PATRÍCIA FRANCISCONE MENDES

**A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas
e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos**

São Paulo

2018

PATRÍCIA FRANCISCONE MENDES

**A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas
e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Profa. Dra. Isis Machado Hueza

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3683
FMVZ

Mendes, Patrícia Franciscone

A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos / Patrícia Franciscone Mendes. – 2018. 236 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Isis Machado Hueza.

Coorientadora: Profa. Dra. Karin Argenti Simon.

1. Álcool. 2. Polidrogas. 3. Espécies reativas. 4. Neurotoxicidade. 5. Imunotoxicidade. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 8108060616, sob a responsabilidade de **Isis Machado Hueza e equipe; Patrícia Franciscione Mendes; Jessica Lima Teles; Jorge Camilo Florio; José Luiz Guerra; Karin Argenti Simon; Thiago Berti Kirsten** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/09/2016.

We certify that the proposal "Ketamine associated or not with alcohol, which are the toxicological consequences and their influence on oxidative stress? Study in rats. ", utilizing 360 Heterogenics rats (360 males), protocol number CEUA 8108060616, under the responsibility of **Isis Machado Hueza and team; Patrícia Franciscione Mendes; Jessica Lima Teles; Jorge Camilo Florio; José Luiz Guerra; Karin Argenti Simon; Thiago Berti Kirsten** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/01/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 06/2018

Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 40 a 60 dias

N: 360

Linhagem: Wistar

Peso: 200 a 250 g

Resumo: A utilização de drogas e outras substâncias com propriedades psicoativas faz parte da história da humanidade (Parrott et al., 2004), podendo ser considerada uma prática milenar e universal (Tavares et al., 2001), muitas vezes associada a rituais culturais e religiosos (Silveira, 2010), fins medicinais (Gorgulho, 2000) e como forma de se buscar a transcendência por meio de alterações sensoriais, comportamentais e psíquicas (Rezende, 1997); apresentando relevância social, política, econômica e religiosa em diferentes contextos e épocas (Silveira, 2010). Porém, na atualidade, o uso abusivo de drogas com fins recreacionais é considerado um fenômeno social e de saúde pública (Silva et al., 2010), podendo o usuário ainda ser considerado em alguns países, como criminoso. Vale ressaltar que muitas destas substâncias utilizadas não foram desenvolvidas para fins recreativos ou de tráfico, mas sim para serem utilizadas como medicamentos para os mais diversos fins, como por exemplo a cocaína, que foi utilizada inicialmente para tentar tratar dependentes de morfina (Freud, 1884); a própria morfina, benzodiazepínicos e atualmente, o anestésico dissociativo: cetamina. Amplamente utilizada na medicina veterinária (Smith et al., 2002), a aquisição da cetamina é muitas vezes facilitada por intermédio de profissionais de saúde, os quais possuem livre acesso a diferentes medicamentos de uso cotidiano na clínica (Arican et al, 2004); e dentre os mesmos profissionais, também há prevalência no uso (WHO, 2006). Na prática de uso de drogas, é comum o uso de [polidroga] (Yen et al., 2007), que nada mais é que a associação de diferentes substâncias químicas com o objetivo de agir sinergicamente para o efeito desejado, sendo o álcool, uma droga depressora do sistema nervoso central (Schuckit, 2009); o mais utilizado juntamente com outras drogas alucinógenas e/ou estimulantes (Kenna; Lewis, 2008) para este fim. De fato, a cetamina em associação ao álcool é frequentemente consumida em clubes e/ou festas (Degenhardt; Dunn, 2008). Sabendo-se dos efeitos centrais que culminam em alterações comportamentais (Yang et al., 2013), dos efeitos oxidantes que resultam no estresse oxidativo (Rofael, 2004) e do potencial imunomodulatório da cetamina (De Kock et al., 2013) e imunossupressor do álcool (Pruett et al., 2004); o presente projeto tem como objetivo avaliar em ratos adultos os efeitos do uso isolado, tanto do álcool quanto da cetamina, como principalmente a associação de ambos, que ao nosso conhecimento é inédito na literatura sobre diferentes parâmetros de toxicidade, inclusive aqueles relacionados à imunotoxicidade e também desenvolvimento de estresse oxidativo sobre órgão-alvo.

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP

São Paulo, 12 de setembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MENDES, Patrícia Franciscone

Título: A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais que com muito amor e carinho foram o mais nobre dos arcos de minha vida!

Teus filhos não são teus filhos.
São filhos e filhas da vida, anelando por si própria.
Vêm através de ti, mas não de ti,
E embora estejam contigo, a ti não pertencem.
Podes dar-lhes teu amor, mas não teus pensamentos,
Pois que eles têm seus pensamentos próprios.
Podes abrigar seus corpos, mas não suas almas,
Pois que suas almas residem na casa do amanhã, que não podes visitar sequer em sonhos.
Podes esforçar-te por te parecer com eles, mas não procures fazê-los semelhantes a ti,
Pois a vida não recua, e não se retarda no ontem.
Tu és o arco do qual teus filhos, como flechas vivas, são disparados.
Que a tua inclinação, na mão do arqueiro, seja para a alegria.

Kahlil Gibran

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo apoio incondicional, em especial à minha mãe Isaura, minha grande parceira e amiga, que desde sempre se dedicou à mim com seus cuidados, carinhos e conselhos indispensáveis em todos os momentos; e à meu pai José, pelos ensinamentos e encorajamentos à minha inserção na pós-graduação, por ser para mim uma grande inspiração, um exemplo de profissionalismo, dedicação, seriedade e comprometimento. Essa conquista também é de vocês. Amo vocês!

À minha orientadora e mentora científica, Isis Machado Hueza, que ao longo destes anos me proporcionou muitos ensinamentos, conselhos e incentivos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, Karin Argenti Simon, pelo aprendizado e auxílio nas técnicas das análises laboratoriais para avaliação dos parâmetros referentes ao estresse oxidativo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro disponibilizado para realização deste projeto (Processo número 140019/2015-4).

Ao Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP) e ao Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas (ICAQF) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por terem me acolhido durante o período de desenvolvimento desta tese e me proporcionado condições necessárias para realização de minhas pesquisas.

À todos os funcionários da FMVZ - USP pelo auxílio disponibilizado sempre que necessário, especialmente aos funcionários do Biotério (Luciana, Cláudia, Nelsinho e Mauro), do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (LADTOX) (Vagner, Herculano e Nicolle) e da Secretaria (Adriana e Milena) do VPT.

Aos professores e professoras do VPT, pelos ensinamentos e pelo convívio, em especial o Prof. Dr. José Luiz Guerra e a Profa. Dra. Claudia Momo pelo auxílio na análise de minhas lâminas de histopatologia, e o Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan e ao Prof. Dr. André Fukushima da Universidade São Judas Tadeu pela realização da análise neuroquímica.

Aos colegas de Departamento (André, Natália, Sayuri, Thaísa, Thiago, Daniel, Júlia, Jéssica, Juliana e Cássia) pelos momentos de descontração e troca de conhecimentos na Sala de Pós.

Aos alunos de Iniciação Científica (IC) e graduandos da UNIFESP, Jessica de Lima Teles, Rebeca Bueno, Evelyn Martins e Gabriel Macedo pela ajuda na execução das técnicas de análises laboratoriais para avaliação dos parâmetros referentes ao estresse oxidativo; e à estagiária Millena Rodrigues, graduanda da Universidade São Judas Tadeu, pelo auxílio no tratamento dos animais durante os períodos experimentais e nos dias finais de experimentação.

Às amigadas que construí ao longo destes anos e que fizeram a vida ser vivida de uma forma mais “leve” durante a jornada do doutorado, em especial a minha “irmã científica” Renata Almeida, meu amigo Pedro Martins e minha amiga Vanessa Gris.

Por fim, agradeço especialmente à todos os ratos Wistar que nos doaram suas vidas para que pudéssemos aprender mais, contribuindo para a realização deste trabalho. Expresso minha eterna e intensa admiração e gratidão a estes seres que me encantam, me despertam profunda paixão e que tanto nos tem a ensinar, os animais.

A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.

Charles Darwin.

RESUMO

MENDES, P. F. **A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos** [Ketamine associated or not with alcohol, what are the toxicological consequences and influence on oxidative stress? Study in rats] 2018. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O uso recreacional e os efeitos deletérios de drogas lícitas e/ou ilícitas é considerado um problema de saúde pública. Dentre estas drogas destaca-se a cetamina, um anestésico empregado na veterinária e o etanol, a droga lícita mais utilizada. Além dos efeitos centrais, estudos revelam que a cetamina e o etanol possuem propriedades imunomodulatórias. No entanto, poucos estudos são realizados com a associação destas drogas; assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar os efeitos tóxicos, imunotóxicos, o potencial oxidativo e os possíveis efeitos neurotóxicos resultantes do consumo associado ou não das mesmas. Para isso, ratos Wistar foram tratados uma vez ao dia, por até 28 dias, com injeções intraperitoneais (15 ou 30mg/kg/PV) de cetamina (K) ou com etanol a 10% (E) via oral (gavagem ou adicionado a água de bebida), ou ainda em associação (KE). O grupo controle recebeu apenas os veículos dos tratamentos. Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia para realização de avaliações toxicológicas, imunológicas, oxidativas e antioxidativas, e de neurotransmissores centrais. Os resultados revelaram redução no ganho de peso dos animais tratados com KE e aumento de ácido ascórbico urinário. A redução de pH e glicose urinária foi observada nos grupos E e KE. Na bioquímica, todos os grupos apresentaram aumento de HDL, porém a associação das drogas levou a um aumento do colesterol, enquanto no grupo K, observou-se diminuição dos triglicérides e da fosfatase alcalina. Ainda, somente o grupo KE apresentou alterações na função renal. Todos os grupos experimentais exibiram alterações histopatológicas hepáticas e/ou vesicais. Os grupos E e KE apresentaram alterações no número de células mieloides e linfoides concomitantes ao aumento na celularidade de medula óssea. Apenas animais do grupo KE apresentaram alteração na resposta do tipo Th2. Foi observado o aumento da peroxidação lipídica nos animais tratados com K, bem como aumento na atividade de GPx e CAT e do conteúdo de GSSG dos animais tratados com E e/ou KE nos órgãos analisados. Ao nível central, observou-se elevação dos níveis de DA e NOR no hipocampo dos animais do grupo E, e 5HT nos animais do grupo K; além de aumento de DA e 5HT no córtex pré-frontal dos animais dos grupos E e K, respectivamente. Assim, concluímos que a associação KE promove redução do ganho de peso não relacionado ao consumo de ração. O etanol, em

associação ou não, promove alterações nos parâmetros urinários; a cetamina promove diminuição nos níveis de FA e as drogas quando em associação alteram o perfil lipídico e renal na dependência da dose e do tempo de administração. Efeitos pró-oxidantes entraram em equilíbrio devido à ação de antioxidantes. O etanol, em associação ou não, promove alterações em células do sistema imune, no entanto, sem promover imunomodulação sobre suas respostas. O etanol e/ou a cetamina também promovem alterações histopatológicas hepáticas, enquanto que a associação ainda promove lesões vesicais. Além disso, ambas as drogas promovem alterações no perfil neuroquímico central; porém, quando associadas não promoveram efeitos sinérgicos sobre os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Álcool. Polidrogas. Espécies reativas. Neurotoxicidade. Imunotoxicidade.

ABSTRACT

MENDES, P. F. **Ketamine associated or not with alcohol, what are the toxicological consequences and influence on oxidative stress? Study in rats** [A cetamina associada ou não ao álcool, quais as consequências toxicológicas e sua influência no estresse oxidativo? Estudo em ratos] 2018. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The recreational use and the deleterious effects of licit and/or illicit drugs are considered a public health issue. Among these drugs are ketamine, used in veterinary anaesthesia, and ethanol the most commonly licit drug. Besides their central effects, studies have shown that ketamine and ethanol have immunomodulatory properties. However, few studies are conducted with the association of both drugs; thus, we aimed to evaluate the toxic and immunotoxic effects, as well the oxidative potential and the possible neurotoxic effects resulted from the consumption of these drugs associated or not. For this, Wistar rats were treated once daily for up to 28 days with intraperitoneal injections (15 or 30mg/kg/BW) of ketamine (K) or orally with 10% ethanol (E) (gavage or drinking water) or the association of both treatments (KE). Control group received only vehicles. At the end of the experimental period, the animals were euthanized for toxicological, immunotoxicological, oxidative stress and antioxidant status evaluation, and central levels of neurotransmitters. KE animals showed reduced body weight gain and increased levels of urinary ascorbic acid. Reduction of urinary pH and glucose was observed in E and KE groups. Biochemistry analysis showed an increase in HDL levels in all experimental groups; although, KE showed an increase in cholesterol levels, while K group exhibited reduction in triglycerides and alkaline phosphatase (ALP) levels. Only KE group showed renal function alterations. All experimental groups showed hepatic and/or bladder histopathology alterations. E and KE groups exhibited alterations in myeloid and lymphoid cells number with concomitant increased in bone marrow cellularity. Only animals of KE group presented changes in Th2 response. Increased in lipid peroxidation was observed in K-treated animals, as well as GPx and CAT activities and GSSG content of animals treated with E and/or KE. We observed elevation in DA and NOR in hippocampus of E group and 5HT in K group, in addition to an increase in DA and 5HT of the prefrontal cortex of E and K groups, respectively. Thus, we conclude that KE association promotes reduction in body weight gain not related to food consumption. Ethanol, in combination or not, promotes urinary alterations; ketamine reduces ALP levels and the drugs, when in combination, alter lipid and renal profile depending on dose and time of administration. Pro-oxidant effects were balanced due to the

action of antioxidants. Ethanol, associated or not, promotes alterations on immune cells without immunomodulatory responses. Ethanol and/or ketamine also promotes liver histopathological alterations, while this association promotes bladder lesions. In addition, both drugs promote changes in central neurochemical levels; however, when associated do not promote synergistic effects in evaluated parameters.

Keywords: Alcohol. Polydrugs. Reactive species. Neurotoxicity. Immunotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural do etanol.....	36
Figura 2 -	Três principais vias de biotransformação do etanol.....	41
Figura 3 -	Ilustração exibindo os sítios de ligação do etanol nos receptores do tipo GABA _A	43
Figura 4 -	Representação de um corte sagital médio do encéfalo humano destacando as principais regiões envolvidas no sistema de recompensa cerebral (via mesolímbica-mesocortical).....	45
Figura 5 -	Efeitos inibitórios do etanol sobre as condutâncias iônicas.....	47
Figura 6 -	Fórmula estrutural da cetamina.....	49
Figura 7 -	Fórmula estrutural da fenciclidina (a) e da cetamina (b).....	51
Figura 8 -	As sinapses no sistema glutamatérgico e o ciclo glutamato-glutamina.....	62
Figura 9 -	Ilustração exibindo o receptor do tipo NMDA, seus canais iônicos (influxo e efluxo de íons) e sítios de ligação moleculares.....	63
Figura 10 -	Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.....	103
Figura 11 -	Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.....	104
Figura 12 -	Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.....	111
Figura 13 -	Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.....	112
Figura 14 -	Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	119
Figura 15 -	Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	120
Figura 16 -	Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	127
Figura 17 -	Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	128
Figura 18 -	Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	135
Figura 19 -	Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	136
Figura 20 -	Função renal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	137

Figura 21 - Avaliação histopatológica do fígado de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	140
Figura 22 - Avaliação histopatológica do fígado (aumento de 10x) de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	141
Figura 23 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	145
Figura 24 - Diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	146
Figura 25 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	147
Figura 26 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	148
Figura 27 - Níveis séricos de glicose de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	149
Figura 28 - Função renal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	149
Figura 29 - Avaliação histopatológica do fígado de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	152
Figura 30 - Avaliação histopatológica da bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	153
Figura 31 - Reação de hipersensibilidade tardia (DTH), de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	157
Figura 32 - Parâmetros neuroquímicos do hipocampo e do córtex pré-frontal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	161
Figura 33 - Parâmetros neuroquímicos do hipocampo e do córtex pré-frontal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.....	101
Tabela 2 -	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.	102
Tabela 3 -	Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.....	105
Tabela 4 -	Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.....	107
Tabela 5 -	Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.....	108
Tabela 6 -	Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.....	109
Tabela 7 -	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.	110
Tabela 8 -	Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.....	113
Tabela 9 -	Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.....	115
Tabela 10	Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.....	116
Tabela 11 -	Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	117
Tabela 12 -	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	118

Tabela 13 -	Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	121
Tabela 14 -	Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	123
Tabela 15	Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.....	124
Tabela 16 -	Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	125
Tabela 17	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	126
Tabela 18 -	Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	129
Tabela 19 -	Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	131
Tabela 20	Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.....	132
Tabela 21 -	Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	133
Tabela 22 -	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	134
Tabela 23 -	Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	138
Tabela 24 -	Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	142
Tabela 25	Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	143

Tabela 26 -	Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	151
Tabela 27	Peso relativo e morfometria do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	156
Tabela 28 -	Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado e rim de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq.....	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
VPT.....	Departamento de Patologia
FMVZ-USP.....	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
ICAQF.....	Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas
UNIFESP.....	Universidade Federal de São Paulo
LADTOX.....	Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia
IC.....	Iniciação científica
K.....	grupo de animais tratados com cetamina
E.....	grupo de animais tratados com etanol a 10%
KE.....	grupo de animais tratado com cetamina e etanol
PV.....	peso vivo
BW.....	body weight
HDL.....	<i>High-density lipoproteins</i>
ALP.....	alkaline phosphatase
ONU.....	Organização das Nações Unidas
MS.....	Ministérios da Saúde
EUA.....	Estados Unidos da América
SNC.....	sistema nervoso central
PNAD.....	Política Nacional sobre Drogas
SENAD.....	Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas
CEBRID.....	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
UNIFESP.....	Universidade Federal de São Paulo
LENAD.....	Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil
TNF- α	fator de necrose tumoral
IL-6.....	interleucina 6
IL-1 β	interleucina 1 beta
NF- κ B.....	fator de transcrição nuclear kappa-beta
NO.....	óxido nítrico
MAPA.....	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SIPEAGRO.....	Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários
ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SVS/MS.....	Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde

RDC.....	Resolução da Diretoria Colegiada
OPAS.....	Organização Pan-Americana de Saúde
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
TGI.....	trato gastrointestinal
ADH.....	álcool desidrogenase
ALDH.....	aldeído desidrogenase
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida adenina (forma oxidada)
NADH.....	dinucleótido de nicotinamida adenina (forma reduzida)
ROS.....	espécies reativas de oxigênio
ADH7.....	álcool desidrogenase 7
ALDH2.....	aldeído desidrogenase 2
SOME.....	Sistema de Oxidação Microsomal do Etanol
NADPH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
CYP2E1.....	citocromo P450 2E1
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
CO ₂	dióxido de carbono
H ₂ O.....	água
Na ⁺	sódio
K ⁺	potássio
ATPase.....	adenosinatrifosfatases
GABA.....	ácido gama-aminobutírico
GABA _A	subtipo A do receptor do ácido gama-aminobutírico
Cl ⁻	cloro
α.....	alfa
β.....	beta
γ.....	gama
δ.....	delta
NMDA.....	receptores ionotrópicos de glutamato do tipo N-Metil D-Aspartato
GLU.....	glutamato
LTP.....	<i>Long Term Potentiation</i>
DA.....	dopamina
5HT.....	serotonina
NOR.....	noradrenalina
5-HT ₃	receptores serotoninérgicos do subtipo 3

Ca ²⁺	cálcio
S(+).	levógiro
R(-).	dextrógiro
PCP.....	fenciclidina
FDA.....	Food and Drug Administration
CSA.....	Controlled Substance Act
DEA.....	Drug Enforcement Administration
AVMA.....	American Veterinary Medical Association
NIDA.....	National Institute on Drug Abuse
ACMD.....	United Kingdom Advisory Council on the Misuse of Drugs
4OH-cetamina.....	4-hidroxinorcetamina
5OH-cetamina.....	5-hidroxinorcetamina
6OH-cetamina.....	6-hidroxinorcetamina
Mg ²⁺	magnésio
Zn ²⁺	zinco
AMPA.....	ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol-propiónico
mGluR.....	receptores glutamatérgicos metabotrópicos
GLU/NO/GMPc.....	glutamato/óxido nítrico/monofosfato cíclico de guanosina
iNOS.....	óxido nítrico sintase
Gq.....	proteína G excitatória
Gi.....	proteína G inibitória
AMPc.....	adenosina monofosfato cíclico
δ.....	sigma
μ.....	mi
κ.....	kappa
MK-801.....	maleato de dizolcipina
IL-1β.....	interleucina-1 beta
Co.....	grupo controle
tGSH.....	glutathione total
GSSG.....	glutathione oxidada
TBARS.....	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
SOD.....	superóxido dismutase
CAT.....	catalase
GPx.....	glutathione peroxidase

DTH.....*Delayed-Type Hypersensitivity*
 IgM.....imunoglobulinas do subtipo M
 IgG.....imunoglobulinas do subtipo G
 CEUA.....Comitê de Ética no Uso de Animais
 FA.....fosfatase alcalina
 ALT.....alanina transaminase
 AST.....aspartato transaminase
 GGT.....gama-glutamyl transpeptidase
 RBC.....*red blood cells*
 WBC.....*white blood cells*
 MCV.....*mean corpuscular volume*
 MCH.....*mean corpuscular hemoglobin*
 MCHC.....*mean corpuscular hemoglobin concentration*
 KLH.....*Keyhole Limpet Hemocyanin*
 HRP.....*horseradish peroxidase*
 DTNB.....ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
 DHBA.....ácido 3,4 dihidroxibenzilamina
 DOPAC.....ácido 3,4 dihidroxifenilacético
 5HIA.....ácido 5- hidroxindolacético
 VMA.....ácido vanilmandélico
 I.P.....intraperitoneal
 HE.....hematoxilina e eosina
 USA.....United States of America
 ANOVA.....análise de variância
 C/M.....razão entre as áreas da região cortical e medular do timo
 PV/PB.....razão entre as áreas das polpas vermelha e branca do baço
 ha-KLH.....*heat-aggregated-KHL*
 I.D.....intradérmica
 ELISA.....*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
 BSA.....soro albumina sérica
 TMB.....tetrametilbenzidina
 KCl.....cloreto de potássio
 DTNB.....ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
 GSH.....glutationa reduzida

GR.....glutathione redutase
 TNB.....5-tio-2-nitrobenzoato
 KCN.....cianeto de potássio
 ROOH.....hidroperóxidos orgânicos
 t-BOOH.....peróxido de ter-butila
 CuSO₄.....sulfato de cobre
 HPLC.....*High Performance Liquid Chromatography*
 ED.....detecção eletroquímica
 ClHO₄.....ácido perclórico
 Na₂S₂O₅.....metabissulfato de sódio
 DHBA.....ácido 3,4-dihidroxibenzilamina
 C-18.....octadecilsilano
 NaH₂PO₄.....fosfato de sódio dibásico
 HSA.....ácido heptanossulfônico
 H₃PO₄.....ácido ortofosfórico
 HPLC-DAD.....cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos
 PDA.....*photo diode array*
 Gli.....glicose
 Asc.....ácido ascórbico
 Bil.....bilirrubina
 Prot.....proteína
 Hemo.....hemoglobina
 Eritro.....eritrócitos
 Leuco.....leucócitos.
 VC.....veia centrolobular
 TP.....trato portal
 Gl.....glomérulo
 Vac.....degeneração vacuolar
 Con.....congestão vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	28
1.1	DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	28
1.1.1	Histórico do uso de drogas de abuso por profissionais de saúde.....	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	36
2.1	ETANOL.....	36
2.1.1	Química do etanol.....	36
2.1.2	Uso do etanol como droga de abuso.....	37
2.1.3	Metabolismo do etanol: absorção, distribuição, biotransformação e excreção.....	38
2.1.4	Efeitos do etanol sobre o sistema nervoso central.....	42
2.1.5	Toxicidade do etanol.....	47
2.2	CETAMINA.....	49
2.2.1	Química da cetamina.....	49
2.2.2	Uso da cetamina como droga de abuso.....	50
2.2.3	Metabolismo da cetamina: absorção, distribuição, biotransformação e excreção.....	58
2.2.4	Efeitos da cetamina sobre o SNC.....	59
2.2.4.1	Neurofarmacologia da cetamina.....	59
2.2.4.2	Atuação sobre receptores do tipo NMDA.....	60
2.2.4.3	Receptores do tipo não-NMDA e metabotrópicos.....	64
2.2.4.4	Efeitos analgésicos a anestésicos.....	65
2.2.4.5	Esquizofrenia, efeitos alucinógenos e dopamina.....	65
2.2.4.6	Efeitos sobre os receptores colinérgicos.....	66
2.2.4.7	Efeitos sobre as monoaminas.....	67
2.2.4.8	Efeitos sobre os receptores gabaérgicos.....	68
2.2.4.9	Efeitos antidepressivos da cetamina.....	68
2.2.5	Toxicidade da cetamina.....	69
3	OBJETIVOS.....	71
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
3.1.1	Primeira fase experimental.....	71
3.1.2	Segunda fase experimental.....	72
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.1	ANIMAIS.....	73
4.2	REAGENTES.....	74
4.3	TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	75
4.3.1	Primeira fase experimental.....	75
4.3.1.1	Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo.....	75
4.3.2	Segunda fase experimental.....	76
4.3.2.1	Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade, estresse oxidativo e estudo neuroquímico.....	76
4.4	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	77
4.4.1	Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos.....	77

4.4.2	Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia.....	77
4.5	AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA.....	78
4.5.1	Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo, celularidades e morfometria.....	78
4.5.2	Avaliação da resposta imune celular e humoral (adquirida).....	79
4.5.2.1	Reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/ <i>Delayed-Type Hypersensitivity</i> - DTH).....	79
4.5.2.2	Mensuração dos níveis séricos de anticorpos T-dependentes específicos através do título de imunoglobulinas do subtipo M (IgM) e G (IgG).....	79
4.6	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	80
4.6.1	Coleta do fígado.....	80
4.6.2	Ensaio para avaliação das atividades das glutations total (tGSH) e oxidada (GSSG).....	81
4.6.3	Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>- TBARS).....	82
4.6.4	Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).....	82
4.6.5	Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT).....	83
4.6.6	Atividade da enzima antioxidante glutational peroxidase (GPx).....	83
4.6.7	Determinação de proteína.....	84
4.8	ESTUDO NEUROQUÍMICO.....	85
4.8.1	Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.....	85
4.8.2	Colheita das estruturas cerebrais.....	85
4.8.3	Preparo das amostras para análise em HPLC.....	85
4.8.4	Condições do HPLC.....	86
4.8.5	Preparo das soluções para análise em HPLC.....	86
4.9	EUTANÁSIA.....	88
4.10	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	88
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	89
6	RESULTADOS.....	101
6.1	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 3 DIAS.....	101
6.1.1	Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 3 dias.....	101
6.1.1.1	Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 3 dias.....	101
6.1.1.2	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 3 dias.....	102
6.1.1.3	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 3 dias.....	103
6.1.1.4	Urinálise dos animais tratados por 3 dias.....	105
6.1.1.5	Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 3 dias.....	106
6.1.2	Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 3 dias.....	107
6.1.2.1	Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 3 dias.....	107

6.1.3	Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 3 dias.....	108
6.2	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 7 DIAS.....	109
6.2.1	Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 7 dias.....	109
6.2.1.1	Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 7 dias.....	109
6.2.1.2	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 7 dias.....	110
6.2.1.3	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 7 dias.....	111
6.2.1.4	Urinálise dos animais tratados por 7 dias.....	113
6.2.1.5	Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 7 dias.....	114
6.2.2	Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 7 dias.....	115
6.2.2.1	Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 7 dias.....	115
6.2.3	Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 7 dias.....	116
6.3	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 14 DIAS.....	117
6.3.1	Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 14 dias.....	117
6.3.1.1	Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 14 dias.....	117
6.3.1.2	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 14 dias.....	118
6.3.1.3	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 14 dias.....	119
6.3.1.4	Urinálise dos animais tratados por 14 dias.....	121
6.3.1.5	Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 14 dias.....	122
6.3.2	Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 14 dias.....	123
6.3.2.1	Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 14 dias.....	123
6.3.3	Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 14 dias.....	124
6.4	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 21 DIAS.....	125
6.4.1	Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 21 dias.....	125
6.4.1.1	Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 21 dias.....	125

6.4.1.2	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 21 dias.....	126
6.4.1.3	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 21 dias.....	127
6.4.1.4	Urinálise dos animais tratados por 21 dias.....	129
6.4.1.5	Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 21 dias.....	130
6.4.2	Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 21 dias.....	131
6.4.2.1	Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 21 dias.....	131
6.4.3	Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 21 dias.....	132
6.5	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 28 DIAS.....	133
6.5.1	Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 28 dias.....	133
6.5.1.1	Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 28 dias.....	133
6.5.1.2	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 28 dias.....	134
6.5.1.3	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 28 dias.....	135
6.5.1.4	Urinálise dos animais tratados por 28 dias.....	138
6.5.1.5	Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 28 dias.....	139
6.5.2	Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 28 dias.....	142
6.5.2.1	Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 28 dias.....	142
6.5.3	Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 28 dias.....	143
6.6	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 30mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, ETANOL (E) A 10% NA ÁGUA DE BEBIDA, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 28 DIAS.....	144
6.6.1	Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 28 dias.....	144
6.6.1.1	Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 28 dias.....	144
6.6.1.2	Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 28 dias.....	146
6.6.1.3	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 28 dias.....	147
6.6.1.4	Urinálise dos animais tratados por 28 dias.....	150
6.6.1.5	Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 28 dias.....	151
6.6.2	Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 28 dias.....	154
6.6.2.1	Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 28 dias.....	154

6.6.2.2	Avaliação da resposta imune adquirida: reação de hipersensibilidade do tipo IV (<i>Delayed-Type Hypersensitivity</i> - DTH) e avaliações dos níveis séricos de anticorpos específicos (IgM e IgG anti-KLH).....	156
6.6.3	Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 28 dias.....	158
6.6.4	Estudo neuroquímico dos animais tratados por 28 dias.....	160
7	DISCUSSÃO.....	163
8	CONCLUSÃO.....	186
9	REFERÊNCIAS.....	187
	APÊNDICE.....	227

1 INTRODUÇÃO

“[...] Atualmente recorre-se às drogas diante das incertezas da vida, como forma de diminuir a ansiedade, de estar em um mundo conflituoso. (...) O consumo de drogas cresceu em uma sociedade em que os valores humanos e afetivos são deixados de lado e as necessidades básicas emocionais são canalizadas para o consumo desenfreado, do prazer a qualquer custo, em que o eu sempre prevalece em detrimento do coletivo”. (PASSAGLI, 2011.)

