Marshall JF (2003), Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49: 89–96.

Verma A and Moghaddam B (1997), NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci* 16:373-379.

Wang C, Sadvova N, Fu X, Schmued L, Scallet A, Hanig J, Slikker W (2005), The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in ketamine-induced apoptosis in rat forebrain culture. *Neurosci*, 132(4):967-977.

Wang JH, Fu Y, Wilson FA, Ma YY (2006), Ketamine affects memory consolidation: differential effects in T-maze and passive avoidance paradigms in mice. *Neurosci* 140(3):993-1002.

Legends for figures

Fig. 1. Effects of ketamine in retention of novel object recognition memory. Median (interquartile ranges) training and retention of novel object recognition memory. The groups were divided into saline control group and 4, 8 and 20 mg/kg of ketamine group, administrated immediately after training. All groups were trained and tested. $**P,0.01$, significant difference from the 8 and 20mg/kg of ketamine groups (Mann–Whitney *U*-test); $^{++}P<0.01$, significant difference from the Training and Test groups (Wilcoxon); $^{+}P <0.05$, significant difference from the Training and Test groups (Wilcoxon).

Fig. 2. Effects of ketamine in memory consolidation. Male rats were received a single dose of saline or (20 mg/kg) ketamine after 6 h of training. There was no significant difference between the groups, test-saline and test-ketamine after 24 hours of memory retention. Groups compared with each other showed learning. Comparison between training and testing with Wilcoxon test ($^{+} P<0.05$).

Fig. 3. Effects of ketamine in short and long-term memory. The animals received dose of saline or (20 mg/kg) ketamine 24 h before the training. There was no significant difference when the groups test-saline 1.5h and test-saline 24h were compared. The same occurred with the comparison of groups test-ketamine 1.5h and test-ketamine 24h. The training and test groups, when compared with each other, showed significant differences in learning. Comparison between training and test – Wilcoxon test ($^{+}P<0,05$).

Fig. 4. BDNF levels detection in hippocampus of rats. Evaluation of the levels of BDNF 3 h after ip administration of (20 mg/kg) ketamine or saline. We noted a significant difference between the saline-training group compared to all other groups when analyzed by Turkey test ($*P < 0.01$).