1.1 DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Devido ao fato de haver diferenças no vernáculo português sobre alguns substantivos que em outras línguas podem ser sinônimos, decidiu-se por trazer algumas definições neste trabalho (SPINOSA, 2011), afim de que não haja, ao longo do texto, conflitos acerca dos termos utilizados.

Droga: é o termo usado para se referir a qualquer substância química que, em quantidade suficiente, pode agir sobre um organismo vivo, produzindo alterações tanto maléficas como benéficas. Uma droga não cria funções, apenas modifica aquelas já existentes.

Fármaco: designa uma substância química conhecida e de estrutura química definida dotada de propriedade farmacológica, ou seja, que poder ser utilizada com finalidade terapêutica, profilática, curativa e/ou paliativa.

Medicamento: é qualquer substância química empregada em um organismo vivo, visando-se obter efeitos benéficos. Consistem em formas farmacêuticas terminadas que contém o fármaco, geralmente em associação com adjuvantes farmacotécnicos. São destinadas a curar, diminuir, prevenir e/ou diagnosticar enfermidades. Todo medicamento é uma droga, no entanto, nem toda droga é um medicamento.

Isto posto, devido às propriedades da cetamina, esta pode ser definida por todos os termos acima descritos; porém, como este estudo visa avaliar os efeitos da cetamina quando empregada para uso recreacional ilícito, o termo mais empregado será o de droga.

1.1.1 Histórico do uso de drogas de abuso por profissionais de saúde

A utilização de substâncias com propriedades psicoativas faz parte da história da humanidade (PARROTT et al., 2004; TAVARES; BERIA; LIMA, 2004), podendo ser considerada uma prática milenar e universal (TAVARES; BERIA; LIMA, 2001), associada a rituais culturais e religiosos (RIBEIRO et al., 1999; SILVEIRA, 2010), fins medicinais (PETRILLI; BUENO, 2000; GORGULHO, 2000) e como forma de se buscar a transcendência, por meio de alterações comportamentais e psíquicas (REZENDE, 1997); sendo tais substâncias muitas vezes divinizadas em inúmeras sociedades (CARNEIRO, 2002) e apresentando relevância social, política, econômica e religiosa em diferentes contextos e épocas (SILVEIRA, 2010).

Na antiguidade, drogas alucinógenas obtidas com o preparo de plantas eram utilizadas com finalidades terapêuticas e em cerimônias de rituais religiosos como forma de buscar contato com deuses e espíritos (FOCCHI, 2004). Registros sumerianos datados de 3000 a.C. revelam que os povos desta civilização cultivavam papoulas (*Papaver somniferum*) das quais obtinha-se o ópio, utilizado medicinalmente e descrito por Homero em sua Odisséia como “algo que fazia esquecer o sofrimento” (MACRAE, 2001). No Antigo Egito, os egípcios registraram em papiros as etapas para fabricação, produção e comercialização do vinho e da cerveja, bebida por eles considerada, além de uma moeda de troca para os trabalhadores que construía as pirâmides, uma oferenda aos deuses que também era utilizada para fins medicinais (McGOVERN; FLEMING; KATZ, 1996; VIALA-ARTIGUES; MECHETTI, 2003).

Na Idade Média, o consumo de álcool (outra nomenclatura para o “etanol”) ocorria por meio da ingestão de cerveja, que em muitas regiões da Europa, como na Inglaterra, era considerada como alimento, sendo inclusive ofertada às crianças; mas, o etanol presente no vinho era o mais difundido na época, quando vinhas eram cultivadas em vários países, sendo prática comum entre monges em seus mosteiros para consumo na ceia e também empregado durante a eucaristia nas igrejas (INABA; COHEN, 1991; GATELY, 2008).

A partir do século XVI, a Era das Grandes Navegações proporcionou aos povos europeus a colonização de diversos continentes e o contato com diferentes culturas e novas substâncias psicoativas, como, por exemplo, a folha da coca, que era utilizada pelos nativos dos Andes; o tabaco, usado pelas tribos indígenas da América do Norte; o haxixe, utilizado pelos árabes e o ópio, utilizado pelos chineses no Extremo Oriente. Durante três séculos essas “novas substâncias” foram trazidas pelos europeus ao velho continente, sendo utilizadas como tônicos,

fortificantes, para fins recreativos, principalmente o do ópio, e finalmente para intuítos medicinais (FOCCHI, 2004).

Durante a Idade Moderna (séculos XV à XVIII), a Revolução Industrial e o Capitalismo colaboraram para elevar à concentração da população na zona urbana que buscava emprego nestes centros e, devido à alta demanda, houve o aperfeiçoamento no processo de industrialização da produção de bebidas e consequentemente o aumento do consumo de etanol (BUCHER, 1992). Ainda, a Revolução Industrial promoveu o desenvolvimento de novas técnicas, inclusive aquelas de extração química de substâncias, como a própria cocaína das folhas de coca entre outras, sendo no século XIX que o consumo de etanol e de outras substâncias psicoativas alcançou a sua maior extensão devido à difusão massiva. Pode-se citar também para este período, o início da atividade ilícita do tráfico de produtos caros que antes eram considerados de luxo e de circulação e comercialização restrita pelos países produtores, como por exemplo, o ópio da China, o açúcar e tabaco das Américas, traficados por piratas, o café, entre outros, que se tornaram cada vez mais abundantes e disponíveis (CARNEIRO, 2002).

Um dos notáveis casos pioneiros do uso abusivo de drogas por profissionais de saúde que se tem descrito teve início em 1898 quando o químico alemão Albert Niemann isolou de um extrato de folhas da planta *Erythroxylum coca*, seu princípio ativo: a cocaína, que foi considerada um fármaco milagroso, até mesmo o psicanalista Sigmund Freud foi totalmente favorável a seu uso irrestrito, como descrito em sua obra “Uber coca” (FREUD, 1884). Freud utilizou a cocaína para tratar um amigo médico, Ernst von Fleischl Marxow, contra a dependência do uso de morfina, a qual havia sido prescrita para o tratamento da dor decorrente de um acidente; culminando para um quadro de dependência dupla para este paciente. Karl Köller foi outro amigo médico tratado por Freud que também ficou dependente de cocaína, fazendo com que em 1892, na continuação da escrita de seu tratado “Uber coca”, Freud mostrasse um ponto de vista contrário ao uso da droga (FERREIRA; MARTINI, 2001).

Neste mesmo século (XIX), os problemas decorrentes do uso indiscriminado de drogas por profissionais destas áreas começaram a disseminar-se lentamente (FOCCHI, 2004), despertando a atenção de pesquisadores. Corrobora esta assertiva, um estudo realizado em 1883 o qual determinou que a população médica apresentava elevado risco de óbito associado a complicações provenientes de cirrose ou intoxicações, sugerindo provável aumento da prevalência do uso abusivo de diferentes drogas por estes indivíduos (OGLE, 1886).

Em 1993, Silverstein e colaboradores evidenciaram uma alta incidência do uso de opioides por anestesiológicos. Ainda, em 2000, McGovern; Angres e Leon observaram uma

prevalência de 70,4% no uso de substâncias psicoativas entre médicos autuados por má prática médica.

A investigação envolvendo o aumento da prevalência da dependência de drogas entre os profissionais de saúde ganhou ainda mais destaque e importância no decorrer do século XX, quando o papel histórico das drogas no comércio mundial adquiriu crescente importância (CARNEIRO, 2002), culminando para incitar verdadeiras epidemias de abuso e dependência química (BUCHER, 1992; FOCCHI, 2004). O uso abusivo de drogas tornou-se então um fenômeno social e de saúde pública (SILVA; BOTTI, 2011), fazendo-se necessária a instalação de regulamentações acerca da permissão de seu consumo ou seu proibicionismo (CARNEIRO, 2002).

Assim surgiram estatutos que, obedecendo às injunções culturais e econômicas, contemplam a proibição formal de certas substâncias ditas ilícitas (proibidas por lei, comercializadas de forma ilegal, sob o manto da clandestinidade, exemplos: maconha, cocaína, crack, ecstasy, cetamina, etc), e a permissão de outras socialmente aceitas enquadradas como lícitas (comercializadas de forma legal, podendo ou não estar submetidas a algum tipo de restrição, como, por exemplo, a compra de bebidas alcoólicas e de tabaco por menores de 18 anos) (CARNEIRO, 2002).

No Brasil, as políticas públicas direcionadas a questão das drogas foram influenciadas pelas convenções internacionais realizadas pelas Organizações das Nações Unidas (ONU), sendo elas a “Convenção Única sobre Entorpecentes” de 1961, a “Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas” de 1971, a “Convenção contra o Tráfico Ilícito de Entorpecentes e Substâncias Psicotrópicas” de 1988, e a Política do Ministério da Saúde (MS) para “Atenção Integral a Usuários de Álcool e outras Drogas” publicada em 2003 (BRASIL, 2015).

Visto que o uso abusivo de drogas é apresentado majoritariamente à população como vinculado às drogas ilícitas, ficando as drogas lícitas, que são justamente as mais consumidas, livres para serem veiculadas e incentivadas para o consumo (ZEFERINO et al., 2006), o etanol, proibido nos Estados Unidos da América (EUA) durante o “movimento proibicionista” da “Lei Seca” vigente de 1920 à 1933; é considerado, juntamente com o tabaco, uma das principais drogas lícitas consumidas na atualidade no Brasil (BRASIL, 2007) e no mundo (CARNEIRO, 2002), tendo seu uso, prevalência global e trazendo graves consequências para a saúde pública mundial (CARLINI et al., 2002; 2007).

O mecanismo do proibicionismo instaurado sobre o consumo de drogas ilícitas também contribui para gerar um mercado negro e aumento pela busca e pelo uso das mesmas, criando um rendoso e robusto comércio clandestino (CARNEIRO, 2004), caracterizado pelo

desenvolvimento do tráfico criminoso (VELHO, 1994) e gerador de violência (REICHENHEIM; HASSELMANN; MORAES, 1999; CARNEIRO, 2002), que, para maiores lucros, adulteram as drogas tornando-as ainda mais nocivas (CARNEIRO, 2002). Na década de 90, com o advento da Internet, a divulgação de novas drogas e de festas promotoras de seus consumos (*raves*), ganhou maior destaque e facilitou ainda mais o acesso às mesmas devido à ausência da necessidade de prescrição e fiscalização das substâncias que são distribuídas e vendidas online (FORMAN; MARLOWE; MCLELLAN, 2006; BELENKO et al., 2009).

Podemos inferir que o uso de drogas faz parte das necessidades humanas (CARNEIRO, 2004) e está intrinsicamente relacionado às interações do indivíduo com o meio em que vive (BRASIL, 2015); porém, o fenômeno contemporâneo do abuso de drogas colabora para distinguir e antagonizar a relação existente entre o consumo de drogas presente em outras épocas, restrito a determinadas situações como: cerimônias, festas e rituais religiosos, visando a transcendência (REZENDE, 1997; RIBEIRO et al., 1999; SILVEIRA, 2010); e o consumo de drogas contemporâneo, feito de forma desenfreada, em busca de prazer, alívio imediato do desconforto físico, psíquico ou da pressão social (ORTH; MORÉ, 2008).

Quando nos referimos ao âmbito dos profissionais de saúde a situação torna-se ainda mais complicada, pois além destas vias de obtenção de drogas, o uso abusivo de substâncias psicoativas pode ser explicado, dentre outros fatores, pela facilidade de acesso às drogas também no cotidiano de trabalho, considerando que, na maioria das vezes, são estes profissionais os responsáveis por realizarem o armazenamento e o controle destas substâncias (WINICK, 1980; McAULIFFE et al., 1987).

O uso de drogas também pode ocorrer de forma recreativa em clubes e/ou festas como meio de socialização (SILVEIRA, 2010), de onde provém a nomenclatura “drogas de abuso recreacionais”; ou devido a problemas emocionais (McAULIFFE et al., 1987; TALBOTT et al., 1987), estresse e fadiga decorrentes de extensas jornadas de trabalho (McAULIFFE et al., 1987; WRIGHT, 1990) exigidas pelo exercício profissional, o que faz com que os profissionais de saúde recorram à automedicação como forma de enfrentar problemas e lidar com a grande tensão proveniente do ambiente de trabalho (McAULIFFE et al., 1986; HUGHES et al., 1991; CAJAZEIRO et al., 2012; JUNGGERMAN et al., 2012).

Dados sugerem que o consumo de drogas por esta classe de profissionais é negligenciado e subestimado (WIJESINGHE; DUNNE, 1999); já que, na maioria das vezes, estes profissionais tendem a trabalhar de forma independente e autossuficiente, retardando a busca por ajuda por parte dos mesmos, consequentemente, a ausência do diagnóstico precoce do problema que os acomete e de uma intervenção efetiva visando o tratamento adequado,

contribui para o estabelecimento de um pior prognóstico para estes profissionais (TALBOTT, BENSON, 1980; ALVES et al., 2005; KENNA; LEWIS, 2008).

Os possíveis danos resultantes do consumo de drogas decorrem não somente do uso dessas substâncias, como também do processo de dependência, que resulta em graves problemas comportamentais e de saúde (LARANJEIRA; SURJAN, 2001). Quando consideramos o âmbito dos profissionais de saúde, isso se torna ainda mais relevante e preocupante, pois, por se tratar de profissionais que lidam diretamente com a vida de seus pacientes, sua capacidade crítica de julgar e seu discernimento profissional devem estar preservados (CAJAZEIRO et al., 2012); no entanto, o consumo de drogas pode não só interferir no autocuidado, como também no cuidado dispensado aos seus pacientes (ZEFERINO et al., 2006).

No cenário atual, observa-se a ocorrência do uso de diversas substâncias químicas associadas, surgindo o conceito de “polidrogas” (YEN; HSU; CHENG, 2007), que consiste, principalmente, no uso do etanol; uma droga depressora do sistema nervoso central (SNC), capaz de aumentar a atividade inibitória gabaérgica (SCHUCKIT, 2009; NIE et al., 2009) e dificultar o processo de despolarização e condução de impulsos nervosos neuronais, resultando inicialmente em um efeito euforizante (diminuição da ansiedade, das inibições, da crítica) (LARANJEIRA; NICASTRI, 1996), e posteriormente relaxante (redução da atividade motora, relaxamento muscular, sedação e sonolência) (SCHUCKIT, 2009); além de também ser capaz de gerar danos oxidativos ao cérebro e fígado, expondo-os à condições pró-oxidantes (BOVERIS et al. 1997); promover peroxidação lipídica, alterar a atividade de enzimas antioxidantes (GIAVAROTTI et al., 2002), e desencadear efeitos imunossupressores sobre a atividade de monócitos, macrófagos e neutrófilos (MOLINA et al., 2010); associado a outras drogas de ação central que podem ser classificadas como alucinógenas, depressoras e/ou estimulantes (GOLD; BYARS; FROST-PINEDA, 2004; ALVES et al., 2005; KENNA; LEWIS, 2008).

No Brasil, a Política Nacional sobre Drogas (PNAD) que preconiza o desenvolvimento permanente de estudos, envolvendo pesquisas e avaliações que permitam aprofundar o conhecimento sobre as drogas e estimar a extensão e as tendências deste consumo, é articulada pela Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas (SENAD), um órgão do governo federal criado em 1998 (BRASIL, 2018).

A SENAD regularmente realiza, em parceria com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), um trabalho intitulado: “Levantamentos Domiciliares sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no

Brasil” (LENADs), possibilitando a obtenção de dados nacionais acerca do consumo de drogas. Em seu segundo levantamento (II LENAD) realizado em 2005 com a participação de 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, o etanol e o tabaco aparecem como as principais drogas utilizadas (BRASIL, 2006), corroborando os dados obtidos no “VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes de Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras”, realizado pelo CEBRID em 2010, o qual destaca que as drogas mais consumidas entre os adolescentes também são o etanol e o tabaco; e ainda, para a maioria dos jovens, as bebidas alcoólicas e o tabaco são a combinação mais frequente, seguidos de etanol e maconha, tabaco e maconha, e etanol e alucinógenos (RIBEIRO et al., 2006; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2012, WINSTOCK et al., 2012; FORMIGONI et al., 2017).

Além do etanol, o “I Levantamento Nacional sobre o Uso de Álcool, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras” realizado pelo SENAD em 2010 destaca a cetamina como uma das substâncias psicoativas utilizada com frequência pelos universitários (BRASIL, 2010).

Sintetizada em meados da década de 60 para ser utilizada como um anestésico na medicina humana, a cetamina, que por apresentar propriedades psicoativas indesejáveis (alucinógenas) passou a ser empregada majoritariamente na medicina veterinária (MORGAN; CURRAN, 2011) e tornou-se uma droga de abuso recreacional consumida com uma frequência cada vez maior em clubes e/ou festas (LANKENAU; CLATTS, 2005; DEGENHARDT; DUNN, 2008), popularizada principalmente na Europa a partir da década de 1990, espalhou-se rapidamente pelos EUA (MOORE et al., 2001) e também foi introduzida no Brasil (FORMIGONI et al., 2017). Esta droga é capaz de desencadear nos usuários efeitos tanto alucinógenos, caracterizados por alterações de humor, despersonalização, delírios, sensação de flutuar fora do corpo e depressão respiratória, podendo culminar em morte (SILVA; BOTTI, 2011); quanto efeitos estimulantes, causando taquicardia e aumento da pressão arterial (VALADÃO, 2010), resultando em situações de êxtase e grande agitação (FOCCHI, 2004).

A cetamina sabidamente possui também propriedades imunomodulatórias, podendo desencadear efeitos tanto anti-inflamatórios, caracterizados pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias [por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6)] através da regulação da ativação do fator transcricional nuclear kappa-beta (NF- κ B); quanto pró-inflamatórios (SUN; WANG; LIU, 2004); como, por exemplo, reduzindo o potencial oxidativo e a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (KAWASAKI et al., 1999).

Além do abuso, devido ao fácil acesso, é recorrente a veiculação de notícias na mídia sobre médicos veterinários traficando a cetamina (FIGUEIREDO, 2006; COSTA; MOTTA, 2006; ALENCAR, 2015), fazendo uso abusivo da droga (GOYAL; AMBEKAR; RAY, 2014; GELLER, 2016), ou até mesmo a utilizando em casos de suicídio (LAWRENCE, 2005; DINIS-OLIVEIRA et al., 2010).

Muitas vezes a cetamina é adquirida sem a necessidade de prescrição ou receita médica veterinária, sendo vendida livremente em casas agropecuárias, estabelecimentos veterinários ou sites de comércio eletrônico (WOLFF; WINSTOCK, 2006; QUESSADA et al., 2009; ALENCAR, 2015). Assim, afim de estabelecer maior controle sobre a comercialização da cetamina e de outras substâncias importantes do ponto de vista de saúde pública, em 2017, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou a Instrução Normativa nº 35 de 11 de setembro de 2017, estabelecendo novos procedimentos para os médicos veterinários quanto a prescrição de substâncias sujeitas à controle especial, bem como para os estabelecimentos que fabricam, armazenam, comercializam, manipulam, distribuem, importam ou exportam esses tipos de substâncias, instituindo a exigência de registro dos mesmos no Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários (SIPEAGRO) (Diário Oficial da União, 2017). A cetamina permanece em sua posição número 27 na Lista C1 de “Substâncias Sujetas a Controle Especial” (Sujeitas a Receita de Controle Especial em duas vias), instaurada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Portaria SVS/MS (Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde) nº 344 - Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 87, de 28 de Junho de 2016 (ANVISA, 2016).

Considerando que a cetamina e o etanol são substâncias psicoativas capazes de alterar a percepção do indivíduo e suas funções fisiológicas, e destacando a importância do uso indevido da cetamina para a medicina veterinária e para a saúde pública, limitados são os estudos que, contemplando um cenário de abuso de polidrogas, objetivam empregar protocolos para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos, imunotóxicos, oxidativos e neuronais provenientes do uso de ambas as drogas de forma associada ou não.

Isto posto, o presente estudo tem como objetivo geral avaliar os efeitos tóxicos, imunotóxicos, bem como os parâmetros oxidativos e as alterações neuroquímicas, provenientes da administração, por via injetável (intra-peritoneal) da cetamina e, por via oral do etanol em ratos Wistar por um período de 28 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETANOL

2.1.1 Química do etanol

O etanol (álcool, álcool etílico); fórmula molecular: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (Figura 1); CAS nº: 64-17-5, é um líquido incolor, volátil, inflamável, com ponto de ebulição de $78,3^\circ\text{C}$ e ponto de fusão de aproximadamente -114°C . Sua densidade é de $0,789\text{ g cm}^{-3}$. É miscível nos solventes etil-éter, acetona e clorofórmio, e também solúvel em benzeno e água. Possui pH neutro, variando entre 6 e 8 (PUBCHEM, 2016).

Figura 1 - Fórmula estrutural do etanol. (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2015).

O etanol é produzido pelo processo de fermentação alcoólica de açúcares realizado por leveduras e apresenta-se em duas formas de uso, a forma anidra e a forma hidratada. A forma anidra possui teor alcoólico de 99,3% sendo utilizada como combustível para veículos ou matéria-prima para indústrias de tintas e solventes. Já o etanol hidratado possui teor alcoólico de 92,6% sendo utilizado na indústria farmacêutica, em produtos para limpeza e na indústria química e de bebidas (SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI, 2008).

2.1.2 Uso do etanol como droga de abuso

Evidências arqueológicas sugerem que a produção e o consumo de etanol datam de aproximadamente 7000 anos atrás no antigo Egito e na Babilônia (LEBEAU; MOZAYANI, 2001); no Brasil, os portugueses vindos da Europa trouxeram algumas bebidas alcoólicas comumente utilizadas como o vinho, a cerveja e outros destilados. A instalação dos engenhos para produção de açúcar a partir da cana tornaram os destilados nacionais. Obtida a partir da fermentação e destilação da borra do melaço, a aguardente, também conhecida como cachaça, tornou-se acessível às populações menos abastadas e era fornecida aos escravos pelos senhores de engenho, a fim de alegrá-los em ocasiões festivas (SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI, 2008), reforçando a ideia de que as bebidas alcoólicas sempre foram indispensáveis nos ritos de sociabilidade, cura, devoção, consolo e prazer (CARNEIRO, 2002).

Segundo o último levantamento do “Relatório Regional sobre Álcool e Saúde nas Américas”, elaborado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), junto a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2015, o etanol foi o responsável por ocasionar mais de 300 mil mortes nas Américas no ano de 2012 (GAWRYSZEWSKI; MONTEIRO, 2014). No Brasil, em 2010, a cada 100 mil habitantes, aproximadamente 74 homens morreram devido à complicações decorrentes do consumo de etanol, deixando o país na 3ª posição do *ranking* relacionado à mortes associadas ao consumo de etanol entre os países das Américas, entre as mulheres este número consistiu em cerca de 12 a cada 100 mil habitantes, ocupando a 11ª colocação no *ranking* (WHO, 2014).

O etanol é considerado a droga lícita mais consumida na sociedade atual, quase 2 bilhões de pessoas no mundo fazem seu uso (UNODC, 2008), é a causa atribuível de 3,8% das mortes e 4,6% dos casos de doenças mundialmente, sendo apontado como o agente desencadeador de mais de 60 tipos de enfermidades (ANDERSON; CHISHOLM; FUHR, 2009; REHM et al., 2009), constituindo um grave problema de saúde pública, já que seu consumo de caráter legal possibilita que seja amplamente divulgado e distribuído, resultando em complicações que podem atingir a vida pessoal, familiar, escolar, ocupacional e social do usuário (NICASTRI; RAMOS, 2001). Ainda, o etanol por ser capaz de desencadear efeitos psicoativos é considerado uma “droga facilitadora de crimes”, envolvida em casos de roubos, assaltos e/ou estupros (*rape drug*), enquanto, sob os efeitos hipnóticos e sedativos do etanol, a vítima pode permanecer desacordada e incapacitada de evitar um ofensor (SHBAIR; ELJABOUR; LHERMITTE,

2010). Além disso, o padrão de seu uso, predita o risco de abuso, de forma associada ou não, de outras drogas lícitas e/ou ilícitas (KENNA; LEWIS, 2008).

2.1.3 Metabolismo do etanol: absorção, distribuição, biotransformação e excreção

Após a ingestão, o etanol é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal (TGI) atingindo a circulação sanguínea e alcançando picos de concentração em aproximadamente 30 minutos à 1h após o seu consumo. (LEBEAU; MOZAYANI, 2001).

O etanol é capaz de distribuir-se rapidamente por todo o organismo intra e extracelularmente devido a sua extremidade apolar e seu baixo peso molecular, atingindo o SNC pela transposição da barreira hematoencefálica (SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI, 2008), sendo biotransformado majoritariamente por três principais vias oxidativas envolvendo sistemas enzimáticos (Figura 2):

1) Álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH):

O fígado é o órgão responsável por depurar grande parte do etanol ingerido (>90%) por meio do metabolismo hepático de primeira passagem, pela ação da enzima ADH presente em grandes concentrações no citoplasma dos hepatócitos, o etanol é oxidado a acetaldeído e, posteriormente, em uma segunda fase pela ação da enzima mitocondrial ALDH, o acetaldeído é oxidado a acetato (ácido acético) (PAUL et al., 2008). Este processo de oxidação envolve um transportador intermediário de elétrons, o cofator enzimático (coenzima) dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+ : forma oxidada), que durante essa reação é reduzido (íon hidrogênio é transferido do etanol para NAD^+) promovendo a formação de NADH (forma reduzida do NAD^+).

Assim, o processo de biotransformação do etanol é regulado pela capacidade mitocondrial em utilizar NADH e regenerar NAD^+ já que ambas as enzimas ADH e ALDH necessitam da presença de NAD^+ para realizar suas funções (STEWART; DAY, 2006). A disponibilidade de NAD^+ limita a velocidade das sucessivas oxidações do etanol e também leva a competição entre o etanol e outros substratos metabólicos dependentes dos níveis disponíveis de NAD^+ (RANG et al., 2004).

A intensificação do processo de transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial induzida pelo consumo de etanol promove o aumento da produção e da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), podendo desencadear danos

decorrentes do estresse oxidativo gerado, sendo este um importante fator a ser considerado na lesão hepática induzida pelo seu consumo (CHEN et al., 1999; MANSOURI et al., 1999).

A ADH é expressa principalmente no fígado e nas adrenais, sendo menos evidente nos rins, pulmões, vasos sanguíneos, estômago e no cérebro (KLAASSEN, 2008; MASTERS, 2012). Essa isoenzima é capaz também de reduzir o acetaldeído resultando novamente na formação de etanol. O acetaldeído é considerado um metabólito intermediário mais tóxico e reativo do que o próprio etanol e pode contribuir para a hepatotoxicidade, estando relacionado à manifestação de sinais clínicos desagradáveis (“ressaca”) após a ingestão de altas doses de etanol, como: rubor facial, cefaleia, náusea, êmese, letargia, hipotensão e dispneia, sintomas que podem durar de 30 minutos a algumas horas, seguidos por exaustão e fadiga, além de aumentar o risco ao desenvolvimento de danos hepáticos teciduais como fibrose, cirrose e neoplasias devido ao seu potencial mutagênico (GOLAN et al., 2009).

Cerca de 25% do acetaldeído é biotransformado fora do fígado pela ação de isoenzimas da classe IV da ADH, como a álcool desidrogenase 7 (ADH7) localizada na mucosa gástrica que, embora com menor afinidade, também é capaz de oxidar o etanol à acetaldeído. Nas mulheres, nos usuários crônicos de etanol (FREZZA et al., 1990) e durante períodos de jejum, a ADH7 reduz sua atividade, razão pela qual os sinais clínicos decorrentes do consumo de etanol são mais rapidamente evidenciados (LEVITT, 1993).

Tanto a ADH como a ALDH exibem polimorfismos genéticos e variações étnicas, influenciando no desenvolvimento do alcoolismo e danos ao fígado (AGARWAL, 2001; DAY, 2006), por exemplo, os asiáticos são geneticamente deficientes em apresentar as isoenzimas ADH7 e aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), razão pela qual são mais susceptíveis aos efeitos desencadeados pelo consumo do etanol e ao desenvolvimento de doenças hepáticas associadas ao seu consumo (ENOMOTO et al., 1991; SEITZ; ONETA, 1998).

2) Sistema de Oxidação Microssomal do Etanol (SOME): ação da isoenzima CYP2E1 pertencente ao citocromo P450:

O etanol é capaz de induzir a enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1) pertencente ao citocromo P450 catalizando sua oxidação a acetaldeído. A CYP2E1 é expressa principalmente nos hepatócitos presentes na região centrolobular do fígado, mas pode ser encontrada em outros tecidos extra-hepáticos como cérebro, rins, pulmões, medula óssea e linfócitos (STRECK; DALLA COSTA, 1999; LIEBER, 1999). Para realizar as suas funções a CYP2E1 requer a presença de oxigênio e do cofator enzimático (coenzima) nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e sua ação é mais relevante na presença de altas concentrações de etanol como em casos de ingestão crônica de etanol (STEWART; DAY, 2006).

3) Ação da enzima peroxisomal catalase:

Estima-se que somente uma pequena parcela do etanol (<2%) é biotransformado em acetaldeído pela ação da enzima catalase presente nos peroxissomos uma vez que os hepatócitos exibem somente uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para suportar esta reação. Nesta via o etanol funciona como um doador de elétrons promovendo a redução de H_2O_2 à água, sendo assim, a capacidade desta reação é limitada conforme os níveis de H_2O_2 presente nos hepatócitos (STEWART; DAY, 2006).

A conversão do etanol ao metabólito final (acetato) de sua biotransformação é essencialmente hepática e permite que 90 a 95% do etanol que adentre o organismo seja completamente oxidado. O acetato é oxidado nos tecidos periféricos (coração, músculos esqueléticos e cérebro) resultando na formação de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) (KLAASSEN, 2008).

Um pequeno grau de esterificação do etanol com vários ácidos graxos ocorre também nos tecidos promovendo a formação dos ésteres de ácidos graxos que podem contribuir também para a toxicidade após um longo período de consumo do etanol (RANG et al., 2004).

A diurese ocasionada pelo consumo de etanol ocorre devido à inibição da secreção do hormônio antidiurético (RANG et al., 2004), no entanto, apenas de 5 a 10% do volume de etanol consumido é excretado inalteradamente pela urina, suor e ar expirado (pulmões) (SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI, 2008).

Figura 2 - Três principais vias de biotransformação do etanol. Seja no retículo endoplasmático pela ação da CYP2E1, no citoplasma pela ação da álcool desidrogenase ou nos peroxissomos pela ação da catalase, o etanol é oxidado a acetaldeído e, posteriormente, à acetato pela ação da enzima aldeído desidrogenase. O acetato, metabólito final do etanol, é oxidado nos tecidos periféricos originando dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O). NAD⁺ = coenzima: dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada); NADH = forma reduzida da NAD. Modificado de Stewart; Day, 2006.

2.1.4 Efeitos do etanol sobre o sistema nervoso central

Após a absorção, o etanol rapidamente atinge o cérebro devido a capacidade de transpor membranas biológicas (barreira hematoencefálica), associado ao grande aporte sanguíneo que nutre este órgão. O etanol é marcadamente uma droga depressora do SNC; porém, em uma fase aguda desencadeia efeitos estimulantes devido à sua ação depressora inicial sobre receptores dopaminérgicos inibitórios localizados do sistema límbico (efeito inibidor do inibitório), levando a sensações de excitação, euforia, desinibição, autoconfiança, sociabilidade e diminuição da ansiedade (RANG et al., 2004). À medida que sua concentração aumenta no sangue, o etanol passa a atuar sobre outros receptores com ação predominantemente inibitória, traduzindo-se na manifestação de sinais clínicos como: sedação, relaxamento, sonolência, ataxia, desatenção, redução das habilidades cognitivas bem como as habilidades motoras e, na presença de altas concentrações sanguíneas pode resultar em indução de coma, depressão respiratória e consequente óbito (MASTERS, 2012).

O etanol é capaz de atuar de diferentes formas sobre diversas proteínas de membrana que participam dos processos de sinalização, incluindo receptores de neurotransmissores (aminas, aminoácidos, opioides e neuropeptídeos); enzimas como a sódio/potássio-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) e a adenililciclase; canais transportadores e canais iônicos; atuando principalmente como uma droga agonista no processo de neurotransmissão do ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório amplamente distribuído no SNC (MASTERS, 2012).

Embora sejam desconhecidos seus locais de ação específicos nos receptores do tipo GABA, sabe-se que sua maior afinidade é pelo subtipo A (GABA_A), atuando de forma agonista sobre estes receptores, mimetizando e intensificando o efeito do neurotransmissor GABA (neurotransmissão gabaérgica), aumentando a frequência de abertura desses canais, ocasionando aumento do influxo de íon cloro (Cl^-) no neurônio e, consequentemente, hiperpolarização da membrana neuronal e produção de um potencial pós-sináptico inibitório em SNC, resultando nos efeitos ansiolíticos e sedativos atribuídos ao seu consumo (SANTHAKUMAR; WALLNER; OTIS, 2007)

Os receptores do tipo GABA_A consistem em glicoproteínas formadas por diferentes subunidades: alfa 1 ($\alpha 1$), beta 2 ($\beta 2$), gama 2 ($\gamma 2$) e delta (δ), organizadas em diferentes combinações pentaméricas que lhes garantem heterogenicidade molecular. Mesmo na presença de baixas concentrações o etanol possui alta afinidade de ligação sobre a superfície extracelular

da subunidade δ (LOVINGER, 1993; BORGHESE et al., 2014) dos receptores do subtipo GABA_A e, na presença de altas concentrações, também é capaz de interagir, porém com menor afinidade, com aminoácidos específicos localizados em regiões transmembranares em outras subunidades que compõem estes receptores (OLSEN; LI, 2011; BORGHESE et al., 2014). (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração exibindo os sítios de ligação do etanol nos receptores do tipo GABA_A. O neurotransmissor GABA interage com os sítios de ligação localizados entre as subunidades α e β , promovendo a abertura do canal de Cl^- e influxo deste ânion no neurônio resultando em sua hiperpolarização. GABA_A = subtipo A do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), Subunidades α = alfa, β = beta, γ = gama, δ = delta, Cl^- = íon cloro. Modificado de Masters, 2012; Richter et al., 2012.

O etanol atua também como agonista sobre a subunidade $\alpha 1$ do receptor de glicina (canal permeável ao íon cloro), potencializando a transmissão sináptica inibitória em SNC (GOLDFRANK, 2002).

Estes efeitos podem ser ainda mais acentuados pela capacidade do etanol atuar de forma antagonista sobre os receptores ionotrópicos de glutamato do tipo N-Metil D-Aspartato (NMDA), reduzindo o efeito excitatório do neurotransmissor glutamato (GLU) sobre estes receptores, inibindo a abertura de canais iônicos permeáveis ao cálcio (Ca^{2+}) associados aos receptores do tipo NMDA e a neurotransmissão glutamatérgica, prejudicando o desenvolvimento de um potencial de ação à longo prazo (*Long Term Potentiation* ou LTP) e, conseqüentemente, comprometendo as funções cognitivas ligadas a memória e aprendizado, ocasionando períodos de perda de memória (*blackouts*), comumente relatados após a ingestão de grandes concentrações de etanol (WEIGHT et al., 1992).

As drogas de abuso são capazes de aumentar a atividade neuronal em algumas partes do SNC, principalmente sobre as vias dopaminérgicas, influenciando o “sistema de recompensa cerebral” (via mesolímbica-mesocortical) (GOLDFRANK, 2002; McINTOSH; CHICK, 2004). Apesar da dopamina (DA) ser considerada o neurotransmissor principal, não é o único presente nesta via. A serotonina (5HT), a noradrenalina (NOR), a acetilcolina e o GABA também são responsáveis pela modulação do SNC e também podem influenciar neste sistema de recompensa (FORMIGONI et al., 2017). (Figura 4).

Figura 4 - Representação de um corte sagital médio do encéfalo humano destacando as principais regiões envolvidas no sistema de recompensa cerebral (via mesolímbica-mesocortical). A via dopaminérgica relacionada à recompensa se projeta a partir da área tegmental ventral (onde localizam-se os corpos neuronais dopaminérgicos) para o *nucleus accumbens* (relacionado a aprendizado e motivação) e córtex pré-frontal (relacionado as funções cognitivas superiores como o aprendizado, o processamento de informações, a linguagem, a comunicação, a memória e o controle do sequenciamento de ações). Modificado de Formigoni et al., 2017.

O etanol por meio da inibição da atividade dos receptores do tipo NMDA, da ativação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 3 (5-HT₃) dos receptores serotoninérgicos e da liberação de opioides endógenos, fatores responsáveis por regular a liberação do neurotransmissor DA, contribui para aumentar a liberação deste neurotransmissor na região do *nucleus accumbens*, mediando efeitos reforçadores e recompensatórios, podendo culminar para um processo de dependência resultante de seu uso (GOLDFRANK, 2002; McINTOSH; CHICK, 2004).

Além de interferir com os receptores serotoninérgicos, o etanol ainda é capaz de alterar os níveis do neurotransmissor 5HT presente em SNC, indicando um possível aumento de sua liberação pelos neurônios serotoninérgicos, ou fazendo com que ela seja degradada mais lentamente nas fendas sinápticas. A 5HT também está relacionada aos efeitos hedônicos (prazer

e bem-estar) resultantes do consumo do etanol e, conseqüentemente, pode aumentar a busca pelo seu uso (McBRIDE et al., 1993).

Em casos de consumo crônico do etanol, o persistente estímulo aos receptores gabaérgicos pode resultar na dessensibilização destes receptores (*downregulation*), e o antagonismo à neurotransmissão glutamatérgica pode resultar em efeitos compensatórios caracterizados pela proliferação de receptores do tipo NMDA com conseqüente aumento da neurotransmissão glutamatérgica, desencadeando um estado de hiperexcitabilidade em SNC podendo levar à excitotoxicidade neuronal (GOLDFRANK, 2002).

A administração crônica de etanol pode também resultar na dessensibilização dos receptores 5-HT₃ à liberação de DA, funcionando como um mecanismo adaptativo ao desenvolvimento de tolerância e estabelecimento da homeostase (THIELEN et al., 2004; McBRIDE et al., 2004).

O desenvolvimento da tolerância e da dependência em quadros de alcoolismo pode culminar para a manifestação da “síndrome de abstinência ao álcool” quando da retirada da bebida à usuários recorrentes, ocasionando o aparecimento de sintomas como: tremor, náuseas, sudorese, febre e até mesmo convulsões e/ou alucinações (NAGY, 2008; RANG et al., 2016).

Além de estimular o influxo de Cl⁻ no neurônio, o etanol também reduz a excitabilidade neuronal ao inibir a abertura de canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes, e ao ativar os canais de K⁺ retificadores de influxo, promovendo o efluxo de K⁺ do neurônio (WANG et al., 1994; WIDMER; LEMOS; TREISTMAN, 1998) (Figura 5).

Figura 5 - Efeitos inibitórios do etanol sobre as condutâncias iônicas. (a) O etanol promove a hiperpolarização da membrana neuronal ao atuar como agonista sobre os receptores gabaérgicos, promovendo a abertura dos canais de cloro (Cl^-) e o influxo deste ânion no neurônio. (b) O etanol também reduz a excitabilidade neuronal ao promover a abertura dos canais de potássio (K^+) e assim o efluxo deste cátion do neurônio; e ao inibir a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem-dependentes. Modificado de Golan et al., 2009.

2.1.5 Toxicidade do etanol

A atividade da ADH, independentemente da concentração do etanol, é constante, consequentemente, sua velocidade de eliminação ocorre de forma linear (linearidade de eliminação do etanol do organismo) (SALASPURO; LIEBER, 1978, MATSUMOTO; FUKUI, 2002), portanto, os principais efeitos provenientes de seu uso são decorrentes de seu consumo crônico, ou seja, são observados na presença de altas concentrações de etanol no organismo, afetando a função de vários órgãos vitais e sistemas, principalmente o fígado, o SNC, o TGI, o sistema cardiovascular e o sistema imune; causando danos teciduais resultantes da associação de seu efeito direto e/ou de seus metabólitos, além de consequências indiretas resultantes do processamento de seus metabólitos ativos (MASTERS, 2012).

O aumento da concentração de ROS, geradas a partir da biotransformação dos metabólitos do etanol, pode resultar em danos teciduais, culminando para o desenvolvimento de estresse oxidativo, principalmente devido ao declínio na atividade das enzimas glutatona e citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons, além de danos mitocondriais,

desregulação de fatores de crescimento e potencialização de lesões induzidas pela produção de citocinas pró-inflamatórias (MASTERS, 2012).

Os casos de óbitos associados ao consumo crônico de etanol são associados à ocorrência de doenças hepáticas, neoplasias, acidentes de trânsito e suicídios (MASTERS, 2012).

O etanol causa aumento da secreção salivar e gástrica, podendo ocasionar irritação da mucosa e/ou úlceras em alcoólatras devido à ação lesiva da secreção ácida, além de aumentar a incidência de desenvolvimento de neoplasias no TGI (SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI, 2008).

O acúmulo de gordura no fígado (esteatose hepática), causado principalmente pela desregulação no metabolismo dos ácidos graxos, pode progredir para ocorrência de hepatite e, eventualmente, necrose hepática seguida de fibrose e cirrose, culminando para o desvio do fluxo sanguíneo hepático e o desenvolvimento de varizes esofágicas que podem se romper causando hemorragias (LIEBER, 1995; SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI, 2008).

Apesar de paradoxal, a ingestão moderada de etanol está relacionada a redução no risco de doenças coronarianas; no entanto, seu consumo crônico pode aumentar a secreção de catecolaminas sistêmicas ou intra-miocárdicas podendo culminar para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como arritmias (MAKI et al., 1998).

A imunossupressão relacionada ao consumo de etanol afeta principalmente as funções das células e moléculas envolvidas na resposta imune inata (PRUETT et al., 2004; BYUN; JEONG, 2010) e pode ser secundária aos danos ocasionados aos órgãos e/ou ao aumento dos níveis de corticosteroides e do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na circulação sanguínea, devido ao estímulo à liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), desencadeado pelo uso de etanol à longo prazo (RIVIER, 1996). Neste contexto, é comum a ocorrência da redução do número de células mononucleares presentes no sangue periférico e a diminuição da quimiotaxia destas células, depleção de linfócitos B e T no baço e linfócitos T no timo, além da supressão da secreção de citocinas pró-inflamatórias (HAN; LIN; PRUETT, 1993).

2.2 CETAMINA

2.2.1 Química da cetamina

A cetamina [quetamina, *ketamine*, cloridrato de cetamina; 2-(o-clorofenil)-2-(metilamino)-cicloexanona]; fórmula molecular: $C_{13}H_{16}ClNO$ (Figura 6); CAS nº: 6740-88-1, é uma arilcicloalquilamina análoga (congênere) da fenciclidina, possui característica lipossolúvel e peso molecular de 238 Daltons (OLIVEIRA et al., 2004). Apresenta-se na forma de cristais de coloração branca, com ponto de fusão entre 92 e 93°C, e, apesar de ser lipossolúvel, também possui propriedades hidrossolúveis com solubilidade em água de $2,8 \times 10^3 \text{ mg/L}$ a 25°C e pressão de vapor de $5,15 \times 10^{-5} \text{ mmHg}$ a 25°C (PUBCHEM, 2016).

Figura 6 - Fórmula estrutural da cetamina (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2015).

A cetamina é comercialmente utilizada como uma mistura racêmica de dois isômeros opticamente ativos (enantiômeros), o isômero S(+) (levógiro) e o isômero R(-) (dextrógiro), associada aos conservantes cloreto de benzetônio e clorbutanol (KOHRS; DURIEUX, 1998; LUFT; MENDES, 2005).

Estes isômeros possuem propriedades farmacológicas distintas e diferentes intensidades de ação que podem influenciar na potência analgésica e anestésica da droga (PLENNINGER et

al., 2002); por exemplo, o isômero S(+) é aproximadamente três vezes mais potente como anestésico, e duas a quatro vezes mais potente como analgésico (WHITE et al., 1985; JAKSCH et al., 2002). Este isômero é mais seletivo, apresentando aproximadamente cinco vezes mais afinidade para a área de ligação da fenciclidina no receptor do tipo NMDA do que o isômero R(-) (HEMELRIJCK; WHITE, 1997; PLENNINGER et al., 2002), além de ser duas vezes mais potente que a forma racêmica (JAKSCH et al., 2002), e ocasionar menos efeitos colaterais que o isômero R(-) (EVERS; CROWDER, 2001). Sendo assim, separando os isômeros, a cetamina pode apresentar maior potência do que sua mistura racêmica, interferindo diretamente na dose utilizada para cada uma de suas ações; no entanto, devido a dificuldade e o alto custo necessário para a sua separação, a cetamina geralmente é comercializada como uma mistura racêmica de seus isômeros (KOHRs; DURIEUX, 1998; OLIVEIRA et al., 2004).

2.2.2 Uso da cetamina como droga de abuso

A cetamina foi desenvolvida no ano de 1962, sintetizada a partir do cloridrato de fenciclidina (*phencyclidine hydrochloride* - PCP), também denominado por fenciclidina (Figura 7), por Calvin Stevens, professor de química orgânica da Universidade Estadual de Wayne nos EUA, que trabalhava também como consultor químico para o laboratório norte-americano Parke & Davis (DOMINO; CHODOFF; CORSEN, 1965; CLARK; TREISMAN, 2011). Descoberta por ocasiões de pesquisas realizadas com o objetivo de produzir um fármaco que ocasionasse menor intensidade de reações adversas, a cetamina visava além de substituir o uso de anestésicos à base de cloridrato de PCP, que geravam severos efeitos colaterais como delírios, pronunciada alteração na percepção sensitiva e psicoses (SMITH; LARIVE; ROMANELLI, 2002); atuar também como uma droga monoanestésica que produzisse simultaneamente analgesia, perda da consciência e imobilidade (KOHRs, DURIEUX, 1998).

Figura 7 - Fórmula estrutural da fenciclidina (a) e da cetamina (b). Por assemelhar-se estruturalmente à fenciclidina (a), a cetamina (b) é capaz de atuar sobre seus sítios de ligação específicos localizados nos receptores do tipo N-Metil D-Aspartato (NMDA). Modificado de Imbert et al., 2014.

A droga foi empregada pela primeira vez como um agente anestésico veterinário em 1963, sendo administrada a macacos (*Macaca mulata*) em testes pré-clínicos farmacológicos (McCARTHY et al. 1965), mais tarde neste mesmo ano a cetamina recebeu na Bélgica sua primeira patente, após a obtenção de resultados promissores com os testes realizados em animais (EMCDDA, 2002).

Em 1964 iniciaram-se os primeiros testes utilizando a droga em seres humanos, consistindo na administração intravenosa da cetamina a 20 voluntários de uma população carcerária (DOMINO, 2010). Constatou-se assim que esta droga possuía um espectro único de ações, incluindo analgesia, anestesia, leve depressão cardiorespiratória com preservação dos reflexos respiratórios e tempo de duração de efeito reduzido; produzindo menos efeitos secundários alucinógenos e, conseqüentemente, proporcionando menos efeitos psicomiméticos do que a PCP (DOMINO; CHODOFF; CORSSSEN, 1965; CORSSSEN; DOMINO, 1966).

Em 1965, determinou-se que a cetamina era uma droga segura para ser utilizada em seres humanos nas práticas anestésicas (PADDLEFORD, 2001), neste mesmo ano, foi realizada a primeira documentação na história relacionando a cetamina e seu potencial uso recreacional, referindo-se a sua capacidade de ser uma potente droga psicodélica (KELLY, 1999).

Os pesquisadores Corssen e Domino (1966) classificaram a cetamina como um “anestésico dissociativo”, devido ao seu uso proporcionar uma intensa sensação de desconexão com o ambiente, perda sensorial marcante, analgesia, amnésia e paralisia do movimento, culminando para um estado cataléptico, sem perda de consciência. Neste mesmo ano a cetamina foi patenteada pelo laboratório Parke & Davis onde foi inicialmente desenvolvida, sendo introduzida no mercado sob o nome comercial de “Ketalar” para uso em humanos como uma droga anestésica, com venda somente mediante prescrição médica (GRINSPOON; BAKALAR,

1997); e a partir de 1970 sob o nome comercial de “Vetalar” para uso veterinário (BECK; COPPOCK; OTT, 1971)

Também em 1970, a cetamina foi oficialmente aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), agência regulamentadora governamental norte-americana responsável pela avaliação, regulamentação e controle do uso de alimentos e drogas; sendo admitida para ser utilizada em seres humanos como um agente anestésico durante procedimentos diagnósticos e cirúrgicos que não requeressem relaxamento muscular esquelético; para a indução de anestesia antes da administração de outros agentes anestésicos gerais; e como uma droga complementar junto ao uso de agentes de baixa potência (FDA, 1979).

Por possuir uma ampla margem de segurança em termos de dosagem, a cetamina foi a droga de escolha empregada como analgésico e anestésico nos campos de batalha pelos militares dos EUA entre os anos de 1960 a 1970, sendo utilizada pelos soldados durante a Guerra do Vietnã, o que fez o interesse pela droga aumentar mundialmente e a cetamina passar a ser usada amplamente tanto para fins terapêuticos, como para fins recreativos e/ou de cunho religioso (KELLY, 1999).

Devido ao aumento de seu emprego na medicina, os relatos acerca dos frequentes e intensos efeitos colaterais resultantes de sua utilização em seres humanos, caracterizados como alucinações, distúrbios proprioceptivos e visuais, sialorreia, rigidez muscular, taquicardia e hipertensão arterial (CLEMENTS; NIMMO, 1981; SCHATZMANN; GIRARD, 1984) ganharam evidência, espalhando-se entre médicos, médicos veterinários e pesquisadores. Em decorrência disso, a cetamina não conseguiu ampla aceitação clínica (SILVA et al., 2010); porém, estes mesmos efeitos contribuíram para que desde 1967 ela começasse a ser utilizada como uma droga recreacional, atingindo uma subcultura emergente, dominada pelo uso de drogas psicoativas (JANSEN, 2004; MORGAN; CURRAN, 2011), principalmente em ambientes de discotecas e clubes, por pessoas que buscavam com o consumo de drogas, experimentar a amplificação de sensações e a melhoria de experiências em ambientes com predomínio de altos volumes de som e variações de luz (GOOTENBERG, 2003; ABANADES; PEIRO; FARRE, 2004).

A incidência do uso da cetamina para fins não medicinais aumentou ainda mais na metade da década de 1970, especialmente devido ao surgimento de festas do tipo *raves* e outras do gênero (JANSEN, 1993; CURRAN; MORGAN, 2000). No entanto, devido à finalidade de seu uso inicial como uma droga anestésica, a cetamina diferenciava-se das substâncias químicas emergentes conhecidas como “*club drugs*” (JOE-LAIDLER; HUNT, 2008) o que fez aumentar

consideravelmente o interesse pelo seu uso no início dos anos 80, devido ao aumento dos índices de intervenção por parte da polícia sobre o comércio das “club drugs” (ECDD, 2006).

A cetamina até então não era considerada uma droga ilegal à semelhança de outras drogas, como a maconha, a cocaína e a heroína, e podia ser encontrada por formas ilícitas, principalmente na forma de um pó cristalino de coloração branca, sob os pseudônimos de “Pó de anjo”, “K”, “Special K”, “Kit Kat”, “Super K”, “Vitamin K”, “Jet”, “Jet K” ou simplesmente “K” (JANSEN; DARRACOT-CANKOVIC, 2001; DILLON; COPELAND; JANSEN, 2003), para administração por via intranasal por aspiração (ECDD, 2006).

Os usuários da droga geralmente descrevem seus efeitos dissociativos como uma sensação de “flutuação extra-corpórea” e designam estas experiências fora do corpo como “trips to K-land” ou “K-holes”. Alucinações visuais e falta de coordenação motora também são comumente relatadas (MOORE et al., 1997), além da toxicidade cardiovascular representada na forma de hipertensão, taquicardia e arritmias que também podem ocorrer (KOHRIS; DURIEUX, 1998), a amnésia ocasionada pela droga pode culminar para indução de depressão respiratória e apnéia (HANSEN et al., 1988).