Figure 1

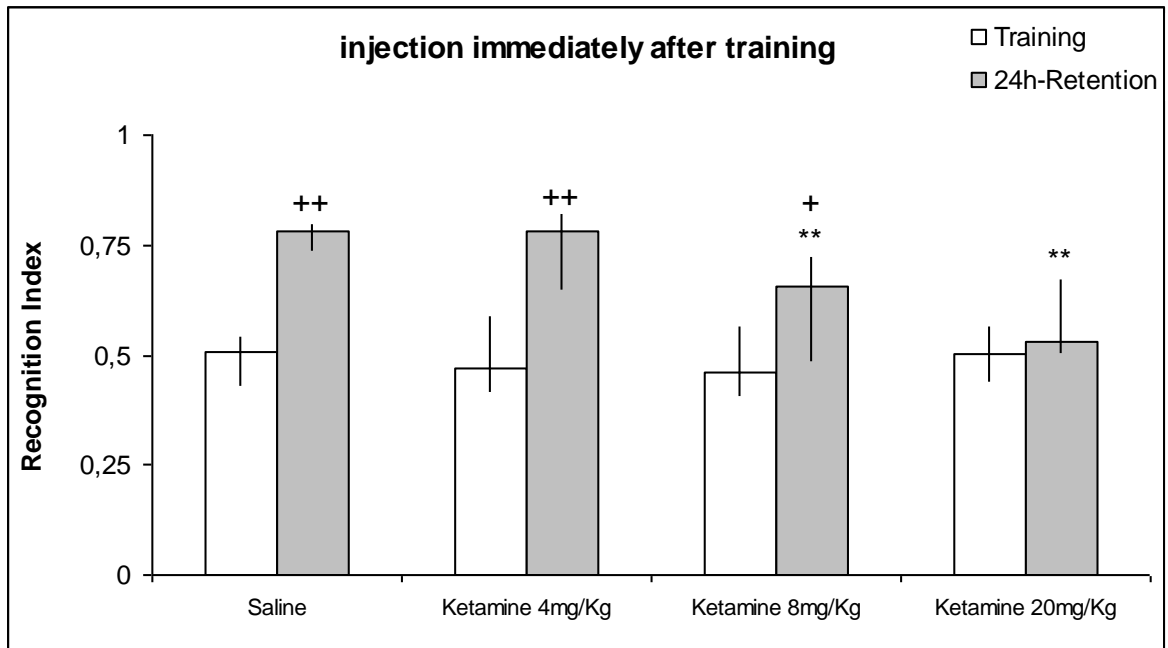


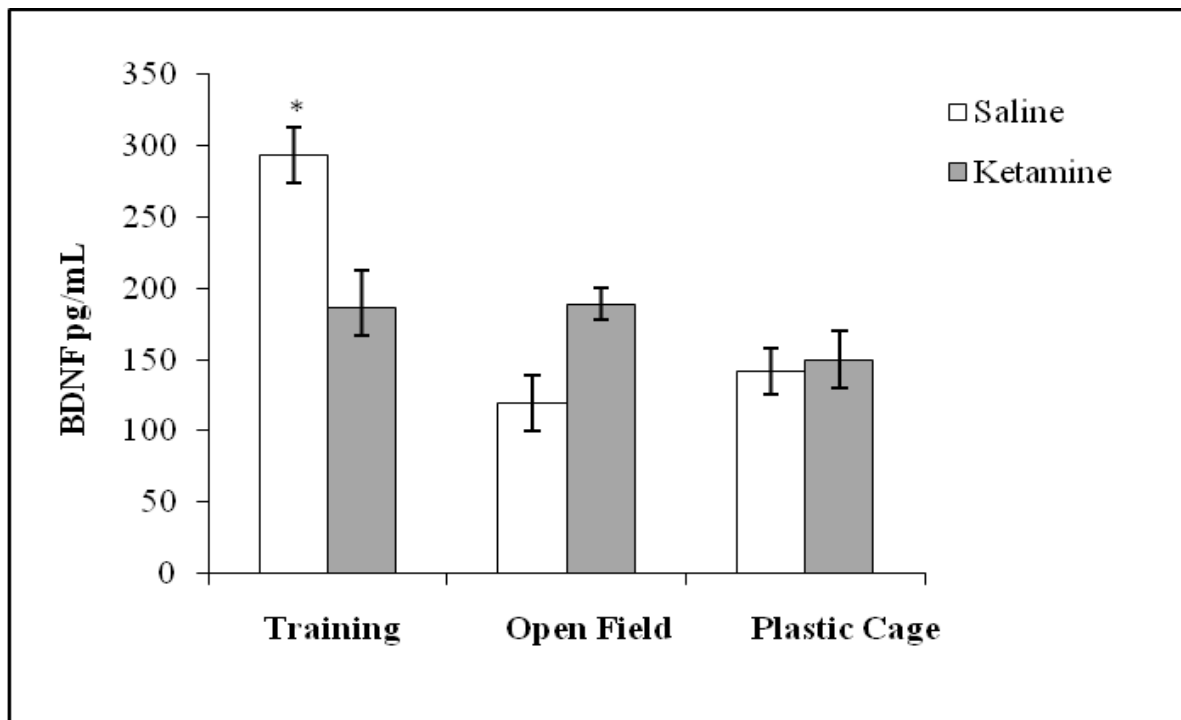
Figure 2



Figure 3



Figure 4



8 CURRICULUM VITÆ resumido

GOULART, B. K.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Bruno Kilpp Goulart

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 16 de agosto de 1983.

Endereço profissional: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar - Centro de Pesquisas Básicas – Laboratório de Pesquisas em Câncer – CEP: 90035-003 – Bom Fim – POA – RS - Brasil

Telefone profissional: 51-8114.9687

E-mail: bkilpp@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Bacharel em Ciências – Habilitação em Biologia (Universidade Luterana do Brasil, 2001-2006);

3. ESTÁGIOS

Laboratório Marques Pereira (2002-2002)

Atividades de estágio extracurricular:

- Área de Bioquímica Clínica
- Área de Hematologia
- Área de Urinálises
- Área de Parasitologia

Responsável: Maria Salete

Laboratório Rede Lac (2002 – 2002)

Atividades de estágio extracurricular:

- Área de Urinálise
- Área de Parasitologia

Responsável: Ranieri

Laboratorio Knijnik (2003 – 2006)

Atividades de estagio curricular e extracurricular:

- Área de Bioquímica Clínica
- Área de Imunologia
- Área de Sorologia
- Área de Urinálise
- Área de Parasitologia

Responsaveis: Giovana R. Pereira e Maiara Mendes

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Laboratorio Bio-Fast (2006 – 2007)

Responsável pelos setores de Urinálise e Parasitologia.

Laboratório Carlos Chagas (2007 – 2009)

Responsável pelo setor de Bioquímica Clínica.

Laboratório Parque Belém (2009 – atual)

Atuação nos setores de Hematologia, Bioquímica Clínica, Urinálise e Parasitologia.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Pedro Emanuel Rubini Liedke, Gustavo Kellermann Reolon, Bruno Kilpp Goulart, Algemir Lunardi Brunetto, Rafael Roesler e Gilberto Schwartzmann. Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, (94) 239–243, 2009.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

de Almeida, V. R.; Goulart, B. K.; de Lima, M. N. M.; Reolon, G. K.; Farias, C. B.; Stertz, L.; Fries, G.R.; Kapczinski, F.; Schröder, N.; Roesler, R.;
ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE CETAMINA PREJUDICA A

CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO E REDUZ OS NÍVEIS DE BDNF NO HIPOCAMPO DE RATOS.

4° Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções, Bento Gonçalves / RS – 2008.