Até hoje são mantidos os nomes populares atribuídos a droga e seus efeitos, bem como sua forma de apresentação mais comum, o pó de cetamina, que é empregado para usos recreacionais de forma intranasal, sendo obtido através da evaporação da solução original e vendido em pequenos sacos plásticos ou papel (WOLFF; WINSTOCK, 2006); além disso, a solução de cetamina pode ser transferida para um vaporizador para ser inalada, dissolvida em bebidas alcólicas para ser ingerida ou ainda misturada a cigarros e à maconha. A cetamina é insípida, inodora e incolor, passível de ser solúvel em água e lipídios, podendo ser encontrada em diversas formas de apresentação como: líquidos, soluções injetáveis (DALGARNO; SHEWAN, 1996; CRITCHLOW, 2006), cristais, sprays, comprimidos e/ou cápsulas/ampolas para uso oral (WOLFF; WINSTOCK, 2006); e, como, acontece com todas as substâncias vendidas ilegalmente, em meio a estes comprimidos e/ou cápsulas, pode existir, ainda concentrações errôneas e a presença de adulterantes, como pseudoefedrina, efedrina, cafeína, anfetamina, metanfetamina, entre outros; representando um risco adicional para o usuário (ECDD, 2006).

Na Argentina, a cetamina era utilizada em terapias de regressão e em alguns tipos de cultos para exploração da mente em “movimentos espirituais” (*New Age Spiritualism Movement*) (KELLY, 1999). Nos EUA, revistas de histórias em quadrinhos, como “*The Fabulous Furry Freak Brothers*” faziam menção ao uso recreacional da cetamina (CESAR, 2013). Em 1978 foram publicados dois livros (“*Journeys into the bright world*” de Marcia

Moore e Howard Alltounia, e “*The Scientist*” de John C. Lilly) que descreviam experiências pessoais resultantes da utilização experimental de cetamina por um grupo de pesquisadores visando explorar a psique interior e outros estados alterados de consciência. Estes fatos colaboraram para aumentar ainda mais a popularidade de seu uso ilícito (KELLY, 1999).

No final dos anos 80, o *ecstasy* ganhou popularidade; porém, por ser uma droga de elevado custo, passou a ser substituído por alternativas mais baratas, como, por exemplo, a cetamina, que também podia ser utilizada como um adulterante nos comprimidos de *ecstasy* (DALGARNO; SHEWAN, 1996).

O interesse em enquadrar a cetamina na “Legislação das Substâncias Controladas” dos EUA (*Controlled Substance Act* - CSA) começou em 1981, quando a agência de combate ao narcotráfico dos EUA, (*Drug Enforcement Administration* - DEA), anunciou oficialmente a intenção de classificar a cetamina como uma droga de Classe III, em resposta ao aumento no uso dessa substância. No entanto, esse processo foi adiado pela insuficiência de dados referentes ao uso abusivo dessa droga para justificar tal ação (FEDERAL REGISTER, 1999).

Em 1984, o “Departamento de Saúde e Serviços Humanos” (*Department of Health and Human Services*) dos EUA, recomendou novamente que o DEA classificasse a cetamina como uma droga de Classe III da CSA; porém, novamente devido a falta de relatos sobre problemas envolvendo o uso abusivo dessa droga, o DEA adiou essa ação (BLACHFORD; KRAPP, 2010). Somente em 1995 a cetamina foi adicionada a “Lista de Drogas Emergentes” do DEA (KELLY, 1999).

Em 1985 a cetamina foi adicionada à “Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde” como um anestésico intravenoso essencial, utilizado para promover anestesia e analgesia em crianças e adultos (WHO, 2016).

No início dos anos 90 a cetamina começou a aparecer nas boates do Reino Unido, sendo considerada uma droga elitista, utilizada por grupos pequenos e restritos (WINSTOCK; WOLFF; RAMSEY, 2001). A partir disso, nos anos subsequentes, clínicas e hospitais veterinários relataram frequentes roubos de cetamina de seus estoques de medicamentos (LOCKWOOD, 2006) fazendo com que, em 1997, a Associação Americana de Médicos Veterinários (*American Veterinary Medical Association*- AVMA) emitisse um comunicado recomendando que alarmes contra roubos fossem instalados nos armários de estoque de medicamentos (BLACHFORD; KRAPP, 2010).

Evidências indicam que foi também principalmente a partir da década de 1990 que a cetamina começou a ser utilizada no Brasil, associada ao contexto das festas e da música eletrônica (LACERDA; NOTO, 2017).

Em 1998, a cetamina foi descrita pela mídia e pelos legisladores como uma "droga facilitadora de estupro" (*rape drug*) ou “droga facilitadora de agressão sexual” (*drug facilitated sexual assault*), devido aos frequentes relatos da presença dessa substância em casos de violência sexual (ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006).

Sendo assim, em agosto de 1999, o DEA declarou formalmente a intenção de classificar a cetamina como uma substância controlada, enquadrando-a na Classe III da CSA, por decisão emergencial (FEDERAL REGISTER, 1999); neste mesmo ano, foi considerada ilegal perante o governo federal dos EUA, a posse da cetamina na ausência de prescrição médica ou de licença para sua distribuição (FEDERAL REGISTER, 1999; KELLY, 1999).

Também no ano de 2000, um grupo de pesquisadores publicou pela primeira vez um estudo indicando que a cetamina poderia aliviar rapidamente os sintomas da depressão (BERMAN et al., 2000). Neste estudo de curto prazo, realizado com o intuito de avaliar os possíveis efeitos antidepressivos da cetamina, foram recrutados 9 pacientes, porém apenas 7 conseguiram completar o estudo e destes apenas 4 pacientes experimentaram os efeitos benéficos antidepressivos resultantes da administração de uma infusão de cetamina, iniciando-se assim as pesquisas envolvendo o possível uso desta droga para o tratamento da depressão (BERMAN et al., 2000).

Em 2002, a cetamina foi classificada como droga da Classe III em Taiwan, após a sua ascensão na Ásia Oriental (LI et al., 2011). Neste mesmo ano, foi publicado pelo “Centro de Monitoramento Europeu de Drogas e Dependência de Drogas” (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*), o “Relatório sobre a avaliação dos riscos da cetamina no quadro de ação sobre novas drogas sintéticas” (*Report on the risk assessment of ketamine in the framework of the joint action on new synthetic drugs*), relatando o total de 12 mortes relacionadas ao seu uso entre os anos de 1987 e 2000; sendo 7 casos de óbitos registrados nos EUA e 5 na Europa.

Três dessas mortes relacionavam-se ao uso da cetamina “pura”, sem associação com outras drogas (EMCDDA, 2002), envolviam as vias de administração intramuscular e/ou intravenosa, e a causa da morte devido à *overdose*, que pode resultar em depressão respiratória, coma, convulsão, e óbito devido à parada respiratória (DEA, 2011). Os outros casos de óbito relatados envolviam o uso da cetamina associada à outras drogas e indicaram que, as baixas concentrações de cetamina detectadas nessas associações, podem representar que sua interação com as demais drogas pode ser um importante fator contribuinte a ser considerado na ocorrência de mortes. O uso de substâncias com efeitos depressores do SNC, como o etanol, também pode contribuir para aumentar a toxicidade atribuída a cetamina (EMCDDA, 2002).

Também no ano de 2002, o Instituto Nacional de Abuso de Drogas (*National Institute on Drug Abuse* - NIDA), determinou que 90% da cetamina obtida para uso ilícito estava intimamente associada ao desvio de fontes veterinárias (NIDA, 2002).

Em 2005, no Canadá, a cetamina foi classificada como droga da Classe I na lista de narcóticos (CSCB, 2005); neste mesmo ano, Alves et al., estimaram que, de 10 a 15% dos profissionais de saúde ao longo de suas carreiras, faziam uso indevido de drogas e, na especialidade médica, 6 a 8% dos médicos apresentariam transtornos devido ao uso dessas substâncias; em relação ao uso do álcool essa porcentagem subiu para aproximadamente 14%.

Em 2006, no Reino Unido, a cetamina foi proscrita e rotulada como droga da Classe C (WAI-KIN, 2011); neste mesmo ano, o relatório da “Pesquisa Nacional sobre Uso de Drogas e Saúde” (*National Survey on Drug Use and Health*), indicou que nos EUA, estimava-se que 2,3 milhões de pessoas com 12 anos ou mais usariam a cetamina durante a vida, e 203 mil já haviam sido usuários da droga nos anos anteriores (BLACHFORD; KRAPP, 2010).

Em 2006, a Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo decretou no Projeto de Lei nº 214, a proibição e a livre comercialização da cetamina, e dos demais medicamentos que continham a substância em sua formulação no âmbito do Estado de São Paulo, determinando que a venda do medicamento só poderia ser feita em estabelecimentos farmacêuticos, por meio de receita prescrita pelo médico veterinário e/ou médico, e emitida em duas vias, com identificação do emitente, do comprador e do fornecedor, permanecendo uma das vias retidas no estabelecimento (ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006).

Em 2008, foi apresentado pela primeira vez em um simpósio na Austrália, um modelo farmacológico desenvolvido com a cetamina para simular condições de esquizofrenia, visto que a droga é capaz de mimetizar sintomas psiquiátricos compatíveis com essa doença (ELBERT, 2008). Neste mesmo ano, a Universidade de Bath no Reino Unido emitiu um comunicado relatando sobre a importância do uso da cetamina para o tratamento de desordens psíquicas (BLACHFORD; KRAPP, 2010).

Na Europa, a prevalência do uso da cetamina por jovens e adultos permaneceu baixa e estável até 2008 (EMCDDA, 2016); porém, em 2011, Smith e Flatley relataram em pesquisas que, depois da maconha, as drogas ilícitas mais consumidas no Reino Unido eram cocaína, ecstasy, anfetaminas e cetamina.

Em 2013, o “Conselho Consultivo do Reino Unido sobre o Abuso de Drogas” (*United Kingdom Advisory Council on the Misuse of Drugs*- ACMD), recomendou que o governo reclassificasse a cetamina como uma droga da Classe B (ACMD, 2013). Proposta que mais

tarde foi considerada devido à existência de evidências sobre danos crônicos associados ao uso da cetamina, incluindo danos a vesícula urinária e ao trato urinário (DIXON, 2014).

Ainda em 2013, o governo da Índia, em resposta à crescente onda de abusos e consumo desenfreado da cetamina e a sua utilização na prática de crimes como o estupro; decidiu reclassificá-la como droga de Classe X da “Lei de Drogas e Cosméticos” (*Drug and Cosmetics Act*) do país, exigindo uma licença especial para venda e manutenção dos registros de venda por, no mínimo, dois anos após a sua comercialização (DEB ROY, 2013).

Em 2015 a porcentagem da utilização da cetamina na Europa foi estimada em 0,3% na Dinamarca e na Espanha (usuários com idades variando entre 15 à 34 anos); e 1,6% no Reino Unido (usuários com idades variando entre 16 à 24 anos). No total, 11 países europeus reportaram 793 apreensões de cetamina (aproximadamente 264g da droga), e quase metade dessas apreensões ocorreram no Reino Unido (EMCDDA, 2016).

No Brasil, desde 2016, a cetamina mantém sua classificação de número 27 na Lista C1 de “Substâncias Sujeitas a Controle Especial” (Sujeitas a Receita de Controle Especial em duas vias), instaurada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016).

Atualmente esta droga continua sendo amplamente estudada em pesquisas, que visam, principalmente, explorar seu potencial analgésico (MORGAN; CURRAN, 2011), antidepressivo (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006), e como modelo para pesquisa no reestabelecimento de pacientes esquizofrênicos (UMBRICHT et al., 2000; DUNCAN et al., 2001).

Devido a sua capacidade de causar inconsciência, amnésia e analgesia, ao mesmo tempo em que mantém os reflexos respiratórios e garante estabilidade hemodinâmica (SINNER; GRAF, 2008), a cetamina ainda é utilizada licitamente na medicina humana como um anestésico em cirurgias pediátricas, administrada a indivíduos em casos de intervenções cirúrgicas menores ou em cirurgias de pacientes com alto risco de morte (WAI et al., 2013), além disso, o interesse em seu uso na prática clínica vem ressurgindo devido a estudos que apontam que, seu isômero S(+), pode ocasionar menos efeitos adversos do que sua mistura racêmica (EVERS; CROWDER, 2001), quando utilizada em doses sub-anestésicas em associação com outros analgésicos (por exemplo, opioides), é capaz de prevenir e minimizar a dor pós-operatória (GAYNOR, 2009), atenuando possíveis efeitos colaterais decorrentes do uso destes fármacos (BARBIERI et al., 1997), e ao ser administrada antes de um “desafio inflamatório” (por exemplo, no período pré ou transcirúrgico), é capaz de modular o processo inflamatório decorrente, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (VAN DER

LINDEN et al., 1990; YLI-HANKALA et al., 1992; Kawasaki et al., 1999; LANKVELD et al., 2005).

Porém, devido aos efeitos alucinógenos que esta droga pode ocasionar nos seres humanos, o seu principal emprego é para o uso veterinário. Na medicina veterinária, a cetamina é frequentemente empregada na clínica médica, mais especificamente na área de anestesiologia, sendo administrada geralmente através das vias intramuscular e intravenosa, por proporcionarem concentrações plasmáticas e, conseqüentemente terapêuticas, mais adequadas do que as demais vias de administração (SCHIMID; SANDLER; KATZ, 1999). A cetamina pode ser utilizada isoladamente para promoção de analgesia (BIANCHI, 2011), e/ou em associação com outros fármacos para contenção química, indução e manutenção de anestésias de curta duração (SMITH; LARIVE; ROMANELLI, 2002); podendo ser empregada, ainda, como coadjuvante da anestesia geral inalatória, sendo administrada em *bolus* ou por infusão contínua (PADDLEFORD, 2001).

No entanto, na medicina veterinária, assim como na medicina humana, devido à facilidade de aquisição, muitas vezes o uso da cetamina não é restrito à pesquisa ou práticas clínicas/cirúrgicas, sendo frequentemente e ilicitamente utilizada e comercializada por médicos veterinários como uma droga recreacional (ARICAN et al, 2004; GLABE, 2004; WHO, 2006). Casos envolvendo prisões de médicos veterinários devido ao crime de comercialização da cetamina são comumente documentados (FIGUEIREDO, 2006; JC ONLINE, 2015).

A rápida ascensão de seu uso de forma abusiva e recreacional, os efeitos colaterais resultantes de sua utilização e de seu consumo desenfreado, e a escassez de informações detalhadas sobre a prevalência de seu consumo, são fatores que devem ser considerados na tomada de medidas visando restringir ou proibir o uso desta droga para outros fins que não sejam profissionais, por razões de saúde ou requisitos médicos.

2.2.3 Metabolismo da cetamina: absorção, distribuição, biotransformação e excreção

A cetamina quando utilizada na prática clínica e/ou cirúrgica é preferencialmente administrada por via parenteral e/ou intramuscular por atingir uma concentração plasmática terapêutica mais rapidamente (SCHIMID; SANDLER; KATZ, 1999); porém, pela capacidade de apresentar rápida absorção e biodisponibilidade elevada, seu uso como droga de abuso pode ocorrer a partir da administração por vias intranasal, intravenosa, subcutânea, intramuscular e

retal (JANSEN, 2000). Entretanto, quando administrada pelas vias oral e/ou retal, a cetamina sofre um extenso metabolismo de primeira passagem no fígado e no intestino, reduzindo substancialmente a sua biodisponibilidade (KINTZ et al., 2004; ECDD, 2006; SINNER; GRAF, 2008).

Por apresentar alta lipossolubilidade e baixa capacidade de ligação às proteínas plasmáticas (10 a 30%), o que facilita sua rápida transposição da barreira hematoencefálica; após administração a cetamina distribui-se rapidamente pelo organismo (JANSEN, 2000; ROMMANELII; SMITH, 2002; VALADÃO, 2010). Sua meia-vida depende da via de administração, mas geralmente é curta envolvendo de 1 à 3 horas (KOOB, 1992) e seus efeitos são rapidamente evidenciados, com duração aproximada de 30 a 45 minutos (JANSEN, 2000; ROMMANELII; SMITH, 2002; VALADÃO, 2010), exibindo concentrações relativamente altas no tecido adiposo, pulmão, fígado e SNC; e concentrações mais baixas no coração, músculo esquelético e plasma (SILVA et al., 2010).

A cetamina é metabolizada pela ação das enzimas hepáticas microsossomais CYP3A4, CYP2B6 e CYP2C9, pertencentes ao citocromo P450 (HIJAZI; BOULIEU, 2002). Sendo convertida, através de reações de N-desmetilação, ao metabólito norcetamina, que subsequentemente é biotransformado a 4-, 5- e 6-hidroxinorcetamina (4OH-cetamina, 5OH-cetamina e 6OH-cetamina, respectivamente) pela ação das enzimas CYP2B6 e CYP2C9. A norcetamina é o principal metabólito farmacologicamente ativo da cetamina, apresentando de um terço a um quinto da potência da droga original, sendo capaz de produzir efeitos analgésicos e anestésicos prolongados (VALADÃO, 2011; MORGAN; CURRAN, 2011).

Todos os metabólitos resultantes da cetamina são hidroxilados a hidroxinorcetina e em seguida conjugados ao ácido glicurônico formando derivados glicuronídeos hidrossolúveis que são excretados na urina (90%), nas fezes e na bile (HIJAZI; BOULIEU, 2002).

2.2.4 Efeitos da cetamina sobre o SNC

2.2.4.1 Neurofarmacologia da cetamina

A neurofarmacologia da cetamina é complexa, pois a mesma é capaz de interagir com vários tipos de receptores localizados no SNC (GARCIA, 2007; DeKOCK; LOIX;

LAVAND'HOMME, 2013), incluindo os receptores de GLU do tipo NMDA e não-NMDA; receptores opióides, colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) (KOHRs; DURIEUX, 1998), gabaérgicos (GARCIA, 2007), além de atuar sobre canais iônicos (Na^+ e K^+) (HAYASHI et al., 2011), e inibir a recaptação neuronal de catecolaminas, acetilcolina e 5HT (KOHRs; DURIEUX, 1998; GARCIA, 2007).

Estas múltiplas possibilidades de interações são responsáveis por seus vários efeitos clínicos, tais como anestesia, analgesia (GAYNOR, 2009), indução de efeitos antidepressivos e/ou de sintomas psiquiátricos compatíveis com esquizofrenia (De KOCK, LAVAND'HOMME, WATERLOOS, 2001; ZARATE et al., 2006).

2.2.4.2 Atuação sobre receptores do tipo NMDA

O principal mecanismo de ação de ambos os isômeros da cetamina baseia-se no antagonismo não competitivo com o GLU, visto que a droga não compete pelo mesmo sítio de ligação deste neurotransmissor, mas liga-se a um sítio distinto – sítio de ligação da PCP (BRESSAN; PILOWSKY, 2003) –; e principalmente pós-sináptico dos receptores ionotrópicos do tipo NMDA (POZZI et al., 2006; ZHUO, 2009).

Os receptores ionotrópicos do tipo NMDA são ligados a canais iônicos permeáveis aos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (MUIR, 2009) e, em condições de repouso, permanecem bloqueados pelo íon magnésio (Mg^{2+}) (TRANQUILLI; LAMONT; GRIMM, 2004). O zinco (Zn^{2+}), liberado juntamente com o GLU a partir das vesículas de neurotransmissores localizadas nas terminações pré-sinápticas, atua como um modulador negativo da ativação do receptor NMDA, regulando-o (MUIR, 2009).

O neurotransmissor GLU é o principal neurotransmissor aminoácido excitatório do SNC dos mamíferos sendo encontrado em aproximadamente 80% dos neurônios (BANNERMAN et al., 1995). O GLU é sintetizado a partir da glutamina presente nas células da glia que é transportada por transportadores específicos para o terminal pré-sináptico do neurônio onde é convertida, pela ação da enzima mitocondrial glutaminase, à GLU. Após sintetizado, o GLU permanece armazenado no interior de vesículas no neurônio pré-sináptico até que, de maneira cálcio-dependente, ocorra a sua liberação para a fenda sináptica (BANERJEE et al., 2016). A ligação simultânea do GLU e seu co-agonista glicina aos canais iônicos dos receptores NMDA promove a ativação dos mesmos e o influxo de Ca^{2+} no neurônio, mediando a ocorrência de um

potencial de ação excitatório caracterizado por uma transmissão excitatória lenta e duradoura (potenciação a longo prazo), que desempenha importante função na regulação da plasticidade sináptica necessária para o desenvolvimento do aprendizado e da memória (DANYSZ; PARSONS, 2003; COSMAN; BOYLE; PORSTEINSSON, 2007).

O GLU pode atuar também sobre seus sítios de ligação específicos localizados nos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol-propiónico) e cainato, e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) presentes nos terminais pós-sinápticos. O GLU presente na fenda sináptica é recaptado por transportadores específicos podendo retornar ao neurônio pré-sináptico ou se deslocar para o interior das células da glia, onde é convertido à glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase, caracterizando o ciclo glutamato-glutamina (Figura 8).

Ao contrário dos receptores ionotrópicos do tipo NMDA pós-sinápticos que são encontrados na maioria das sinapses excitatórias no SNC, os receptores pré-sinápticos do tipo NMDA são expressos apenas em algumas regiões cerebrais específicas e parecem estar ligados a funções de modulação na liberação de neurotransmissores e plasticidade neuronal (BANERJEE et al., 2016).

Figura 8 - As sinapses no sistema glutamatérgico e o ciclo glutamato-glutamina. O glutamato é originário da glutamina que, por ação da enzima glutaminase, é convertida a glutamato. Após ser liberado na fenda sináptica o glutamato pode atuar sobre seus sítios de ligação localizados nos receptores do tipo mGluR, cainato, AMPA e/ou NMDA. Posteriormente, na célula da glia, o glutamato é convertido novamente a glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase, caracterizando o ciclo glutamato-glutamina. NMDA = receptor do tipo N-Metil D-Aspartato; AMPA = receptor do tipo α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol-propiónico; mGluR = receptor metabotrópico. Modificado de Banerjee et al., 2016.

Por assemelhar-se estruturalmente à molécula da PCP, a cetamina apresenta alta afinidade e é capaz de ligar-se aos seus sítios específicos localizados nos receptores do tipo NMDA de forma antagônica, inibindo a ligação do GLU e o influxo de Ca^{2+} no neurônio, impedindo assim, o desenvolvimento de um potencial de ação e a ocorrência da neurotransmissão excitatória (DANYSZ; PARSONS, 2003; COSMAN; BOYLE; PORSTEINSSON, 2007) (Figura 9).

Figura 9 - Ilustração exibindo o receptor do tipo NMDA, seus canais iônicos (influxo e efluxo de íons) e sítios de ligação moleculares. NMDA = N-Metil D-Aspartato, PCP = fenciclidina, Na^+ = sódio, K^+ = potássio, Ca^{2+} = cálcio, Mg^{2+} = magnésio, Zn^{2+} = zinco. Modificado de Anaesthesiauk, 2018.

2.2.4.3 Receptores do tipo não-NMDA e metabotrópicos

É sabido que a cetamina tem potencial para atuar como uma droga antagonista também sobre os receptores ionotrópicos para GLU do tipo não-NMDA, sendo eles o AMPA e o cainato (GONZALES et al., 1995; MARIN et al., 1993) (Figura 8).

Diferentemente dos receptores do tipo NMDA, a despolarização dos receptores AMPA e cainato ocorre rapidamente após a ligação do GLU, ativando as vias de sinalização ligadas ao sistema glutamato/óxido nítrico/monofosfato cíclico de guanosina (GLU/NO/GMPc). Neste sistema, ocorre a produção de NO, que atua como um segundo mensageiro intracelular aumentando a concentração de GMPc e ativando proteinocinases responsáveis pela fosforilação e ativação de canais iônicos (GONZALES et al., 1995; MARIN et al., 1993).

A inibição destes receptores pela cetamina, impede o influxo de Ca^{2+} no neurônio e a produção da óxido nítrico sintase (iNOS), enzima necessária à formação de NO (GONZALES et al., 1995), exercendo um papel neuroprotetor que, possivelmente, pode estar envolvido com os efeitos analgésicos que são atribuídos a droga, já que a biossíntese de NO pode estar relacionada com o processamento nociceptivo no SNC (GORDH; KARLSTEN; KRISTENSEN, 1995).

Os receptores metabotrópicos para GLU (mGluR) são divididos em 3 grupos compostos por 8 subtipos e são ligados à mecanismos intracelulares de transdução de sinal via proteína G (MASU et al., 1991). O grupo I (mGluR 1 e 5) compreende os receptores localizados nos terminais pós-sinápticos (TESTA et al., 1998; LOVINGER; McCOOL, 1995), acoplados a proteína G excitatória (Gq), que determinam subsequente ativação da fosfolipase C e liberação de Ca^{2+} intracelular, aumentando a excitabilidade neuronal; o grupo II (mGluR 2 e 3) e o grupo III (mGluR 4, 6, 7 e 8) localizam-se nos terminais pré-sinápticos (TESTA et al., 1998; LOVINGER; McCOOL, 1995) e são acoplados a proteína G inibitória (Gi), que inibem a enzima adenilato ciclase e a formação da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), inibem a ativação dos canais de potássio acoplados à proteína G (KNOFLACH; KEMP, 1998; WATANABE; NAKANISHI, 2003) e também a ativação dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, modulando a liberação de neurotransmissores (CONN; PIN, 1997) (Figura 8).

2.2.4.4 Efeitos analgésicos a anestésicos

Mesmo quando utilizada em subdoses ou concentrações subanestésicas (SLINGSBY; WATERMAN-PEARSON, 2000), a cetamina é capaz de apresentar propriedades analgésicas por meio da modulação dos reflexos nociceptivos mediados por sinapses excitatórias, pelo bloqueio dos receptores do tipo NMDA localizados no córtex (ANIS et al., 1983), tronco cerebral e medula espinhal (VALADÃO, 2010).

Os receptores opioides do subtipo δ (sigma) e μ (mi) podem inibir ou potencializar eventos mediados pelos receptores do tipo NMDA, enquanto que o receptor do subtipo κ (kappa) antagoniza a atividade mediada por estes receptores (RIEDEL; NEECK, 2001). A cetamina possui elevada afinidade estereoespecífica pelos receptores do subtipo κ e seus efeitos psicomiméticos podem ser explicados pela sua interação com os mesmos, considerando que fármacos κ agonistas desencadeiam efeitos alucinógenos similares aos relatados por usuários da cetamina (HUSTVEIT; MAURSET; OYE, 1995; RAEDER; STENSETH, 2000). A cetamina também é capaz de prevenir a hiperalgesia induzida por opioides atuando como uma agonista fraca dos receptores do subtipo μ , inibindo a transmissão excitatória dos receptores do tipo NMDA (SMITH et al., 1980; OYE; PAULSEN; MAURSET, 1992).

Estas propriedades fazem com que a cetamina seja empregada preferencialmente no tratamento de pacientes portadores de dor crônica (NOPPERS, et al., 2010) ou utilizada como um analgésico preemptivo, reduzindo a quantidade de medicação analgésica requerida no período pós-cirúrgico. (LUFT; MENDES, 2005).

2.2.4.5 Esquizofrenia, efeitos alucinógenos e dopamina

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico que acomete aproximadamente 1% da população ao longo da vida (BRESSAN; PILOWSKY, 2003) e pode ser caracterizada por sintomas que podem ser definidos como: positivos, similares a um estado dissociativo caracterizados por alterações na percepção, delírios e alucinações; ou negativos, como embotamento afetivo, retraimento emocional, pensamento estereotipado e prejuízo na fluência verbal. Modelos animais elaborados para o estudo dessa doença indicam que um dos principais fatores determinantes para sua ocorrência está relacionado à hiper ou hipoatividade do sistema

dopaminérgico, responsável por desencadear sintomas positivos ou negativos, respectivamente (KAHN; DAVIS, 1995; KNABLE; WEINBERGER, 1997; KAPUR; SEEMAN, 2001; PIETRASZEK, 2003).

Baseando-se na hipótese da hipofunção glutamatérgica descrita por Olney em 1988, que estabelece uma relação entre o bloqueio da função dos receptores do tipo NMDA pela PCP e os sintomas psicóticos da esquizofrenia; pesquisadores estabeleceram que as ações psicomiméticas desencadeados por alguns antagonistas dos receptores do tipo NMDA podem ser ocasionadas justamente devido ao mecanismo de bloqueio destes receptores (ADLER et al., 1999). Considerando-se isso, a cetamina vem sendo utilizada como um agente indutor de efeitos psicomiméticos e comportamentais mimetizadores da esquizofrenia visando o estudo dessa doença em modelos animais (MIYAMOTO et al., 2001; BECKER et al., 2003).

É importante ressaltar que o antagonismo dos receptores do tipo NMDA pode influenciar também a neurotransmissão dopaminérgica inibindo a recaptação da DA na fenda sináptica (VALADÃO, 2010; 2011) e aumentando a liberação deste neurotransmissor no SNC de roedores (RAO et al., 1989; ADAMS; MOGHADDAM, 1998); estando este mecanismo diretamente relacionado à via de reforço e recompensa no SNC, já que este neurotransmissor possui um papel reforçador no uso de drogas de abuso (KOOB, 1992; SMITH et al., 1998). Por atuar sobre este sistema, a cetamina é capaz de originar um estado caracterizado por dependência psicológica, ao invés de dependência física, já que seu uso frequente e crescente é cumulativo, sendo capaz de ocasionar prejuízos cognitivos progressivamente, não acompanhados de estados físicos de abstinência relevantes após a interrupção de seu abuso crônico (KALSI; WOOD; DARGAN, 2011; DEA, 2017).

2.2.4.6 Efeitos sobre os receptores colinérgicos

A cetamina possui atividade anticolinérgica atuando como antagonista dos receptores colinérgicos nicotínicos e mais proeminentemente dos muscarínicos, inibindo a transmissão colinérgica do SNC (DUVAL NETO, 2004; DURIEUX, 1995), o que pode contribuir para desencadear seus efeitos centrais psicomiméticos relacionados à perda de memória e consciência, e periféricos caracterizados pela exacerbação da estimulação simpática, promovendo midríase, broncodilatação, aumento da frequência cardíaca, entre outros efeitos simpatomiméticos (DURIEUX, 1995).

2.2.4.7 Efeitos sobre as monoaminas

A cetamina pode influenciar a neurotransmissão monoaminérgica bloqueando a recaptação neuronal e potencializando os efeitos das monoaminas: DA, NOR e 5HT, fator que também pode contribuir para a manifestação de suas propriedades analgésicas secundárias não relacionadas ao receptor do tipo NMDA (MELLER, 1996; QUIBELL, 2011).

A manifestação de dor crônica envolve a sensibilização periférica e central, bem como as vias modulatórias da dor. A modulação descendente da dor (que parte do SNC ao sistema nervoso periférico) inclui as vias opioides endógenas e as monoaminérgicas, que são consideradas alvos em tratamentos farmacológicos visando reduzir a dor crônica (KAWAMATA et al., 2000).

O sistema antinociceptivo descendente origina-se a partir da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do núcleo dorsal da rafe, sendo retransmitido através da medula oblongata ventromedial rostral. Os neurônios que o compõem projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal e liberam as monoaminas NOR e 5HT, que se conectam com ação inibitória sobre os neurônios nociceptores, caracterizando o sistema inibitório descendente monoaminérgico, resultando na inibição da transmissão nociceptiva no interior da medula espinhal (FIELDS; BASBAUM, 1994). A cetamina é capaz de intensificar o sistema inibitório descendente monoaminérgico inibindo a recaptação neuronal de NOR e 5HT, aumentando a concentração destes neurotransmissores no líquido cefalorraquidiano lombar (TYCE; YAKSH, 1981; HAMMOND; TYCE; YAKSH, 1985) e produzindo efeitos nociceptivos (PEKOE; SMITH, 1982; LODGE; JOHNSON, 1990).

Efeitos simpatomiméticos cardiovasculares, como elevação da pressão arterial e do ritmo cardíaco, estão relacionados ao aumento na concentração plasmática de catecolaminas (adrenalina e NOR) e podem ocorrer secundariamente à administração de cetamina (DOWDY; KAYA, 1968; CARRUBA et al., 1987).

Estudos sugerem que a cetamina promove aumento na liberação de acetilcolina na região do córtex frontal e hipocampo de ratos tratados com a droga (SATO et al., 1996; KIKUCHI et al., 1997) e estes efeitos podem estar relacionados ao seu antagonismo sobre os receptores do tipo NMDA, visto que outras drogas sabidamente antagonistas destes receptores,

como a maleato de dizolcipina (MK-801), promovem efeitos similares, aumentando a liberação de acetilcolina no SNC (HASEGAWA et al., 1993).

2.2.4.8 Efeitos sobre os receptores gabaérgicos

À semelhança do etanol, além do antagonismo aos receptores do tipo NMDA, a cetamina pode também potencializar os efeitos inibitórios do neurotransmissor GABA por meio de sua ação agonista fraca sobre os receptores GABA_A (ANIS et al., 1983; IRIFUNE et al., 2000), promovendo a hiperpolarização da membrana neuronal e desenvolvimento de um potencial pós-sináptico inibitório no SNC.

2.2.4.9 Efeitos antidepressivos da cetamina

O interesse sobre o uso da cetamina no tratamento da depressão embasa-se em estudos clínicos que sugeriram que sua administração é capaz de atenuar a manifestação dos sintomas da doença em pacientes que sofrem de depressão maior (ZARATE et al., 2006; BERMAN et al., 2000), e que ainda seus efeitos terapêuticos podem ser desencadeados por vias diferentes daquelas utilizadas pelos fármacos convencionais (inibição da recaptação de NOR e 5HT); além de serem rapidamente evidenciados (período de horas ou dias), enquanto que, os fármacos antidepressivos mais comumente utilizados para o tratamento desta doença, podem demorar a exibir seus efeitos terapêuticos, geralmente após semanas ou meses de uso (PITTENGER; SANACORA; KRYSTAL, 2007; GARCIA et al., 2008).

Níveis elevados de GLU, comuns em pacientes que possuem depressão (ALTAMURA et al., 1993; MITANI et al., 2006; HASHIMOTO; SAWA; IYO, 2007), podem promover ativação exacerbada dos receptores do tipo NMDA, estimulando grande influxo de Ca⁺² no neurônio. Essa sobrecarga de Ca⁺² pode interferir no transporte de elétrons da fosforilação oxidativa, resultando em uma produção elevada de ROS, culminando para o desenvolvimento de estresse oxidativo e dano neuronal subsequente, incluindo apoptose, caracterizando um quadro de excitotoxicidade (STORK; RENSHAW, 2005; LEONARD; MAES, 2012). Essa condição também pode promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF-

α) e consequente neuroinflamação (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; MOSSNER et al., 2007; YANNING, et al., 2017).

A cetamina, por antagonizar as ações do GLU, pode impedir o desenvolvimento de excitotoxicidade (DANYSZ; PARSONS, 2003; COSMAN; BOYLE; PORSTEINSSON, 2007) e ainda exercer efeitos anti-inflamatórios na presença de inflamação, modulando os níveis de citocinas pró-inflamatórias presentes no SNC (PITTENGER; SANACORA; KRYSTAL, 2007; GARCIA et al., 2008; YANNING, et al., 2017).

Outra hipótese sugerida em relação ao papel da cetamina na mediação de efeitos antidepressivos consiste em sua ação antagonista sobre os receptores pré-sinápticos do tipo NMDA. Diferentemente dos receptores pós-sinápticos do tipo NMDA que apresentam-se amplamente distribuídos no SNC, os receptores pré-sinápticos são expressos somente em algumas regiões específicas, como por exemplo, localizados em interneurônios gabaérgicos, atuando de forma a aumentar a liberação neuronal do GABA no SNC. Estes receptores pré-sinápticos podem também ser inibidos pela cetamina, resultando na diminuição da liberação de GABA, sendo este outro mecanismo pelo qual atribui-se à droga a capacidade de exercer seu efeito antidepressivo (BOUVIER et al, 2015; IADAROLA et al, 2015).

No entanto, um paradoxo existente em relação ao emprego desta droga para o tratamento de pacientes com depressão, consiste no mecanismo compensatório que é instalado após extenso uso da cetamina. Como consequência do bloqueio continuado ou prolongado dos receptores do tipo NMDA, ocorre uma regulação compensatória que promove aumento na expressão destes tipos de receptores. Dessa forma, após a retirada da cetamina, a população de receptores aumentada exacerba sua resposta ao GLU presente no meio extracelular, podendo culminar para excitotoxicidade no SNC (LIU et al., 2013).

2.2.5 Toxicidade da cetamina

Considerando que a cetamina possui uma ampla margem de segurança para ser utilizada em práticas clínicas e cirúrgicas (KELLY, 1999; PADDLEFORD, 2001), seus efeitos tóxicos geralmente decorrem de seu uso ilícito crônico ou intermitente associado a outras drogas lícitas e/ou ilícitas depressoras do SNC (WOOD; NICOLAOU; DARGAN, 2009) podendo culminar para um estado de *overdose* (GILL; STAJIC, 2000) seguida de morte decorrente da depressão cardiorrespiratória severa (DEA, 2011).

É sabido que o uso crônico de cetamina pode resultar, principalmente, em sequelas ao trato urinário inferior sendo seu órgão-alvo a bexiga, ocasionando inflamação e irritação do epitélio vesical, culminando para a ocorrência de cistite ulcerativa e hemorrágica, com sintomatologia associada à dor ao urinar, disúria e hematúria, sintomas estes relatados por usuários da droga de forma recreacional (SHAHANI et al., 2007; MUETZELFELDT et al., 2008; COTTRELL; GILLATT, 2008).

Devido ao seu extenso metabolismo hepático de primeira passagem, o uso prolongado de cetamina pode ser também hepatotóxico, ocasionando alterações no parênquima hepático e no trato biliar, resultando em lesões hepáticas que podem progredir para colestase e/ou colangite esclerosante (LEE et al., 2009; LO et al., 2011).

3 OBJETIVOS

Estudar em ratos adultos os possíveis efeitos tóxicos, imunotóxicos, o potencial efeito oxidativo, e o nível de neurotransmissores e seus metabólitos presentes no SNC, provenientes da administração intraperitoneal de cetamina (K), concomitante ou não à administração de etanol (E) por até 28 dias.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Primeira fase experimental

➤ Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3, 7, 14, 21 e 28 dias:

- ✓ Avaliação de toxicidade sistêmica:
 - Parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos, urinários e histopatológicos.
- ✓ Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade:
 - Avaliação de órgãos linfoides: pesos relativos e celularidades.
- ✓ Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo:
 - Glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG);
 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*- TBARS);
 - Enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

3.1.2 Segunda fase experimental

➤ Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade, estresse oxidativo e estudo neuroquímico proveniente do tratamento ou não (Co) dos animais com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias:

✓ Avaliação de toxicidade sistêmica:

- Parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos, urinários e histopatológicos.

✓ Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade:

- Avaliação de órgãos linfoides: pesos relativos, celularidades e morfometria;
- Avaliação da resposta imune celular determinada pela reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/*Delayed-Type Hypersensitivity* - DTH);
- Avaliação da resposta imune humoral (adquirida) determinada pela mensuração dos níveis séricos de anticorpos T-dependentes específicos através do título de imunoglobulinas do subtipo M (IgM) e G (IgG).

✓ Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo:

- Glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG);
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*- TBARS);
- Enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).

✓ Estudo neuroquímico:

- Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos: dopamina (DA), serotonina (5HT), noradrenalina (NOR), ácido gama amino-butírico (GABA) e glutamato (GLU).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com aproximadamente 60 dias de idade provenientes do biotério do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ - USP). Os ratos permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 40x50x20 cm e forradas com flocos de pinus esterilizado. Dois ratos foram alocados em cada gaiola contendo uma grade divisória que permitia aos animais contato visual e algum contato físico, sem interferir com a alimentação individual e o consumo de água ou etanol a 10%, reduzindo assim o estresse resultante do isolamento. As caixas foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura (22°C a 25°C) e umidade (50% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos receberam ração Nuvilab e água filtrada *ad libitum*, exceto os grupos que receberam etanol a 10% na água de bebida. Ainda, os mesmos foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo três dias antes do início de cada experimento, quando foram pesados para o controle do ganho de peso e ajuste da dose à ser administrada. Os ratos foram observados diariamente durante todo o período experimental quanto à presença de fezes amolecidas, sobra de alimentos, alterações físicas e comportamentais (por exemplo, piloereção, letargia, morbidade) e/ou mortalidade. Diariamente foram adicionados dispositivos artificiais nas gaiolas (rolos de papelão autoclavados) para promover o enriquecimento ambiental dos animais. Os animais foram utilizados de acordo com as normas de bioética desta Faculdade sob número: 8108060616, fornecido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

4.2 REAGENTES

Heparina sódica (Hemofol[®] - Cristália), formol 10% (Merck), álcool etílico absoluto 99,5% (Synth), meio de cultura RPMI-1640 (Gibco), *trypan blue* (Gibco), soro fetal bovino (Gibco), cloreto de sódio (Synth), kits da Interteck Katal para albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina (FA), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT), glicose, colesterol, triglicérides, *High-density lipoproteins* (HDL), uréia e creatinina; kits da Davol para hemograma completo: contagem de eritrócitos [*red blood cells* (RBC)], leucócitos [*white blood cells* (WBC)], hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), plaquetas (PLT), volume corpuscular médio [*mean corpuscular volume* (MCV)], hemoglobina corpuscular média [*mean corpuscular hemoglobina* (MCH)], concentração de hemoglobina corpuscular média [*mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)], kits da Labtest (Uriquest[®]) para urinálise [pH, densidade e pesquisa de elementos químicos (bilirrubina, urobilinogênio, cetonas, ácido ascórbico, glicose, proteínas, sangue, nitrito e leucócitos)], *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) (Calbiochem), adjuvante de Freund completo e incompleto (Sigma[®]); kits de anticorpos policlonais (*goat anti-IgM* e *anti-IgG* conjugados com *horseradish peroxidase* - HRP) (Bethyl Laboratories); cetamina (Dopalen[®] - Ceva); xilazina (Anasedan[®] - Ceva). Na avaliação dos parâmetros oxidativos utilizou-se cloreto de potássio, fosfato de potássio (Química Moderna[®]), ácido metafosfórico e ácido sulfosalicílico (Merck[®]), trietanolamina (Basile Química[®]), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), 2-vinilpiridina, ácido tiobarbitúrico, xantina, ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), citocromo C, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e cianeto de potássio (Sigma[®]), peróxido de ter-butila, carbonato de sódio, sulfato de cobre (Merck[®]) e tartarato de sódio (Synth). Para as análises neuroquímicas foram utilizados ácido perclórico (Merck[®]), metabissulfato de sódio (Synth), metanol e acetonitrila (Tedia), ácido ortofosfórico (Merck[®]), ácido clorídrico (Carlo Erba Reagents[®]), fosfato de potássio (Química Moderna[®]), ácido 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA - padrão interno para a avaliação dos neurotransmissores), cloridrato de dopamina (DA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC - metabólito da DA), cloridrato de serotonina (5HT), ácido 5- hidroxindolacético (5HIAA - metabólito da 5HT), noradrenalina (NOR), ácido vanilmandélico (VMA - metabólito da NOR), ácido gama amino-butírico (GABA) e glutamato (GLU) todos da Sigma[®].

4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

4.3.1 Primeira fase experimental

4.3.1.1 Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo

Foram empregados 32 ratos divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), sendo um grupo controle (Co) e 3 grupos experimentais [cetamina = *ketamine* (K)]; etanol (E) e cetamina+etanol (KE).

Os animais pertencentes ao grupo K receberam uma administração diária intra-peritoneal (I.P) de cetamina diluída em solução salina 0,9% estéril; na concentração de 15 mg/kg de peso do animal (15mg/kg/PV) e uma administração diária via gavagem de água destilada filtrada/kg de peso.

Os animais pertencentes ao grupo E receberam uma administração diária I.P de solução salina 0,9% estéril/kg de peso; e uma administração diária de 1mL de etanol 10% (preparado com água destilada filtrada) via gavagem.

Os animais pertencentes ao grupo KE receberam uma administração diária IP de cetamina diluída em solução salina 0,9% estéril; na concentração de 15 mg/kg de peso do animal, e uma administração diária de 1mL de etanol 10% via gavagem.

Os animais pertencentes ao grupo Co receberam uma administração diária IP de solução salina 0,9% estéril/kg de peso; e uma administração diária via gavagem de água destilada filtrada/kg de peso; para serem submetidos a estímulos semelhantes aos daqueles animais pertencentes aos grupos experimentais.

Os animais foram tratados diariamente no período da manhã (09 às 11h), por 3, 7, 14, 21 ou 28 dias consecutivos (estudos para avaliação de toxicidade oral de doses repetidas em roedores).

4.3.2 Segunda fase experimental

4.3.2.1 Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade, estresse oxidativo e estudo neuroquímico

Foram empregados 40 ratos divididos em 4 grupos iguais (n=10 animais/grupo), sendo um grupo controle (Co) e 3 grupos experimentais [cetamina = *ketamine* (K)]; etanol (E) e cetamina+etanol (KE).

Os animais pertencentes ao grupo K receberam uma administração diária intra-peritoneal (I.P) de cetamina diluída em solução salina 0,9% estéril, na concentração de 30 mg/kg de peso do animal (30mg/kg/PV); e 10g de açúcar diluído na água de bebida.

Os animais pertencentes ao grupo E receberam etanol *ad libitum* à uma concentração de 10% diluído na água de bebida adicionado a 10g de açúcar; e uma administração diária I.P de solução salina 0,9% estéril/kg de peso.

Os animais pertencentes ao grupo KE receberam uma administração diária IP de cetamina diluída em solução salina 0,9% estéril; na concentração de 30 mg/kg de peso do animal, e etanol *ad libitum* à uma concentração de 10% diluído na água de bebida adicionado a 10g de açúcar.

Os animais pertencentes ao grupo Co receberam uma administração diária IP de solução salina 0,9% estéril/kg de peso e 10g de açúcar diluído na água de bebida para serem submetidos a estímulos semelhantes aos daqueles animais pertencentes aos grupos experimentais.

Os animais foram tratados diariamente no período da manhã (09 às 11h), por 28 dias consecutivos (estudos para avaliação de toxicidade oral de doses repetidas em roedores).

4.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

4.4.1 Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos

Durante todo o período experimental, o consumo de água e ração, o peso e os parâmetros clínicos dos animais foram avaliados diariamente para determinação do ganho de peso em gramas (g) e ajuste da dose a ser administrada por via I.P e/ou gavagem, bem como para determinação do consumo total de água (mL) e ração (g), além de possíveis alterações comportamentais e/ou sinais clínicos.

4.4.2 Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia

Os animais, após anestesia, foram submetidos à cirurgia para coleta de sangue que foi realizada por meio de punção da veia cava caudal em dois tubos com e sem heparina para avaliação hematológica e análise da bioquímica sérica, respectivamente. Os parâmetros hematológicos (hemograma completo) foram avaliados com o uso de sistema automatizado pocH-100iV Diff (Sysmex®) e por meio do diferencial de células brancas (extensão sanguínea).

O soro coletado foi depositado em tubos, para avaliação de parâmetros bioquímicos. As análises séricas das enzimas hepáticas [alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT)], função renal (uréia e creatinina), albumina, proteínas totais, colesterol, triglicérides e HDL foram realizadas por meio de “kit” comercial da Interteck Katal em equipamento automático modelo ChemWell-T. A metodologia empregada para determinação dos níveis destas enzimas acima citadas estava de acordo com as especificações recomendadas pelos respectivos fabricantes.

Ainda, a bexiga, após visualizada, foi puncionada para coleta de aproximadamente 1mL de urina a qual foi depositada em tubos para a realização da urinálise utilizando-se tiras reagentes da Labtest (Uriquest®). A tira reagente utilizada para a determinação do pH, densidade e pesquisa de elementos químicos (bilirrubina, urobilinogênio, cetonas, ácido

ascórbico, glicose, proteínas, sangue, nitrito e leucócitos) no exame de urina, é constituída por um suporte plástico contendo áreas impregnadas com reagentes químicos. Uma reação de cor se desenvolve quando as áreas contendo os reagentes químicos secos entram em contato com a urina, permitindo a determinação de diversos parâmetros.

Para a histopatologia foram coletados fragmentos teciduais dos seguintes órgãos: coração, timo, fígado, baço, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, rins e adrenais, os quais foram fixados em formol 10% tamponado, e processados seguindo as técnicas de rotina, cortados a 5 micra e corados por hematoxilina e eosina (HE).

4.5. AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA

4.5.1 Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo, celularidades e morfometria

Os órgãos linfoides (timo e baço) e a medula óssea do fêmur esquerdo foram coletados para determinação de seus pesos relativos (timo e baço) e suas celularidades (baço e medula óssea). Após análise do peso relativo do timo e do baço, o timo foi fixado em formol para avaliação histopatológica e morfométrica, enquanto que um fragmento com peso conhecido do baço foi divulsionado, lavado em meio de cultura RPMI-1640 e ressuspenso em 5mL de meio para realização da contagem de esplenócitos (número de esplenócitos/g de baço); o segundo fragmento remanescente deste órgão foi também fixado em formol para histopatologia e morfometria, conforme será descrito adiante. A medula óssea foi coletada por meio da lavagem do fêmur esquerdo com uma seringa contendo 10 mL do meio de cultura RPMI-1640 (4°C) após o corte de suas epífises. Esta suspensão celular foi homogeneizada, centrifugada, e ressuspensa com 5mL de RPMI (4°C) para contagem de sua celularidade. A viabilidade celular das suspensões de células foi realizada com o uso de azul de trypan (0,1%), aceitando-se no mínimo 95% de viabilidade, e o número de células foi determinado através de contagem em Câmara de Neubauer.

A avaliação morfométrica do timo e do baço também foi realizada posteriormente utilizando-se o software Image-J, Version 1.51k (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), a razão entre as áreas da região cortical e medular (C/M) do timo e das polpas vermelha e branca (PV/PB) do baço foram determinadas e calculadas respectivamente pelas fórmulas

$C/M = \text{área total do córtex}/[(\text{área total})-(\text{área total da medula})]$ para o timo e $PV/PB = \text{área total da polpa vermelha}/[(\text{área total})-(\text{área total da polpa branca})]$ para o baço.

4.5.2 Avaliação da resposta imune celular e humoral (adquirida)

4.5.2.1 Reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/*Delayed-Type Hypersensitivity* - DTH)

Para a sensibilização dos ratos, os animais receberam por duas vezes, com intervalo de uma semana (no 14º e no 21º dia do período de experimental), uma injeção com 0,2 mL de KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*) (1,0 mg/mL em PBS), por via subcutânea na base da cauda.

Uma semana após a 2ª sensibilização (28º dia do período experimental), foi realizado o desafio imune com o *heat-aggregated-KHL* (*ha-KLH*), o qual foi obtido aquecendo-se o KLH (10 mg/mL em salina) por 1 hora em banho-maria a 75°C. Esta solução foi injetada por via intradérmica (I.D) (0,1 mL/rato) no coxim plantar da pata esquerda dos animais. Na pata contralateral (direita) foi injetado o mesmo volume de solução salina estéril.

Após 24 horas do desafio com o *ha-KLH*, o edema resultante foi medido com auxílio de paquímetro. Os resultados do DTH foram expressos a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata que recebeu o *ha-KLH* com o valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata que não recebeu o inóculo.

4.5.2.2 Mensuração dos níveis séricos de anticorpos T-dependentes específicos através do título de imunoglobulinas do subtipo M (IgM) e G (IgG)

Após a eutanásia dos animais sensibilizados com o KLH, o soro dos mesmos foi coletado para determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-KLH do isotipo M (IgM) e do isotipo G (IgG) por meio de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Brevemente, placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 µL/poço de uma solução

contendo KLH a 5 µg/mL de PBS e permaneceram incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução de Tween-20 (0,05% em PBS), em seguida, foram bloqueadas, por 2 horas, com 300 µL/poço com uma solução de soro albumina sérica (BSA) a 2%. A lavagem das placas foi repetida e então foi adicionado 50 µL/poço de soro dos animais sensibilizados com o KLH diluído em PBS em concentrações adequadas, incubando-se por 2 horas. Em seguida, a placa foi novamente lavada com Tween-20 e foi adicionado 50 µL/poço de anti-rat-IgM/IgG marcado com HRP (0,2 µg/mL), incubando-se por 1 hora. Após nova lavagem das placas (400 µL/poço), foi adicionado 100 µL/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e após 10 minutos, a reação foi parada com a adição 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1N e posterior leitura à 490nm (HIRABAYASHI et al., 1992; SARKER; GOHDA, 2013).

4.6. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi avaliado através de ensaios para avaliação das atividades das glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx); e do conteúdo de proteínas presentes nos homogenatos de fígado dos animais.

4.6.1 Coleta do fígado

Ao final do período experimental, os ratos foram submetidos ao protocolo de anestesia e, após aprofundamento anestésico, realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada. Os animais foram então eutanasiados através da técnica de deslocamento cervical e o fígado perfundido foi coletado.

Frações do fígado (0,1g) foram separadas para determinação do conteúdo de glutathiona. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução de cloreto de potássio (KCl) 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0; divulsionado e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com

solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O restante foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C (LU; JUNK; COON, 1969), sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972).

4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG)

O conteúdo de glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG) foi quantificado segundo protocolo proposto por Rahman; Kode e Biswas (2006), modificado do método colorimétrico de Tietze (1969).

A fração do fígado separada foi pesada e homogeneizada em uma mistura gelada de ácido metafosfórico 5% e ácido sulfosalicílico 0,6%. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e mantido no gelo até a determinação (no máximo 1 hora).

Para a determinação da forma oxidada, primeiramente foi feita a derivatização da forma reduzida com 2-vinilpiridina. O extrato ácido obtido acima (100 µL) foi adicionado em um microtubo, na presença de 2 µL de 2-vinilpiridina. Após 1 hora em temperatura ambiente, foram adicionados 6 µL de trietanolamina para neutralização do pH. Após isso, agitou-se vigorosamente e aguardou-se 10 minutos para a neutralização (pH entre 6 e 7). Um padrão com GSSG foi preparado da mesma forma para a etapa de determinação.

Amostras neutralizadas com e sem 2-vinilpiridina foram centrifugadas a 15.600 g por 2 minutos, e uma alíquota de 20 µl foi adicionada a uma cubeta contendo 980 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M com EDTA 0,001 M, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) 240 µM, ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 76 µM e 0,12 U/mL de glutathionaredutase (GR), que converte toda glutathiona presente na amostra em glutathiona reduzida (GSH) (TIETZE, 1969).

O DTNB reagiu com a GSH formando o cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A variação de absorbância foi medida a 412nm, a 25°C, por 4 minutos. Os resultados foram

calculados utilizando 50 μL de glutathiona oxidada 10 μM como padrão e expressos em ηmoles de glutathiona/g de tecido.

4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)

Uma alíquota de 3mL de homogeneizado foi incubada em 7mL de tampão fosfato potássio 0,1 M, pH 7,0, a 37°C, sob agitação constante. Amostras do tempo zero e após duas horas foram retiradas e precipitadas com TCA 5%. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi submetido à reação com ácido tiobarbitúrico 0,67%, em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em gelo por 20 minutos, a absorbância foi registrada em 535nm (BERNHEIM; BERNHEIM; WILBUR, 1948). A concentração de TBARS foi calculada considerando o coeficiente de extinção micromolar $\epsilon = 0,156 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Os valores do potencial peroxidativo hepático foram expressos em ηmoles de TBARS produzidos por mg de proteína em 120 minutos.

4.6.4. Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)

A transformação de xantina em ácido úrico, catalisada pela xantina oxidase, ativa o oxigênio molecular a $\text{O}_2^{\bullet-}$. Essa reação é acoplada à redução do citocromo C pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$, que pode ser acompanhada pela redução da absorbância em 550 nm, a 25°C. A adição da SOD contida na amostra promove inibição na velocidade de redução do citocromo C, uma vez que a SOD compete com o citocromo C pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$, dismutando-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade total da SOD foi então medida na presença de cianeto, em concentração adequada à inibição da atividade da citocromo C oxidase (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

O meio de reação foi composto por citocromo C 100 μM , xantina 500 μM , EDTA 1mM, cianeto de potássio (KCN) 200 μM e tampão fosfato de potássio 5 mM pH 7,8. A quantidade de xantina oxidase, diluída no mesmo tampão do ensaio, foi ajustada em cada dia de experimento de modo a garantir uma variação de absorbância de 0,030/min no meio de reação

sem amostra. O sobrenadante hepático, diluído 1:50 no tampão do ensaio, foi acrescentado em quantidade suficiente para inibir de 20 a 40% a velocidade de redução do citocromo C, promovida pelo sistema xantina/xantina oxidase do meio de reação. Os resultados foram expressos em U/mg proteína, onde 1 U foi definida como a quantidade de enzima na amostra requerida para inibir 50% da redução do citocromo C, por minuto, a 25°C, em pH 7,8.

4.6.5 Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT)

A catalase promove a hidrólise de H_2O_2 a água e hidrogênio molecular. A técnica empregada quantificou a velocidade da decomposição de H_2O_2 pela enzima, pelo decréscimo de absorbância a 230nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 30°C (BEUTLER, 1975). O meio de reação foi composto por H_2O_2 10mM e tampão Tris 1M, EDTA 5mM, pH 8,0; o resultado foi expresso em U/mg proteína. Uma unidade de catalase corresponde à atividade da enzima que hidrolisa 1mmol de H_2O_2 por minuto a 30°C, em pH 8,0.

4.6.6 Atividade da enzima antioxidante glutationaperoxidase (GPx)

A glutationaperoxidase (GPx) interfere no processo de peroxidação de lipídios uma vez que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos orgânicos (ROOH), ao mesmo tempo em que oxida a GSH.

O método utilizado (SIES et al., 1979) mediu a velocidade da oxidação de NADPH, catalisada pela GR, que foi proporcional à produção de GSSG, catalisada pela GPx, em presença de peróxido de ter-butílica (t-BOOH).

A amostra foi adicionada ao meio contendo NADPH 20 mM, GSH 0,1 M; GR 0,1 U/mL; EDTA 5mM e tampão Tris 0,1 M pH 7,0. Após um minuto de estabilização a 30°C; t-BOOH 0,5 mM foi adicionado e o decréscimo de absorbância foi acompanhado a 340nm, 30°C ($\epsilon =$

$6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde 1 U é a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ NADPH/minuto, a 30°C , em pH 7,0.

4.6.7 Determinação de proteína

O conteúdo de proteína nas diversas frações estudadas foi determinado pelo método de Lowry (1951). As amostras de fígado foram diluídas em água destilada na proporção de 1:10 e as de rim na proporção de 1:5 tanto para a fração citossólica quanto para o homogenato. Após a diluição, $20 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra foi adicionado a $480 \text{ } \mu\text{L}$ de água destilada em duplicata. Foi preparada uma curva padrão de albumina no dia da dosagem de proteína que foi utilizada para a determinação dos conteúdos, apresentando os resultados em mg de proteína. Posteriormente, 5 mL de uma solução contendo sulfato de cobre (CuSO_4) 2%, tartarato de sódio 4% e uma solução alcalina contendo carbonato de sódio 2% e hidróxido de sódio 0,4% foi adicionada a cada amostra em duplicata e deixou-se reagindo por 10 minutos. Após isso, adicionou-se uma solução na proporção de 1:4 de reagente de Folin e esperou-se mais 30 minutos até a leitura em espectrofotômetro à 660 nm em temperatura ambiente.

4.8 ESTUDO NEUROQUÍMICO

4.8.1 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Para essa avaliação foram coletadas cinco estruturas encefálicas: hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo e estriato, que foram preparadas e posteriormente analisadas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção eletroquímica (ED) (HPLC-ED) (FELICIO et al., 1996).

4.8.2 Colheita das estruturas cerebrais

Os animais foram decapitados com auxílio da guilhotina, o encéfalo foi rapidamente retirado e colocado sobre uma placa de gelo para realização da colheita das estruturas cerebrais. O procedimento de colheita das estruturas não ultrapassou o tempo de 3 minutos por animal.

As estruturas cerebrais coletadas foram acondicionadas em microtubos e rapidamente depositas em isopor contendo gelo seco para congelamento instantâneo, a seguir foram pesadas e permaneceram estocadas, por até 20 dias, em freezer à -80°C para posterior análise utilizando HPLC.

4.8.3 Preparo das amostras para análise em HPLC

As estruturas encefálicas (córtex, hipotálamo, hipocampo, estriato e cerebelo) coletadas e congeladas foram homogeneizadas, com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, com solução gelada de ácido perclórico (ClHO₄) 0,1 M (Merck®) contendo 0,02% de metabissulfato de sódio (Na₂S₂O₅), EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzilamina - padrão interno para a avaliação dos neurotransmissores), sendo o volume de 15 vezes o peso para o córtex pré-frontal, o hipotálamo e o hipocampo, 20 vezes para o estriato e 10 vezes para o cerebelo.

Após a homogeneização, para melhor precipitação das proteínas e ácidos nucleicos, os homogenatos permaneceram *overnight* em refrigerador (10°C). Na manhã seguinte, o material foi centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® - refrigeração a 4°C), por um período de 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta automática, armazenado em microtubos e estocado em freezer -80°C para a realização da quantificação através de técnicas em HPLC.

4.8.4 Condições do HPLC

Para as avaliações neuroquímicas foi utilizado um HPLC equipado com detecção eletroquímica. O aparelho foi constituído por uma bomba de solvente, sistema injetor e um forno de coluna para manutenção da temperatura. O detector eletroquímico empregado era composto por um registrador de dois canais e um integrador de sinal (modelo Chromatopac), todos da marca Shimadzu®. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de octadecilsilano (C-18) (Shimadzu®), medindo 150 x 4,6 mm, com 5 µm de tamanho de partícula, acoplada a uma pré-coluna e filtro de linha. O detector eletroquímico foi mantido com potencial de +0,83 V no eletrodo de trabalho, enquanto o forno foi mantido a uma temperatura constante de 45°C.

4.8.5 Preparo das soluções para análise em HPLC

A fase móvel utilizada foi preparada adicionando-se em 1 litro de H₂O Mili-Q: 4,20 g de ácido cítrico, 7,16 g de fosfato de sódio dibásico (NaH₂PO₄), 556,0 mg de ácido heptanossulfônico (HSA), 40,0 mg de EDTA e 80,0 mL de metanol grau HPLC.

O pH desta solução foi ajustado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico (H₃PO₄). Posteriormente, a fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser incorporada no sistema cromatográfico, onde permaneceu circulando *overnight*, com fluxo constante de 1,2 mL/min.

As soluções-padrão foram preparadas utilizando-se 1nM de cada um dos seguintes padrões: ácido 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA - padrão interno para a avaliação dos

neurotransmissores), DA, DOPAC, 5HT, 5HIAA, NOR e VMA, todos da Sigma[®]. Estes foram diluídos em uma solução de ácido clorídrico 0,1 M e 0,02% de Na₂S₂O₅ em água, distribuídos em microtubos (1,5mL) e, em seguida, estocados em freezer -80°C até o momento da análise. Para o desenvolvimento da curva de calibração, os padrões foram diluídos em 5.000, 10.000 e 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M e filtrados para posterior injeção no cromatógrafo. A análise destes neurotransmissores e seus metabólitos foi realizada no LADTOX da FMVZ-USP, os mesmos foram reconhecidos a partir do tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando com seus padrões, enquanto a determinação da concentração foi realizada utilizando-se o valor da área do pico na equação obtida para a curva de calibração. O limite de detecção foi de 0,2 ng para DA, DOPAC, HVA, 5HT, 5HIAA e NOR.

As análises dos aminoácidos GABA e GLU foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) em colaboração com o Prof. Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan. O aparelho utilizado foi um Shimadzu com coluna cromatográfica (ACE 3 C18-300[®], 150 x 3.0 mm) acoplada a um detector de arranjo de diodos (PDA - *photo diodo array*) ajustado a um comprimento de onda de 254nm. Sucintamente, foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reversa com duas fases móveis: a fase móvel A consistiu em uma solução tampão de 6% de acetonitrila e a fase móvel B consistiu em uma solução de 80% de acetonitrila, 20% de água milli-Q e 0,02% de EDTA. A corrida analítica foi feita em até 46 min, em um fluxo de 0,3mL/min na proporção de 94% de fase móvel A e 6% de fase móvel B; e o limite de detecção dos analitos foi de 20ng.

4.9 EUTANÁSIA

Ao final de cada período experimental, após jejum de 8 horas, os animais foram submetidos a protocolo de eutanásia aceito pelo CEUA da FMVZ-USP. Foi realizado aprofundamento anestésico seguido por deslocamento cervical, para isto, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina administradas via I.P, utilizando-se as doses de 5,0 mg/kg e 50 mg/kg; respectivamente, e posteriormente às coletas de amostras *in vivo* e a perfusão, quando necessárias, os animais, após aprofundamento anestésico, tiveram a porção cervical da coluna deslocada para promoção da eutanásia. Ao final do período experimental referente ao estudo neuroquímico, os animais foram eutanasiados por meio de decapitação com uso de guilhotina, para não haver influência de anestésicos sobre os neurotransmissores.

4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 7.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Foi empregada a análise de variância ANOVA (SNEDECOR, 1946), seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. A análise de variância Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn foi utilizada para dados não paramétricos. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seus respectivos erros-padrões, e as diferenças entre os grupos controle e experimental foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

- **Experimento 1:**

Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1 mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.

Foram empregados 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 3 dias com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou gavagem com 1 mL de etanol (E) a 10%, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.1 (Primeira fase experimental) e seu subitem 4.3.1.1 (Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados para coleta de amostras sanguíneas para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma completo e extensão sanguínea) e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), foi coletada a urina para realização da urinálise e amostras teciduais de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão e da celularidade do baço e da medula óssea, conforme detalhadamente descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Ainda, fragmentos dos órgãos linfoides (timo e baço) também foram coletados e avaliados quanto à sua histopatologia, conforme descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Para avaliação do estresse oxidativo durante a anestesia realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada, assim como descrito no item 4.6.1 (Coleta do fígado). O fígado perfundido foi coletado e suas frações (0,1g)

foram separadas para determinação do conteúdo de glutathiona [item 4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG)]. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0; diluído e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [(item 4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)]. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica, a qual foi utilizado nas técnicas para determinação da CAT, SOD e GPx [itens 4.6.4, 4.6.5 e 4.6.6 atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), respectivamente].

- **Experimento 2:**

Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1 mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.

Foram empregados 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 7 dias com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou gavagem com 1 mL de etanol (E) a 10%, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.1 (Primeira fase experimental) e seu sub item 4.3.1.1 (Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados para coleta de amostras sanguíneas para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma completo e extensão

sanguínea) e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), foi coletada a urina para realização da urinálise e amostras teciduais de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão e da celularidade do baço e da medula óssea, conforme detalhadamente descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Ainda, fragmentos dos órgãos linfoides (timo e baço) também foram coletados e avaliados quanto à sua histopatologia, conforme descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Para avaliação do estresse oxidativo durante a anestesia realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada, assim como descrito no item 4.6.1 (Coleta do fígado). O fígado perfundido foi coletado e suas frações (0,1g) foram separadas para determinação do conteúdo de glutathione [item 4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathiones total (tGSH) e oxidada (GSSG)]. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0; diluído e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [(item 4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)]. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica, a qual foi utilizado nas técnicas para determinação da CAT, SOD e GPx [itens 4.6.4, 4.6.5 e 4.6.6 atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), respectivamente].

- **Experimento 3:**

Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1 mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.

Foram empregados 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 14 dias com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou gavagem com 1 mL de etanol (E) a 10%, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.1 (Primeira fase experimental) e seu sub item 4.3.1.1 (Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados para coleta de amostras sanguíneas para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma completo e extensão sanguínea) e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), foi coletada a urina para realização da urinálise e amostras teciduais de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão e da celularidade do baço e da medula óssea, conforme detalhadamente descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Ainda, fragmentos dos órgãos linfoides (timo e baço) também foram coletados e avaliados quanto à sua histopatologia, conforme descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Para avaliação do estresse oxidativo durante a anestesia realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada, assim como descrito no item 4.6.1 (Coleta do fígado). O fígado perfundido foi coletado e suas frações (0,1g) foram separadas para determinação do conteúdo de glutathiona [item 4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG)]. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0;

divulsionado e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [(item 4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)]. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica, a qual foi utilizado nas técnicas para determinação da CAT, SOD e GPx [itens 4.6.4, 4.6.5 e 4.6.6 atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), respectivamente].

- **Experimento 4:**

Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1 mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.

Foram empregados 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 21 dias com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou gavagem com 1 mL de etanol (E) a 10%, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.1 (Primeira fase experimental) e seu sub item 4.3.1.1 (Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados para coleta de amostras sanguíneas para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma completo e extensão sanguínea) e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Após a eutanásia dos ratos (item 4.9

Eutanásia), foi coletada a urina para realização da urinálise e amostras teciduais de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão e da celularidade do baço e da medula óssea, conforme detalhadamente descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Ainda, fragmentos dos órgãos linfoides (timo e baço) também foram coletados e avaliados quanto à sua histopatologia, conforme descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Para avaliação do estresse oxidativo durante a anestesia realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada, assim como descrito no item 4.6.1 (Coleta do fígado). O fígado perfundido foi coletado e suas frações (0,1g) foram separadas para determinação do conteúdo de glutathione [item 4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathiones total (tGSH) e oxidada (GSSG)]. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0; diluído e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [(item 4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)]. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica, a qual foi utilizado nas técnicas para determinação da CAT, SOD e GPx [itens 4.6.4, 4.6.5 e 4.6.6 atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), respectivamente].

- **Experimento 5:**

Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1 mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

Foram empregados 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 28 dias com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou gavagem com 1 mL de etanol (E) a 10%, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.1 (Primeira fase experimental) e seu sub item 4.3.1.1 (Determinação da dose e da duração do período de exposição por meio da avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados para coleta de amostras sanguíneas para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma completo e extensão sanguínea) e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), foi coletada a urina para realização da urinálise e amostras teciduais de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão e da celularidade do baço e da medula óssea, conforme detalhadamente descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Ainda, fragmentos dos órgãos linfoides (timo e baço) também foram coletados e avaliados quanto à sua histopatologia, conforme descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Para avaliação do estresse oxidativo durante a anestesia realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada, assim como descrito no item 4.6.1 (Coleta do fígado). O fígado perfundido foi coletado e suas frações (0,1g) foram separadas para determinação do conteúdo de glutathiona [item 4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG)]. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0;

divulsionado e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [(item 4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)]. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica, a qual foi utilizado nas técnicas para determinação da CAT, SOD e GPx [itens 4.6.4, 4.6.5 e 4.6.6 atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), respectivamente].

- **Experimento 6:**

Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade e estresse oxidativo provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

Foram empregados 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=8 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 28 dias com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) à 10% na água de bebida, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.2 (Segunda fase experimental) e seu sub item 4.3.2.1 (Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade, estresse oxidativo e estudo neuroquímico). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados para coleta de amostras sanguíneas para determinação dos parâmetros hematológicos (hemograma completo e extensão sanguínea) e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), foi coletada a urina para

realização da urinálise e amostras teciduais de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.2 [Avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e extensão sanguínea), séricos (bioquímica sérica), urinários (urinálise) e histopatologia]. Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão, da celularidade do baço e da medula óssea e morfometria do baço e do timo, conforme detalhadamente descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo, celularidades e morfometria). Ainda, fragmentos dos órgãos linfoides (timo e baço) também foram coletados e avaliados quanto à sua histopatologia, conforme descrito no item 4.5.1 (Avaliação de órgãos linfoides: peso relativo e celularidades). Para avaliação do estresse oxidativo durante a anestesia realizou-se a perfusão intravenosa utilizando-se solução salina 0,9% gelada, assim como descrito no item 4.6.1 (Coleta do fígado). O fígado perfundido foi coletado e suas frações (0,1g) foram separadas para determinação do conteúdo de glutathiona [item 4.6.2 Ensaio para avaliação das atividades das glutathionas total (tGSH) e oxidada (GSSG)]. O restante do fígado foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0; diluído e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 peso/volume). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservado para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [(item 4.6.3 Ensaio para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS)]. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido à centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado a fração citossólica, a qual foi utilizado nas técnicas para determinação da CAT, SOD e GPx [itens 4.6.4, 4.6.5 e 4.6.6 atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), respectivamente].

- **Experimento 7:**

Avaliação da resposta imune celular [reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/Delayed-TypeHypersensitivity - DTH)] e humoral (adquirida) [mensuração dos níveis séricos de anticorpos T-dependentes específicos através do título de imunoglobulinas do subtipo M (IgM) e G (IgG)] provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

Foram empregados 40 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=10 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 28 dias com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) à 10% na água de bebida, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.2 (Segunda fase experimental) e seu sub item 4.3.2.1 (Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade, estresse oxidativo e estudo neuroquímico). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). Para determinação da reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/Delayed-TypeHypersensitivity - DTH), no 14º e 21º dias do período experimental, todos os ratos foram sensibilizados com uma solução contendo KLH, conforme descrito no item 4.5.2.1 [Reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/Delayed-TypeHypersensitivity - DTH)]. No 28º dia do período experimental, os ratos receberam por via I.D. no coxim plantar esquerdo, o desafio imunológico, por meio da inoculação de uma solução denominada de *heat-aggregated-KLH*. No dia seguinte ao inóculo, após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), o “tumor” gerado pelo desafio com KLH foi avaliado com o uso do paquímetro, procedimentos estes detalhadamente descritos no item 4.5.2.1 [Reação de hipersensibilidade do tipo IV (reação de hipersensibilidade tardia/Delayed-TypeHypersensitivity - DTH)]. Para determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-KLH por meio de ELISA, após a eutanásia dos animais sensibilizados com o KLH (item 4.9 Eutanásia), o soro dos mesmos foi coletado, assim como descrito no item 4.5.2.2 [Mensuração dos níveis séricos de anticorpos T-dependentes específicos através do título de imunoglobulinas do subtipo M (IgM) e G (IgG)]. Brevemente, placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 µL/poço de uma solução contendo KLH a 5 µg/mL de PBS e permaneceram incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução de

Tween-20 (0,05% em PBS), em seguida, foram bloqueadas, por 2 horas, com 300 µL/poço com uma solução de soro albumina sérica (BSA) à 2%. A lavagem das placas foi repetida e então foi adicionado 50 µL/poço de soro dos animais sensibilizados com o KLH diluído em PBS em concentrações adequadas, incubando-se por 2 horas. Em seguida, a placa foi novamente lavada com Tween-20 e foi adicionado 50 µL/poço de anti-rat-IgM/IgG marcado com *horseradish peroxidase* (0,2 µg/mL - HRP), incubando-se por 1 hora. Após nova lavagem das placas (400 µL/poço), foi adicionado 100 µL/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e após 10 minutos, a reação foi parada com a adição 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1N e posterior leitura à 490nm [item 4.5.2.2. Mensuração dos níveis séricos de anticorpos T-dependentes específicos através do título de imunoglobulinas do subtipo M (IgM) e G (IgG)].

- **Experimento 8:**

Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos provenientes do tratamento ou não (Co) dos animais com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

Foram empregados 40 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=10 animais/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados por 28 dias com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) à 10% na água de bebida, ou ainda ambos os tratamentos (KE), conforme descrito no item 4.3.2 (Segunda fase experimental) e seu sub item 4.3.2.1 (Avaliação da toxicidade sistêmica, parâmetros de imunotoxicidade, estresse oxidativo e estudo neuroquímico). Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 4.4.1 (Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração dos ratos). Para o estudo neuroquímico dos neurotransmissores DA, 5HT, NOR, GABA e GLU, e seus metabólitos: DOPAC, HVA e 5HIA (item 4.8.1 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos); após a eutanásia dos ratos (item 4.9 Eutanásia), foram coletadas amostras de cinco estruturas encefálicas (hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo e estriato), conforme descrito no item 4.8.2 (Colheita das estruturas cerebrais), as quais foram posteriormente preparadas conforme descrito no item 4.8.3 (Preparo das amostras para análise em HPLC) para serem analisadas em HPLC nas condições descritas nos itens 4.8.4 e 4.8.5 (Condições do HPLC e Preparo das soluções para análise em HPLC, respectivamente).

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 3 DIAS.

6.1.1 Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 3 dias

6.1.1.1 Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 3 dias

Aos 3 dias de tratamento nenhum dos animais apresentou sinais de toxicidade bem como alterações nos parâmetros referentes ao consumo total de água, ração e ganho de peso total (Tabela 1).

Tabela 1 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Consumo de ração (g)	69,5 ± 6,0	68,1 ± 8,0	71,1 ± 7,6	61,6 ± 5,3
Consumo de água (mL)	58,0 ± 4,3	65,4 ± 5,2	71,6 ± 4,6	70,9 ± 2,1
Ganho de peso (g)	13,9 ± 1,7	9,4 ± 2,1	9,0 ± 1,7	8,0 ± 2,8

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.1.1.2 Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 3 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação dos parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos, não revelaram quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos de animais tratados e os parâmetros avaliados por 3 dias (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	$8,37 \pm 0,17$	$8,46 \pm 0,22$	$8,45 \pm 0,11$	$8,52 \pm 0,16$
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$9,75 \pm 0,63$	$10,16 \pm 0,33$	$9,20 \pm 1,40$	$10,35 \pm 1,10$
Hemoglobina (g/dL)	$18,30 \pm 0,59$	$17,85 \pm 0,51$	$18,53 \pm 0,39$	$18,14 \pm 0,39$
Hematócrito (%)	$47,54 \pm 0,94$	$47,46 \pm 1,01$	$48,33 \pm 0,42$	$48,05 \pm 0,56$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$721,1 \pm 83,8$	$614,6 \pm 62,4$	$685,8 \pm 73,4$	$695,5 \pm 86,0$
^a MCV (fL)	$56,76 \pm 0,43$	$56,15 \pm 0,61$	$57,23 \pm 0,64$	$56,44 \pm 0,60$
^b MCH (pg)	$21,83 \pm 0,52$	$21,23 \pm 0,46$	$21,94 \pm 0,51$	$21,3 \pm 0,38$
^c MCHC (g/dL)	$38,44 \pm 0,66$	$37,79 \pm 0,48$	$38,31 \pm 0,54$	$37,33 \pm 0,51$
Neutrófilos (%)	$19,63 \pm 3,11$	$20,88 \pm 2,02$	$18,75 \pm 3,98$	$18,25 \pm 2,89$
Linfócitos (%)	$79,13 \pm 3,17$	$78,0 \pm 1,97$	$80,88 \pm 3,14$	$81,13 \pm 3,14$
Monócitos (%)	$1,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$2,0 \pm 0,0$
Eosinófilos (%)	$2,3 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$
Basófilos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

^aMCV = Volume Corpuscular Médio; ^bMCH = Hemoglobina Corpuscular Média; ^cMCHC = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.1.1.3 Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 3 dias

Aos 3 dias de tratamento foi observado redução nos níveis de FA dos animais pertencentes aos grupos tratados com cetamina (K e KE) quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (Figura 10).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (Figura 11a), redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com os grupos Co e KE (Figura 11b) e aumento nos níveis séricos de HDL de todos os animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com o grupo Co (Figura 11c).

Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram alterações.

Figura 10 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias. Observou-se em ambos os grupos tratados com cetamina (K e KE), redução nas concentrações de fosfatase alcalina (** $p < 0,01$ K vs Co, * $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 11 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias. (a) Observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (* $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Tukey). (b) Observou-se redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com o grupo Co e KE (** $p < 0,01$ K vs Co; ** $p < 0,01$ K vs KE; teste de Dunn). (c) Todos os animais exibiram aumento nos níveis séricos de *High-density lipoproteins* (HDL) quando comparados com o grupo Co (* $p < 0,05$ K vs Co, ** $p < 0,01$ E vs Co, * $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.1.1.4 Urinálise dos animais tratados por 3 dias

Os resultados provenientes da urinálise de animais tratados por 3 dias não revelaram quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os parâmetros avaliados (Tabela 3).

Tabela 3 - Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.

	pH	^a Gli (mg/dl)	^b Asc (mg/dl)	^c Bil (md/dl)	^d Prot (mg/dl)	^e Hemo (mg/dl)	^f Eritro (μ l)	^g Leuco (μ l)	Densidade (DU)
Controle (n=8)	5,9 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	88,6 $\pm$ 68,7	76,0 $\pm$ 56,5	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 1,0	1017 $\pm$ 5,5
K (n=8)	5,6 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	28,6 $\pm$ 12,4	84,0 $\pm$ 54,7	0,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,3	1014 $\pm$ 3,5
E (n=8)	5,6 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	18,0 $\pm$ 4,9	165,0 $\pm$ 78,4	0,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,3	1013 $\pm$ 3,1
KE (n=8)	5,6 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	38,6 $\pm$ 16,1	155,0 $\pm$ 64,9	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1018 $\pm$ 4,2

^aGli = glicose; ^bAsc = ácido ascórbico; ^cBil = bilirrubina; ^dProt = proteína; ^eHemo = hemoglobina; ^fEritro = eritrócitos; ^gLeuco = leucócitos. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.1.1.5 Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 3 dias

Não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos dos animais tratados por 3 dias (dados não mostrados).

6.1.2 Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 3 dias

6.1.2.1 Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 3 dias

Em relação à avaliação de órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada aos 3 dias de tratamento (Tabela 4).

Tabela 4 - Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Baço ($\times 10^{-3}$ g/100g de PV)	$0,28 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,02$
Timo ($\times 10^{-3}$ g/100g de PV)	$0,19 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$
Celularidade do baço ($\times 10^6$ /g de baço)	$228,9 \pm 22,75$	$226,4 \pm 23,22$	$251,5 \pm 23,77$	$251,6 \pm 25,29$
Celularidade da medula óssea ($\times 10^6$ células)	$6,86 \pm 0,99$	$8,02 \pm 0,92$	$6,78 \pm 0,74$	$8,08 \pm 1,05$

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. PV = peso vivo.

6.1.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 3 dias

Aos 3 dias de tratamento, foi observado um aumento na taxa de peroxidação lipídica, indicado pelo aumento estatisticamente significativo da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais pertencentes ao grupo K em relação aos animais pertencentes ao grupo Co (Tabela 5). Os demais parâmetros não apresentaram alterações.

Tabela 5 - Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga [atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutationaperoxidase (GPx) e catalase (CAT); conteúdo de glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG); e peroxidação lipídica (TBARS)] de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 3 dias.

	Controle	K	E	KE
	(n=6-8)	(n=6-8)	(n=6-8)	(n=6-8)
Fígado				
SOD (U/mg prot)	85,6 ± 4,5	112,2 ± 10,4	95,5 ± 2,6	90,0 ± 6,7
GPx (U/mg prot)	0,70 ± 0,13	0,80 ± 0,09	0,74 ± 0,13	0,94 ± 0,23
CAT (U/mg prot)	3,79 ± 0,42	4,71 ± 0,34	4,15 ± 0,21	4,49 ± 0,32
tGSH (µM)	1,32 ± 0,18	1,31 ± 0,08	1,10 ± 0,04	1,11 ± 0,07
GSSG (µM)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	3,46 ± 0,25 ^a	4,61 ± 0,14 ^b	3,90 ± 0,18	4,25 ± 0,19
Rins				
SOD (U/mg prot)	149,0 ± 41,2	108,2 ± 8,1	105,9 ± 12,5	77,27 ± 9,0
GPx (U/mg prot)	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,11	0,19 ± 0,08	0,09 ± 0,06
CAT (U/mg prot)	1,07 ± 0,02	1,02 ± 0,04	0,90 ± 0,19	1,09 ± 0,00
tGSH (µM)	0,50 ± 0,06	0,43 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,38 ± 0,03
GSSG (µM)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00
TBARS (nmol/mg prot)	0,88 ± 0,14	0,82 ± 0,13	1,14 ± 0,17	1,06 ± 0,24
Bexiga				
tGSH (µM)	0,28 ± 0,04	0,28 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,03
GSSG (µM)	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00

Observamos no fígado um aumento da concentração de TBARS nos animais pertencentes ao grupo K em relação aos animais pertencentes ao grupo Co (**p<0,01 K vs Co; teste de Tukey). Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 7 DIAS

6.2.1 Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 7 dias

6.2.1.1 Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 7 dias

Aos 7 dias de tratamento nenhum dos animais apresentou sinais de toxicidade bem como alterações nos parâmetros referentes ao consumo total de água, ração e ganho de peso total (Tabela 6).

Tabela 6 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Consumo de ração (g)	158,0 ± 13,7	149,6 ± 9,9	161,8 ± 12,6	150,4 ± 11,2
Consumo de água (mL)	183,8 ± 21,6	191,3 ± 18,4	217,5 ± 27,6	211,3 ± 20,1
Ganho de peso (g)	30,9 ± 3,5	24,6 ± 3,3	27,0 ± 2,4	23,4 ± 2,8

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.2.1.2 Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 7 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação dos parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos, não revelaram quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos de animais tratados e os parâmetros avaliados por 7 dias (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	$8,35 \pm 0,26$	$8,38 \pm 0,20$	$8,65 \pm 0,10$	$8,48 \pm 0,18$
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$10,88 \pm 0,96$	$9,59 \pm 0,83$	$9,80 \pm 0,62$	$9,30 \pm 1,10$
Hemoglobina (g/dL)	$18,24 \pm 0,22$	$18,21 \pm 0,22$	$18,78 \pm 0,21$	$18,57 \pm 0,43$
Hematócrito (%)	$47,14 \pm 1,17$	$47,36 \pm 0,90$	$48,98 \pm 0,31$	$48,24 \pm 0,88$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$764,3 \pm 94,72$	$700,8 \pm 74,60$	$681,3 \pm 69,33$	$778,7 \pm 47,44$
^a MCV (fL)	$56,89 \pm 0,67$	$56,59 \pm 0,35$	$56,66 \pm 0,40$	$57,06 \pm 0,55$
^b MCH (pg)	$21,96 \pm 0,62$	$25,93 \pm 2,68$	$21,73 \pm 0,33$	$21,93 \pm 0,43$
^c MCHC (g/dL)	$38,79 \pm 0,72$	$38,5 \pm 0,43$	$38,34 \pm 0,38$	$38,4 \pm 0,44$
Neutrófilos (%)	$21,13 \pm 2,96$	$31,63 \pm 6,61$	$23,75 \pm 2,41$	$17,43 \pm 4,22$
Linfócitos (%)	$78,13 \pm 2,98$	$67,75 \pm 6,48$	$76,13 \pm 2,33$	$82,57 \pm 4,22$
Monócitos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Eosinófilos (%)	$1,5 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,3$	$1 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Basófilos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

^aMCV = Volume Corpuscular Médio; ^bMCH = Hemoglobina Corpuscular Média; ^cMCHC = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.2.1.3 Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 7 dias

Aos 7 dias de tratamento foi observado redução nos níveis de FA dos animais pertencentes aos grupos tratados com cetamina (K e KE) quando comparados com o grupo Co e E. (Figura 12).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (Figura 13a), redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com os grupos Co e KE (Figura 13b) e aumento nos níveis séricos de HDL de todos os animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com o grupo Co (Figura 13c).

Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram alterações.

Figura 12 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias. (a) Observou-se que ambos os tratamentos, K e KE, promoveram redução nas concentrações de fosfatase alcalina (**** $p < 0,0001$ K vs Co; * $p < 0,05$ K vs E; ** $p < 0,01$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 13 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias. (a) Observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (** $p < 0,01$ KE vs Co; teste de Tukey). (b) Observou-se redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com o grupo Co e KE (* $p < 0,05$ K vs Co; * $p < 0,05$ K vs KE; teste de Tukey). (c) Todos os animais exibiram aumento nos níveis séricos de *High-density lipoproteins* (HDL) quando comparados com o grupo Co (**** $p < 0,0001$ K vs Co, *** $p < 0,001$ E vs Co, *** $p < 0,001$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.2.1.4 Urinálise dos animais tratados por 7 dias

Os resultados provenientes da urinálise de animais tratados por 7 dias não revelaram quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os parâmetros avaliados (Tabela 8).

Tabela 8 - Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.

	pH	^a Gli (mg/dl)	^b Asc (mg/dl)	^c Bil (md/dl)	^d Prot (mg/dl)	^e Hemo (mg/dl)	^f Eritro (μ l)	^g Leuco (μ l)	Densidade (DU)
Controle (n=8)	5,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	41,43 $\pm$ 15,5	18,0 $\pm$ 8,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1023 $\pm$ 2,5
K (n=8)	5,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	98,6 $\pm$ 68,0	92,5 $\pm$ 69,8	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	1021 $\pm$ 2,9
E (n=8)	5,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	92,9 $\pm$ 69,0	134,0 $\pm$ 68,2	0,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,5	1018 $\pm$ 3,7
KE (n=8)	5,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	51,4 $\pm$ 17,4	30,0 $\pm$ 20,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	1021 $\pm$ 3,7

^aGli = glicose; ^bAsc = ácido ascórbico; ^cBil = bilirrubina; ^dProt = proteína; ^eHemo = hemoglobina; ^fEritro = eritrócitos; ^gLeuco = leucócitos. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.2.1.5 Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 7 dias

Não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos dos animais tratados por 7 dias (dados não mostrados).

6.2.2 Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 7 dias

6.2.2.1 Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 7 dias

Em relação à avaliação de órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada aos 7 dias de tratamento (Tabela 9).

Tabela 9 - Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Baço (x10 ⁻³ g/100g de PV)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,03
Timo (x10 ⁻³ g/100g de PV)	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Celularidade do baço (x10 ⁶ /g de baço)	210,5 ± 26,72	217,5 ± 19,95	299,9 ± 22,15	264,6 ± 35,61
Celularidade da medula óssea (x10 ⁶ células)	5,40 ± 0,92	5,43 ± 0,95	5,51 ± 1,11	4,94 ± 0,98

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. PV = peso vivo.

6.2.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 7 dias

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros referentes à avaliação do estresse oxidativo aos 7 dias de tratamento (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga [atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT); conteúdo de glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG); e peroxidação lipídica (TBARS)] de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 7 dias.

	Controle	K	E	KE
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
Fígado				
SOD (U/mg prot)	113,4 ± 7,7	116,1 ± 40,5	109,4 ± 13,8	103,7 ± 19,5
GPx (U/mg prot)	0,74 ± 0,09	0,91 ± 0,12	0,91 ± 0,11	0,93 ± 0,16
CAT (U/mg prot)	3,41 ± 0,29	3,23 ± 0,28	3,72 ± 0,46	3,34 ± 0,36
tGSH (μM)	1,07 ± 0,11	1,06 ± 0,11	1,10 ± 0,07	1,00 ± 0,11
GSSG (μM)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	3,39 ± 0,15	3,54 ± 0,20	3,48 ± 0,18	3,63 ± 0,37
Rins	(n=5-8)	(n=5-8)	(n=5-8)	(n=5-8)
SOD (U/mg prot)	104,9 ± 8,6	114,4 ± 6,0	92,5 ± 7,0	87,3 ± 6,3
GPx (U/mg prot)	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,01
CAT (U/mg prot)	1,12 ± 0,04	1,19 ± 0,19	1,06 ± 0,11	0,91 ± 0,08
tGSH (μM)	0,50 ± 0,05	0,55 ± 0,07	0,50 ± 0,06	0,52 ± 0,06
GSSG (μM)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	1,40 ± 0,26	1,48 ± 0,24	1,44 ± 0,27	1,68 ± 0,20
Bexiga	(n=6)	(n=6)	(n=5-6)	(n=5-6)
tGSH (μM)	0,29 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,32 ± 0,06
GSSG (μM)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,00

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 14 DIAS

6.3.1 Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 14 dias

6.3.1.1 Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 14 dias

Aos 14 dias de tratamento nenhum dos animais apresentou sinais de toxicidade bem como alterações nos parâmetros referentes ao consumo total de água, ração e ganho de peso total (Tabela 11).

Tabela 11 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Consumo de ração (g)	364,3 ± 15,9	337,0 ± 18,4	325,6 ± 14,0	323,0 ± 18,0
Consumo de água (mL)	522,5 ± 42,5	453,8 ± 34,3	452,5 ± 40,2	456,3 ± 28,8
Ganho de peso (g)	58,63 ± 8,13	46,50 ± 8,34	69,38 ± 8,11	58,63 ± 7,40

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.3.1.2 Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 14 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação dos parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos, revelaram aos 14 dias de tratamento que os animais pertencentes ao grupo E e KE quando comparados com o grupo Co exibiram redução no número de neutrófilos e aumento no número de linfócitos (Tabela 12).

Tabela 12 - Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,69 $\pm$ 0,22	8,52 $\pm$ 0,16	8,83 $\pm$ 0,17	8,6 $\pm$ 0,18
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	8,73 $\pm$ 1,10	8,8 $\pm$ 0,60	9,03 $\pm$ 0,93	8,56 $\pm$ 0,73
Hemoglobina (g/dL)	18,39 $\pm$ 0,32	18,19 $\pm$ 0,38	18,79 $\pm$ 0,28	18,59 $\pm$ 0,42
Hematócrito (%)	47,99 $\pm$ 0,86	47,88 $\pm$ 0,70	49,27 $\pm$ 0,57	48,66 $\pm$ 0,86
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	740,8 $\pm$ 81,36	870,4 $\pm$ 41,30	772,7 $\pm$ 11,81	83,54 $\pm$ 66,12
^a MCV (fL)	55,94 $\pm$ 0,70	56,24 $\pm$ 0,71	55,89 $\pm$ 0,61	56,79 $\pm$ 0,34
^b MCH (pg)	21,48 $\pm$ 0,59	21,39 $\pm$ 0,62	21,34 $\pm$ 0,55	21,68 $\pm$ 0,51
^c MCHC (g/dL)	38,34 $\pm$ 0,57	38,00 $\pm$ 0,62	38,14 $\pm$ 0,58	38,19 $\pm$ 0,64
Neutrófilos (%)	34,43 $\pm$ 4,23 ^a	30,50 $\pm$ 4,17	16,86 $\pm$ 3,0 ^b	18,25 $\pm$ 2,81 ^b
Linfócitos (%)	65,00 $\pm$ 4,35 ^a	69,25 $\pm$ 4,09	84,75 $\pm$ 3,35 ^b	81,25 $\pm$ 2,64 ^b
Monócitos (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Eosinófilos (%)	1,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,3	1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Basófilos (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Observamos redução no número de neutrófilos (* $p < 0,05$ E vs Co; * $p < 0,05$ KE vs Co, teste de Tukey) e aumento no número de linfócitos (** $p < 0,01$ E vs Co; * $p < 0,05$ KE vs Co, teste de Tukey) de ratos pertencentes aos grupos E e KE quando comparados com o grupo Co. ^aMCV = Volume Corpuscular Médio; ^bMCH = Hemoglobina Corpuscular Média; ^cMCHC = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.3.1.3 Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 14 dias

Aos 14 dias de tratamento foi observado redução nos níveis de FA dos animais pertencentes aos grupos tratados com cetamina (K e KE) quando comparados com o grupo Co e E. (Figura 14).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (Figura 15a), redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com os grupos Co e KE (Figura 15b) e aumento nos níveis séricos de HDL de todos os animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com o grupo Co (Figura 15c).

Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram alterações.

Figura 14 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias. (a) Observou-se que ambos os tratamentos, K e KE, promoveram redução nas concentrações de fosfatase alcalina (**** $p < 0,0001$ K vs Co; *** $p < 0,001$ K vs E; *** $p < 0,01$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 15 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P. ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias. (a) Observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (***p < 0,001 KE vs Co; teste de Tukey). (b) Observou-se redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes aos grupos K quando comparados com o grupo Co e KE (**p < 0,01 K vs Co; *p < 0,05 K vs KE; teste de Tukey). (c) Todos os animais exibiram aumento nos níveis séricos de *High-density lipoproteins* (HDL) quando comparados com o grupo Co (****p < 0,0001 K vs Co, ***p < 0,001 E vs Co, ***p < 0,001 KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.3.1.4 Urinálise dos animais tratados por 14 dias

Os resultados provenientes da urinálise de animais tratados por 14 dias não revelaram quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os parâmetros avaliados (Tabela 13).

Tabela 13 - Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.

	pH	^a Gli (mg/dl)	^b Asc (mg/dl)	^c Bil (md/dl)	^d Prot (mg/dl)	^e Hemo (mg/dl)	^f Eritro (μ l)	^g Leuco (μ l)	Densidade (DU)
Controle (n=8)	5,3 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	151,3 $\pm$ 76,8	82,50 $\pm$ 72,5	0,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	1018 $\pm$ 2,7
K (n=8)	5,6 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	60,0 $\pm$ 15,4	23,33 $\pm$ 13,3	0,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,5	1018 $\pm$ 3,3
E (n=8)	5,3 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	28,3 $\pm$ 14,7	106,70 $\pm$ 96,7	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1016 $\pm$ 3,4
KE (n=8)	5,6 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	107,5 $\pm$ 58,1	23,33 $\pm$ 13,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1021 $\pm$ 3,5

^aGli = glicose; ^bAsc = ácido ascórbico; ^cBil = bilirrubina; ^dProt = proteína; ^eHemo = hemoglobina; ^fEritro = eritrócitos; ^gLeuco = leucócitos. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.3.1.5 Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 14 dias

Não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos dos animais tratados por 14 dias (dados não mostrados).

6.3.2 Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 14 dias

6.3.2.1 Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 14 dias

Em relação à avaliação de órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada aos 14 dias de tratamento (Tabela 14).

Tabela 14 - Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Baço ($\times 10^{-3}$ g/100g de PV)	$0,28 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$
Timo ($\times 10^{-3}$ g/100g de PV)	$0,18 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$
Celularidade do baço ($\times 10^6$ /g de baço)	$166,2 \pm 20,93$	$174,3 \pm 14,36$	$177,1 \pm 18,08$	$195,9 \pm 33,79$
Celularidade da medula óssea ($\times 10^6$ células)	$6,45 \pm 0,77$	$7,08 \pm 0,95$	$7,28 \pm 1,29$	$8,33 \pm 1,12$

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. PV = peso vivo.

6.3.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 14 dias

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros referentes à avaliação do estresse oxidativo aos 14 dias de tratamento (Tabela 15).

Tabela 15 - Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga [atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT); conteúdo de glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG); e peroxidação lipídica (TBARS)] de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 14 dias.

	Controle	K	E	KE
	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)
Fígado				
SOD (U/mg prot)	109,3 ± 12,8	124,2 ± 10,5	121,3 ± 24,5	128,7 ± 27,2
GPx (U/mg prot)	0,74 ± 0,10	0,85 ± 0,11	1,03 ± 0,24	1,20 ± 0,28
CAT (U/mg prot)	3,82 ± 0,35	3,82 ± 0,28	3,69 ± 0,35	4,00 ± 0,22
tGSH (μM)	1,58 ± 0,10	1,63 ± 0,17	1,50 ± 0,12	1,42 ± 0,11
GSSG (μM)	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	2,98 ± 0,31	3,49 ± 0,18	3,69 ± 0,15	3,29 ± 0,18
Rins				
	(n=5-6)	(n=5-6)	(n=5-6)	(n=5-6)
SOD (U/mg prot)	70,4 ± 4,2	54,7 ± 2,7	57,9 ± 6,8	53,0 ± 5,4
GPx (U/mg prot)	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,03
CAT (U/mg prot)	1,09 ± 0,08	1,13 ± 0,09	1,32 ± 0,21	1,34 ± 0,17
tGSH (μM)	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,63 ± 0,03
GSSG (μM)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	1,19 ± 0,22	1,00 ± 0,13	1,08 ± 0,17	1,16 ± 0,16
Bexiga				
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
tGSH (μM)	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,01
GSSG (μM)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,01

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.4 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 21 DIAS

6.4.1 Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 21 dias

6.4.1.1 Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 21 dias

Aos 21 dias de tratamento nenhum dos animais apresentou sinais de toxicidade bem como alterações nos parâmetros referentes ao consumo total de água, ração e ganho de peso total (Tabela 16).

Tabela 16 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Consumo de ração (g)	545,8 ± 15,5	486,0 ± 12,5	544,0 ± 18,8	506,0 ± 29,5
Consumo de água (mL)	724,5 ± 43,0	674,9 ± 48,8	678,9 ± 34,1	699,4 ± 47,5
Ganho de peso (g)	79,6 ± 9,5	79,4 ± 6,2	83,4 ± 7,5	77,4 ± 8,2

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.4.1.2 Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 21 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação dos parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos, não revelaram quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos de animais tratados e os parâmetros avaliados por 21 dias (Tabela 17).

Tabela 17 - Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	9,06 ± 0,28	8,87 ± 0,22	8,97 ± 0,11	8,93 ± 0,22
Leucócitos (10 ³ /μL)	8,33 ± 1,07	9,39 ± 0,78	8,24 ± 0,72	8,74 ± 0,64
Hemoglobina (g/dL)	19,19 ± 0,41	18,83 ± 0,43	18,85 ± 0,27	18,55 ± 0,29
Hematócrito (%)	50,24 ± 1,10	49,64 ± 0,98	49,65 ± 0,47	49,44 ± 0,83
Plaquetas (10 ³ /μL)	688,6 ± 127,40	850,0 ± 56,85	741,8 ± 100,30	700,5 ± 107,90
^a MCV (fL)	55,6 ± 0,75	56,05 ± 0,57	55,43 ± 0,55	55,45 ± 0,64
^b MCH (pg)	21,26 ± 0,54	21,28 ± 0,50	21,04 ± 0,42	20,86 ± 0,49
^c MCHC (g/dL)	38,2 ± 0,47	37,95 ± 0,53	37,98 ± 0,40	37,56 ± 0,51
Neutrófilos (%)	23,88 ± 3,95	22,75 ± 6,35	15,88 ± 2,70	18,75 ± 2,78
Linfócitos (%)	75,5 ± 3,94	76,75 ± 6,36	84,13 ± 2,70	81,13 ± 2,88
Monócitos (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Eosinófilos (%)	1,7 ± 0,7	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Basófilos (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^aMCV = Volume Corpuscular Médio; ^bMCH = Hemoglobina Corpuscular Média; ^cMCHC = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.4.1.3 Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 21 dias

Aos 21 dias de tratamento foi observado redução nos níveis de FA dos animais pertencentes aos grupos tratados com cetamina (K e KE) quando comparados com o grupo Co e E. (Figura 16).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (Figura 17a), redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com os grupos Co e KE (Figura 17b) e aumento nos níveis séricos de HDL de todos os animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com o grupo Co (Figura 17c).

Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram alterações.

Figura 16 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias. (a) Observou-se que ambos os tratamentos, K e KE, promoveram redução nas concentrações de fosfatase alcalina (** $p < 0,01$ K vs Co; *** $p < 0,001$ K vs E; *** $p < 0,001$ KE vs Co; *** $p < 0,001$ KE vs E; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 17 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P. ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias. (a) Observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (**p<0,001 KE vs Co; teste de Tukey). (b) Observou-se redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes aos grupos K quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co e KE (**p<0,01 K vs Co; ***p<0,001 K vs KE; teste de Tukey). (c) Todos os animais exibiram aumento nos níveis séricos de *High-density lipoproteins* (HDL) quando comparados com o grupo Co (****p<0,0001 K vs Co, ***p<0,001 E vs Co, ****p<0,0001 KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.4.1.4 Urinálise dos animais tratados por 21 dias

Os resultados provenientes da urinálise de animais tratados por 21 dias não revelaram quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os parâmetros avaliados (Tabela 18).

Tabela 18 - Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.

	pH	^a Gli (mg/dl)	^b Asc (mg/dl)	^c Bil (md/dl)	^d Prot (mg/dl)	^e Hemo (mg/dl)	^f Eritro (μ l)	^g Leuco (μ l)	Densidade (DU)
Controle (n=8)	5,1 $\pm$ 0,13	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	51,25 $\pm$ 14,57	20,0 $\pm$ 10,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,5	1019 $\pm$ 3,5
K (n=8)	5,1 $\pm$ 0,13	0,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0	115,0 $\pm$ 56,35	50,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,2	1019 $\pm$ 3,0
E (n=8)	5,3 $\pm$ 0,16	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	95,71 $\pm$ 68,52	134,0 $\pm$ 68,2	1,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,7	1015 $\pm$ 3,5
KE (n=8)	5,3 $\pm$ 0,16	0,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,5	48,75 $\pm$ 15,29	30,0 $\pm$ 20,0	1,5 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3	1019 $\pm$ 3,6

^aGli = glicose; ^bAsc = ácido ascórbico; ^cBil = bilirrubina; ^dProt = proteína; ^eHemo = hemoglobina; ^fEritro = eritrócitos; ^gLeuco = leucócitos. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.4.1.5 Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 21 dias

Não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos dos animais tratados por 21 dias (dados não mostrados).

6.4.2 Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 21 dias

6.4.2.1 Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 21 dias

Em relação à avaliação de órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada aos 21 dias de tratamento (Tabela 19).

Tabela 19 - Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Baço ($\times 10^{-3}$ g/100g de PV)	0,25 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
Timo ($\times 10^{-3}$ g/100g de PV)	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,02
Celularidade do baço ($\times 10^6$ /g de baço)	201,5 $\pm$ 13,89	187,5 $\pm$ 16,22	194,4 $\pm$ 15,74	208,1 $\pm$ 18,40
Celularidade da medula óssea ($\times 10^6$ células)	7,08 $\pm$ 1,21	6,99 $\pm$ 1,13	6,21 $\pm$ 0,71	7,35 $\pm$ 0,32

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. PV = peso vivo.

6.4.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 21 dias

Aos 21 dias de tratamento, foi observado um aumento na taxa de peroxidação lipídica, indicado pelo aumento estatisticamente significativo do TBARS no fígado dos animais pertencentes ao grupo KE em relação aos animais pertencentes ao grupo Co e E, e no rim dos animais pertencentes ao grupo K quando comparados com o grupo Co (Tabela 20).

Os demais parâmetros analisados não apresentaram alterações.

Tabela 20 - Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga [atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT); conteúdo de glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG); e peroxidação lipídica (TBARS)] de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 21 dias.

	Controle	K	E	KE
	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)
Fígado				
SOD (U/mg prot)	176,2 ± 31,4	180,9 ± 35,5	190,1 ± 26,2	196,8 ± 39,5
GPx (U/mg prot)	0,90 ± 0,17	0,81 ± 0,09	1,08 ± 0,27	1,16 ± 0,22
CAT (U/mg prot)	3,83 ± 0,34	3,35 ± 0,34	3,88 ± 0,48	3,90 ± 0,45
tGSH (μM)	1,27 ± 0,06	1,26 ± 0,10	1,24 ± 0,06	1,35 ± 0,05
GSSG (μM)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
TBARS (nmol/mg prot)	3,39 ± 0,17 ^a	4,11 ± 0,28	3,57 ± 0,12 ^a	4,44 ± 0,25 ^b
Rins	(n=5-6)	(n=5-6)	(n=5-6)	(n=5-6)
SOD (U/mg prot)	55,1 ± 3,7	55,7 ± 1,1	49,1 ± 1,6	48,1 ± 2,6
GPx (U/mg prot)	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,01
CAT (U/mg prot)	1,02 ± 0,12	1,00 ± 0,05	1,09 ± 0,09	1,16 ± 0,09
tGSH (μM)	0,55 ± 0,06	0,59 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,49 ± 0,02
GSSG (μM)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	1,21 ± 0,13 ^a	2,21 ± 0,23 ^b	1,67 ± 0,12	1,70 ± 0,14
Bexiga	(n=6)	(n=6)	(n=5-6)	(n=5-6)
tGSH (μM)	0,27 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,33 ± 0,04
GSSG (μM)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00

Observamos no fígado um aumento da concentração de TBARS nos animais pertencentes ao grupo KE em relação aos animais pertencentes ao grupo Co e E (**p<0,01 KE vs Co; *p<0,05 KE vs E; teste de Tukey); e no rim um aumento da concentração de TBARS nos animais pertencentes ao grupo K em relação aos animais pertencentes ao grupo Co (*p<0,05 K vs Co; teste de Tukey). Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.5 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 15mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, OU 1 mL DE ETANOL (E) A 10% VIA GAVAGEM, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 28 DIAS

6.5.1 Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 28 dias

6.5.1.1 Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 28 dias

Aos 28 dias de tratamento nenhum dos animais apresentou sinais de toxicidade bem como alterações nos parâmetros referentes ao consumo total de água, ração e ganho de peso total (Tabela 21).

Tabela 21 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Consumo de ração (g)	669,9 ± 16,0	698,1 ± 14,2	685,5 ± 15,6	704,4 ± 27,4
Consumo de água (mL)	938,4 ± 24,8	923,9 ± 37,7	872,5 ± 31,6	855,5 ± 27,1
Ganho de peso (g)	109,3 ± 12,0	109,6 ± 10,4	109,0 ± 11,4	103,1 ± 10,1

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.5.1.2 Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 28 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação dos parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos, não revelaram quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos de animais tratados e os parâmetros avaliados por 28 dias (Tabela 22).

Tabela 22 - Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	$9,0 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,1$
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$9,4 \pm 1,4$	$9,4 \pm 0,9$	$7,5 \pm 0,5$	$7,7 \pm 1,2$
Hemoglobina (g/dL)	$18,7 \pm 0,3$	$19,0 \pm 0,3$	$18,5 \pm 0,4$	$18,8 \pm 0,4$
Hematócrito (%)	$49,3 \pm 0,7$	$49,9 \pm 0,5$	$48,9 \pm 0,8$	$49,4 \pm 1,1$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$750,8 \pm 74,4$	$650,3 \pm 86,4$	$567,6 \pm 109,3$	$591,4 \pm 122,3$
^a MCV (fL)	$55,1 \pm 0,6$	$56,1 \pm 0,6$	$54,8 \pm 0,4$	$55,4 \pm 0,6$
^b MCH (pg)	$20,9 \pm 0,4$	$21,4 \pm 0,5$	$20,7 \pm 0,3$	$21,0 \pm 0,4$
^c MCHC (g/dL)	$38,0 \pm 0,3$	$38,2 \pm 0,4$	$37,8 \pm 0,3$	$37,9 \pm 0,4$
Neutrófilos (%)	$24,6 \pm 2,3$	$25,3 \pm 6,4$	$19,9 \pm 3,7$	$24,0 \pm 7,5$
Linfócitos (%)	$75,0 \pm 3,0$	$77,6 \pm 6,3$	$79,6 \pm 3,9$	$75,7 \pm 7,5$
Monócitos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Eosinófilos (%)	$2,0 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,0$
Basófilos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

^aMCV = Volume Corpuscular Médio; ^bMCH = Hemoglobina Corpuscular Média; ^cMCHC = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.5.1.3 Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 28 dias

Aos 28 dias de tratamento foi observado redução nos níveis de FA dos animais pertencentes aos grupos tratados com cetamina (K e KE) quando comparados com o grupo Co e E. (Figura 18).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (Figura 19a), redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com os grupos Co e KE (Figura 19b) e aumento nos níveis séricos de HDL de todos os animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com o grupo Co (Figura 19c).

Em relação a função renal avaliada, observamos que a associação da cetamina com o etanol (KE) promoveu aumento estatisticamente significante nos níveis séricos de ureia e creatinina quando comparado com os animais pertencentes ao grupo K (Figura 20a e 20b, respectivamente).

Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram alterações.

Figura 18 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Observou-se que ambos os tratamentos, K e KE, promoveram redução nas concentrações de fosfatase alcalina (**** $p < 0,0001$ K vs Co; ** $p < 0,01$ K vs E; * $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Dunn). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 19 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (* $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Tukey). (b) Observou-se redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes aos grupos K quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co e KE (* $p < 0,05$ K vs Co; * $p < 0,05$ K vs KE; teste de Dunn). (c) Todos os animais exibiram aumento nos níveis séricos de *High-density lipoproteins* (HDL) quando comparados com o grupo Co (** $p < 0,01$ K vs Co, ** $p < 0,01$ E vs Co, **** $p < 0,0001$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 20 - Função renal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Observou-se aumento nos níveis de ureia nos ratos pertencentes ao grupo KE quando comparados com os ratos do grupo K (* $p < 0.05$ KE vs K; teste de Tukey). (b) Observou-se aumento nos níveis de creatinina nos ratos pertencentes ao grupo KE quando comparados com os ratos do grupo K (* $p < 0.05$ KE vs K; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.5.1.4 Urinálise dos animais tratados por 28 dias

Os resultados provenientes da urinálise de animais tratados por 28 dias não revelaram quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os parâmetros avaliados (Tabela 23).

Tabela 23 - Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	pH	^a Gli (mg/dl)	^b Asc (mg/dl)	^c Bil (md/dl)	^d Prot (mg/dl)	^e Hemo (mg/dl)	^f Eritro (μ l)	^g Leuco (μ l)	Densidade (DU)
Controle (n=8)	5,8 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	92,5 $\pm$ 59,1	6,3 $\pm$ 6,3	1,2 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,7	1017,0 $\pm$ 3,7
K (n=8)	5,6 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0	112,5 $\pm$ 56,9	56,3 $\pm$ 35,9	1,0 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,4	1016,0 $\pm$ 3,3
E (n=8)	5,6 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	51,3 $\pm$ 14,6	88,8 $\pm$ 46,7	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,4	1013,0 $\pm$ 2,8
KE (n=8)	5,8 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0	207,5 $\pm$ 86,3	87,5 $\pm$ 47,0	1,3 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,4	1016,0 $\pm$ 4,3

^aGli = glicose; ^bAsc = ácido ascórbico; ^cBil = bilirrubina; ^dProt = proteína; ^eHemo = hemoglobina; ^fEritro = eritrócitos; ^gLeuco = leucócitos. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.5.1.5 Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 28 dias

Não foram observadas alterações histopatológicas no coração, timo, baço, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, adrenais (dados não mostrados), fígado e rins (Figura 21 e 22) dos animais tratados por 28 dias.

Figura 21 - Avaliação histopatológica do fígado de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Os fígados apresentaram-se normais em todos os grupos (Co, K, E e KE) (n=8 animais/grupo). VC = veia centrolobular, TP = trato portal. (HE, 4x).

Figura 22 - Avaliação histopatológica do fígado (aumento de 10x) de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Os rins não exibiram alterações histopatológicas em todos os grupos (Co, K, E e KE) avaliados (n=8 animais/grupo). Gl = Glomérulo. (HE, 10x).

6.5.2 Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 28 dias

6.5.2.1 Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 28 dias

Em relação à avaliação de órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada aos 28 dias de tratamento (Tabela 24).

Tabela 24 - Peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Baço (x10 ⁻³ g/100g de PV)	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Timo (x10 ⁻³ g/100g de PV)	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Celularidade do baço (x10 ⁶ /g de baço)	210,7 ± 12,4	225,4 ± 24,2	201,0 ± 15,5	179,2 ± 17,4
Celularidade da medula óssea (x10 ⁶ células)	5,09 ± 0,7	5,70 ± 1,0	4,44 ± 0,4	5,85 ± 0,8

São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. PV = peso vivo.

6.5.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 28 dias

Aos 28 dias de tratamento, foi observado um aumento na atividade da GPx no fígado dos animais pertencentes ao grupo KE em relação aos animais pertencentes ao grupo Co (Tabela 25).

Os demais parâmetros analisados não apresentaram alterações.

Tabela 25 - Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado, rim e bexiga [atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT); conteúdo de glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG); e peroxidação lipídica (TBARS)] de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 15mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou 1mL de etanol (E) a 10% via gavagem, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	Controle	K	E	KE
	(n=6-8)	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=8)
Fígado				
SOD (U/mg prot)	196,5 ± 21,6	172,5 ± 27,7	180,1 ± 25,0	239,0 ± 36,4
GPx (U/mg prot)	0,88 ± 0,16 ^a	0,98 ± 0,13	1,41 ± 0,33	1,60 ± 0,27 ^b
CAT (U/mg prot)	4,65 ± 0,44	4,13 ± 0,33	4,18 ± 0,58	4,85 ± 0,43
tGSH (μM)	1,39 ± 0,10	1,35 ± 0,10	1,38 ± 0,12	1,35 ± 0,07
GSSG (μM)	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
TBARS (nmol/mg prot)	3,83 ± 0,29	4,10 ± 0,30	4,59 ± 0,39	4,80 ± 0,18
Rins	(n=5-6)	(n=5-6)	(n=5-6)	(n=5-6)
SOD (U/mg prot)	115,5 ± 4,9	126,1 ± 15,3	105,6 ± 4,0	113,1 ± 12,4
GPx (U/mg prot)	0,20 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02
CAT (U/mg prot)	0,87 ± 0,08	1,20 ± 0,10	1,16 ± 0,09	1,11 ± 0,11
tGSH (μM)	0,56 ± 0,07	0,51 ± 0,05	0,48 ± 0,08	0,48 ± 0,04
GSSG (μM)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
TBARS (nmol/mg prot)	1,58 ± 0,14	1,36 ± 0,36	1,41 ± 0,11	1,66 ± 0,16
Bexiga	(n=6)	(n=6)	(n=5-6)	(n=5-6)
tGSH (μM)	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,23 ± 0,03
GSSG (μM)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01

No fígado observamos aumento na atividade de GPx dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (*p<0,05 KE vs Co, teste de Tukey). Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO OU NÃO (Co) DOS ANIMAIS COM 30mg/kg/PV DE CETAMINA (K) POR VIA I.P, ETANOL (E) A 10% NA ÁGUA DE BEBIDA, OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS TRATAMENTOS [CETAMINA + ETANOL (KE)] POR 28 DIAS

6.6.1 Avaliação da toxicidade sistêmica dos animais tratados por 28 dias

6.6.1.1 Sinais de toxicidade, consumo total de água, ração e ganho de peso total dos animais tratados por 28 dias

Aos 28 dias de tratamento nenhum dos animais apresentou sinais de toxicidade; no entanto, apesar de não observarmos alterações no consumo total de ração dos animais (Figura 23a), foi evidenciada redução no consumo total de água dos ratos pertencentes a ambos os grupos tratados com etanol (E e KE) quando comparados com os animais do grupo Co e K (Figura 23b), e redução no ganho de peso total dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os animais do grupo Co (Figura 23c).

a)

b)

c)

Figura 23 - Consumo total de água, ração e ganho de peso total de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Não foram observadas alterações estatisticamente significantes no consumo total de ração. (b) Redução no consumo de água dos ratos pertencentes aos grupos E e KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co e K (**** $p < 0,0001$ E vs Co; *** $p < 0,001$ E vs K; **** $p < 0,0001$ KE vs Co; **** $p < 0,0001$ KE vs K; teste de Tukey). (c) Redução no ganho de peso dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os animais do grupo Co (** $p < 0,01$ KE vs Co, teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6.1.2 Parâmetros hematológicos e diferencial de leucócitos dos animais tratados por 28 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação dos parâmetros hematológicos não revelaram diferenças estatísticas, no entanto, a contagem diferencial de leucócitos revelou em ambos os grupos de animais tratados com etanol (E e KE) um aumento estatisticamente significativo no número de linfócitos (Figura 24a) e uma redução estatisticamente significativa no número de neutrófilos (Figura 24b), quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co.

Figura 24 -Diferencial de leucócitos de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Número de linfócitos aumentado em ambos os grupos de animais tratados com etanol quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (** $p < 0,01$ E vs Co; * $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Tukey). (b) Número de neutrófilos reduzido em ambos os grupos de animais tratados com etanol quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (* $p < 0,05$ E vs Co; * $p < 0,05$ KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6.1.3 Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 28 dias

Aos 28 dias de tratamento foi observado redução nos níveis de FA dos animais pertencentes aos grupos tratados com cetamina (K e KE) quando comparados com o grupo Co. (Figura 25).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (Figura 26a), redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com os grupos Co e KE (Figura 26b) e aumento nos níveis séricos de HDL de todos os animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com o grupo Co (Figura 26c).

Determinou-se também redução nos níveis séricos de glicose dos animais pertencentes aos grupos E e KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (Figura 27).

Em relação a função renal avaliada, observamos que a associação da cetamina com o etanol (KE) promoveu aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de ureia quando comparado com os animais pertencentes aos demais grupos (Co, K, e E) (Fig. 28).

Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram alterações.

Figura 25 - Fosfatase alcalina de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P. ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Observou-se que ambos os tratamentos, K e KE, promoveram redução nas concentrações de fosfatase alcalina (***p<0,001 K vs Co; **p<0,01 KE vs Co; teste de Dunn). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 26 - Perfil lipídico de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Observou-se aumento nas concentrações de colesterol nos animais pertencentes ao grupo tratado com KE quando comparados com o grupo Co (**p<0,001 KE vs Co; teste de Tukey). (b) Observou-se redução nas concentrações de triglicérides nos animais pertencentes ao grupo tratado com K quando comparados com o grupo Co e KE (*p<0,05 K vs Co; **p<0,01 K vs KE; teste de Dunn). (c) Todos os animais exibiram aumento nos níveis séricos de *High-densitylipoproteins* (HDL) quando comparados com o grupo Co (*p<0,05 K vs Co, *p<0,05 E vs Co, **p<0,01 KE vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 27 - Níveis séricos de glicose de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Observou-se redução nos níveis séricos de glicose dos animais pertencentes aos grupos E e KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co ($***p < 0,001$ E vs Co; $**p < 0,01$ KE vs Co, teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

Figura 28 - Função renal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Observou-se aumento nos níveis séricos de ureia dos animais pertencentes aos grupos KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co, K e E ($**p < 0,01$ KE vs Co; $**p < 0,01$ KE vs K; $**p < 0,01$ KE vs E, teste de Dunn). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6.1.4 Urinálise dos animais tratados por 28 dias

Os testes estatísticos empregados para avaliação da urinálise revelaram resultados estatisticamente significantes em relação a redução dos índices de pH e glicose dos animais pertencentes aos grupos tratados com etanol (E e KE) quando comparados com o grupo Co, e diferenças estatisticamente significantes em relação ao níveis de ácido ascórbico dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os ratos do grupo Co, assim como indicado na Tabela 26.

Tabela 26 - Urinálise de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	pH	Gli (mg/dl)	Asc (mg/dl)	Bil (mg/dl)	Prot (mg/dl)	Eritro (μ l)	Leuco (μ l)	Densidade (DU)
Controle (n=8)	6,9 $\pm$ 0,2 ^a	2,63 $\pm$ 0,5 ^a	0,25 $\pm$ 0,2 ^a	0,0 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 15,1	0,63 $\pm$ 0,2	0,25 $\pm$ 0,2	1006 $\pm$ 0,8
K (n=8)	6,3 $\pm$ 0,2	1,50 $\pm$ 0,5	0,75 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 11,9	0,63 $\pm$ 0,3	0,63 $\pm$ 0,4	1004 $\pm$ 0,6
E (n=8)	5,5 $\pm$ 0,2 ^b	0,63 $\pm$ 0,3 ^b	1,00 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	18,6 $\pm$ 4,4	1,0 $\pm$ 0,4	0,25 $\pm$ 0,3	1016 $\pm$ 3,5
KE (n=8)	5,8 $\pm$ 0,2 ^b	0,14 $\pm$ 0,1 ^b	1,71 $\pm$ 0,3 ^b	0,4 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,0	1,29 $\pm$ 0,5	0,57 $\pm$ 0,4	1014 $\pm$ 4,2

Gli = glicose; Asc = ácido ascórbico; Bil = bilirrubina; Prot = proteína; Hemo = hemoglobina; Eritro = eritrócitos; Leuco = leucócitos. Redução nos índices de pH (**p<0,001 E vs Co; **p<0,01 KE vs Co, teste de Tukey) e glicose (**p<0,01 E vs Co; ***p<0,001 KE vs Co, teste de Tukey) em ambos os grupos de animais tratados com etanol (E e KE) quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co. Aumento nos níveis de ácido ascórbico dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (**p<0,01 KE vs Co, teste de Tukey). Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6.1.5 Avaliações histopatológicas dos animais tratados por 28 dias

Foram observadas alterações histopatológicas no fígado e nos rins dos animais tratados por 28 dias.

A figura 29 ilustra uma amostra de tecido hepático de animal pertencente ao grupo controle (Co) (a), K (b), E (c) e KE (d). Notou-se nas amostras teciduais dos ratos pertencentes ao grupo K (b) a presença de dilatação sinusoidal (setas), que, nos animais pertencentes aos grupos E (c) e KE (d), foi acompanhada ainda de vacuolização hepatocitária (V) difusa predominantemente próxima à região da veia centrolobular (VC) e espaço porta (TP). Estas mesmas alterações foram também observadas nos animais pertencentes ao grupo KE (d), associadas à presença de áreas focais de congestão (C).

A análise histopatológica do epitélio vesical dos animais pertencentes ao grupo KE revelou a presença de edema difuso e discreta congestão na região da lâmina própria da mucosa, associado à presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear composto por macrófagos e linfócitos, localizado na camada muscular adjacente (Figura 30).

Os demais órgãos analisados não apresentaram alterações histopatológicas.

Figura 29 - Avaliação histopatológica do fígado de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Grupo controle. (b) O grupo cetamina (K) exibiu discreta dilatação sinusoidal (seta). (c) O grupo etanol (E) apresentou dilatação moderada dos sinusóides hepáticos (seta) e vacuolização dos hepatócitos (Vac). (d) O grupo KE apresentou congestão vascular moderada (Con), dilatação sinusoidal (seta) e perda da arquitetura hepática com hepatócitos degenerados contendo vacúolos pálidos (Vac) em seu citoplasma, sugerindo estágios iniciais de lesão celular. TP = trato portal; VC = veia centrolobular; seta = dilatação sinusoidal; Vac = degeneração vacuolar; Con = congestão vascular. (HE, 10x).

Figura 30 - Avaliação histopatológica da bexiga de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Observou-se na bexiga dos animais pertencentes ao grupo KE a presença de edema difuso (E) e discreta congestão (C) na região da lâmina própria da mucosa, a camada muscular adjacente exibe regiões multifocais com a presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear composto por macrófagos e linfócitos. E = edema; C = congestão vascular. (HE, 10x).

6.6.2 Avaliação dos parâmetros de imunotoxicidade dos animais tratados por 28 dias

6.6.2.1 Avaliação dos órgãos linfoides (peso relativo do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea) dos animais tratados por 28 dias

Em relação à avaliação de órgãos linfoides (peso relativo e morfometria do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea), aos 28 dias de tratamento nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos parâmetros referentes aos pesos relativos destes órgãos, porém, foi observado um aumento estatisticamente significativo na celularidade da medula óssea em ambos os grupos de animais tratados com etanol (E e KE) quando comparados com os animais do grupo Co, assim como indicado na Tabela 27.

Tabela 27 - Peso relativo e morfometria do baço e timo, e celularidades do baço e da medula óssea de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	Controle (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Baço (x10 ⁻³ g/100g de PV)	0,28 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,00
Timo (x10 ⁻³ g/100g de PV)	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Celularidade do baço (x10 ⁶ /g de baço)	203,6 ± 48,7	261,6 ± 48,8	233,0 ± 22,5	252,5 ± 29,2
Celularidade da medula óssea (x10 ⁶ células)	4,43 ± 0,3 ^a	5,56 ± 0,7	8,17 ± 1,0 ^b	7,83 ± 1,1 ^b
C/M razão	5.59 ± 0.27	5.35 ± 0.23	6.03 ± 0.22	5.53 ± 0.26
PV/PB razão	1.6 ± 0.04	1.4 ± 0.15	1.6 ± 0.13	1.5 ± 0.16

Observou-se um aumento estatisticamente significativo na celularidade da medula óssea em ambos os grupos de animais tratados com etanol (E e KE) quando comparados com os animais do grupo Co (**p<0,01 E vs Co; *p<0,05 KE vs Co; teste de Tukey). Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. PV = peso vivo. C/M razão = razão córtex/medula. PV/PB = razão polpa vermelha/polpa branca.

6.6.2.2 Avaliação da resposta imune adquirida: reação de hipersensibilidade do tipo IV (*Delayed-Type Hypersensitivity* - DTH) e avaliações dos níveis séricos de anticorpos específicos (IgM e IgG anti-KLH)

Observou-se um aumento estatisticamente significativo nos títulos de IgM anti-KLH nos animais pertencentes ao grupo K em resposta ao desafio heat-aggregated-KLH quando comparados com os animais pertencentes aos grupo KE (Figura 31a). Os demais parâmetros analisados não apresentaram alterações (Figura 31b, 31c).

Figura 31 - Reação de hipersensibilidade tardia (DTH), em mm, de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P, ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. (a) Determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-KLH do isotipo M (IgM) por meio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Observou-se aumento de IgM anti-KLH nos animais pertencentes ao grupo K quando comparados com os animais pertencentes ao grupo KE (* $p < 0,05$ K vs KE, teste de Tukey). (b) Determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-KLH do isotipo G (IgG) por meio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Não foram apresentadas alterações no título de anticorpos do isotipo G. (c) Mensuração com auxílio de paquímetro do edema de coxim plantar gerado após administração do desafio heat-aggregated-KLH. Não foram apresentadas alterações na mensuração do edema do coxim plantar dos animais. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados por 28 dias

Aos 28 dias de tratamento, em relação aos parâmetros hepáticos, observamos aumentos estatisticamente significantes na atividade das enzimas antioxidantes, sendo a GPx dos animais pertencentes ao grupo KE aumentada quando comparada com os animais pertencentes ao grupo Co; aumento da CAT dos animais pertencentes ao grupo E quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co; e elevação no conteúdo de GSSG dos animais pertencentes aos grupos experimentais (K, E e KE) quando comparados com os ratos pertencentes ao grupo Co (Tabela 28).

Em relação aos parâmetros renais, observamos aumento no conteúdo de GSSG nos animais pertencentes ao grupo E e KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (Tabela 28).

Apesar do TBARS ter sido realizado imediatamente após coleta do material biológico, uma vez que o mesmo não pode ser congelado para análises posteriores, os resultados foram infelizmente extraviados.

Tabela 28 - Parâmetros de estresse oxidativo analisados no fígado e rim [atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e conteúdo de glutathione total (tGSH) e oxidada (GSSG)] de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias.

	Controle	K	E	KE
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
Fígado				
SOD (U/mg prot)	231,3 ± 30,9	245,4 ± 20,7	316,4 ± 45,9	284,0 ± 21,5
GPx (U/mg prot)	0,68 ± 0,04 ^a	0,73 ± 0,04	0,82 ± 0,05	0,83 ± 0,03 ^b
CAT (U/mg prot)	3,75 ± 0,23 ^a	4,20 ± 0,35	5,24 ± 0,45 ^b	4,36 ± 0,24
tGSH (μM)	5,23 ± 0,68	4,30 ± 0,48	5,87 ± 0,95	5,93 ± 1,24
GSSG (μM)	0,462 ± 0,08 ^a	1,829 ± 0,09 ^b	1,583 ± 0,15 ^b	1,756 ± 0,24 ^b
Rins	(n=8)	(n=7-8)	(n=8)	(n=8)
SOD (U/mg prot)	75,3 ± 4,93	78,4 ± 5,26	72,5 ± 3,54	78,5 ± 6,59
GPx (U/mg prot)	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01
CAT (U/mg prot)	1,26 ± 0,03	1,31 ± 0,09	1,38 ± 0,12	1,20 ± 0,06
tGSH (μM)	2,68 ± 0,29	2,87 ± 0,21	2,37 ± 0,35	3,64 ± 0,48
GSSG (μM)	0,74 ± 0,19 ^a	1,14 ± 0,27	1,53 ± 0,13 ^b	1,59 ± 0,16 ^b

No fígado observamos aumento na atividade de GPx dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (*p<0,05 KE vs Co, teste de Tukey); aumento na atividade da CAT dos animais pertencentes ao grupo E quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (*p<0,05 E vs Co, teste de Tukey); aumento no conteúdo de GSSG dos animais pertencentes aos grupos K, E e KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (***p<0,001 K vs Co; *p<0,05 E vs Co; **p<0,01 KE vs Co; teste de Tukey). No rim detectamos aumento no conteúdo de GSSG dos animais pertencentes aos grupos E e KE quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (*p<0,05 E vs Co; *p<0,05 KE vs Co; teste de Tukey). Letras diferentes indicam significância estatística. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

6.6.4 Estudo neuroquímico dos animais tratados por 28 dias

Em relação aos resultados referentes à análise neuroquímica, aos 28 dias foram observados aumentos estatisticamente significantes nos níveis de neurotransmissores presentes em diferentes regiões do SNC.

Especificamente em relação à DA dos animais tratados com etanol (E), houve aumento na concentração deste neurotransmissor no hipocampo quando comparados com os animais pertencentes aos demais grupos (Co, K e KE), e no córtex pré-frontal, quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co. Ainda em relação aos animais tratados com etanol (E), evidenciou-se também, aumento na concentração de NOR presente no hipocampo, quando comparados com os animais pertencentes aos grupos Co e K (Figura 32).

Por outro lado, em relação aos animais tratados com cetamina (K), observou-se aumento na concentração de 5HT presente no hipocampo, quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co; e no córtex pré-frontal, quando comparados com os animais pertencentes aos grupos Co e KE (Figura 33).

Os demais neurotransmissores e seus metabólitos analisados não apresentaram alterações.

Figura 32 - Parâmetros neuroquímicos do hipocampo e do córtex pré-frontal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Em relação aos animais tratados com etanol, observamos no hipocampo (a) aumento nos níveis de dopamina quando comparados com os animais pertencentes aos demais grupos (Co, K e KE) (**p<0,01 E vs Co; ***p<0,001 E vs K; **p<0,01 E vs KE; teste de Tukey); bem como aumento nos níveis de noradrenalina (b) quando comparados com os animais pertencentes aos grupos Co e K (**p<0,01 E vs Co; **p<0,01 E vs K; teste de Tukey). (c) No córtex pré-frontal dos animais pertencentes ao grupo E, observamos também aumento nos níveis de dopamina quando comparados com os animais pertencentes aos grupos Co (*p<0,05 E vs Co; teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

a)

b)

Figura 33 - Parâmetros neuroquímicos do hipocampo e do córtex pré-frontal de ratos tratados ou não (Controle - Co) com 30mg/kg/PV de cetamina (K) por via I.P ou etanol (E) a 10% na água de bebida, ou a associação de ambos tratamentos [cetamina + etanol (KE)] por 28 dias. Em relação aos animais tratados com cetamina, observamos no hipocampo aumento nos níveis de serotonina (a) quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co (** $p < 0,01$ K vs Co, teste de Tukey). (b) No córtex pré-frontal dos animais pertencentes ao grupo K, observamos aumento nos níveis de serotonina quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co e KE (** $p < 0,01$ K vs Co; * $p < 0,05$ K vs KE, teste de Tukey). São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.

7 DISCUSSÃO

O uso de “polidrogas” é um fenômeno social atual de grande importância em saúde pública (LANKENAU; CLATTS, 2005; ENGLEMAN; RODD; MURPHY, 2008), uma vez que o consumo associado dessas substâncias pode resultar, não somente em significativos efeitos adversos decorrentes de seu uso (COFFIN et al., 2003; COFFIN; SHERMAN; CURTIS, 2010), como também, culminar no desenvolvimento de processos de dependência química (PETERS, DAVIES; RICHARDSON, 1998; MORGAN; CURRAN, 2011; EMCDDA, 2002).

O uso abusivo e recreacional do etanol (KRYSTAL et al., 1998; KENNA; LEWIS, 2008; ACMD, 2013), geralmente é realizado em associação a um grupo heterogêneo de substâncias químicas ilícitas conhecidas como “*club drugs*”, que encontram-se em constante inovação, destacando-se, dentre estas, a cetamina, uma substância originalmente sintetizada para ser utilizada como anestésico; porém, devido ao seu potencial efeito alucinógeno vem sendo empregada para fins ilícitos (WHO, 2006, KENNA; LEWIS, 2008; ACMD, 2013)

Sabendo-se das ações centrais (CHAN et al., 2011), imunomodulatórias (MOLINA et al., 2010; DeKOCK; LOIX; LAVAND’HOMME, 2013;) e oxidantes (BOVERIS et al., 1997; GIAVAROTTI et al., 2002; DeKOCK; LOIX; LAVAND’HOMME, 2013) desencadeadas pelo uso isolado da cetamina, bem como do etanol, o uso de ambas pode agir de forma aditiva, sinérgica ou mesmo potencializar a ocorrência de efeitos adversos em seus sítios de ação (CHAN et al., 2011).

Apesar de vários estudos serem realizados com a finalidade de determinar os possíveis efeitos ocasionados pelo uso isolado dessas drogas, poucos são os relatos científicos conduzidos visando determinar os efeitos provenientes do uso associado das mesmas. Assim, no presente estudo, tentou-se estabelecer um cenário de exposição à ambas as drogas isoladamente ou em associação, semelhante ao que ocorre em clubes e/ou festas.

O padrão de uso recreacional de diferentes drogas de abuso, de forma associada ou não, de um modo geral, refere-se a usuários não dependentes cujo uso é confinado predominantemente aos finais de semana, no ambiente de festas, clubes e/ou *raves* (WOLFF; WINSTOCK, 2006; MORGAN; CURRAN, 2011; UNODC, 2017), e envolvendo usuários geralmente do sexo masculino, com uma faixa etária predominantemente variável entre 18 a 25 anos (LANKENAU; CLATTS, 2005; MORGAN; MUETZELFELDT; CURRAN, 2009; KALSI; WOOD; DARGAN, 2011; UOSUKAINEN; TACKE; WINSTOCK, 2015). As típicas doses recreacionais utilizadas da cetamina podem variar de 50 à 300 mg, dependendo

da via de administração, que pode ser intravenosa, intramuscular, oral, retal e/ou nasal (JANSEN, 2000; KALSI; WOOD; DARGAN, 2011).

Os ratos, por sua vez, atingem a maturidade sexual em média aos 40 dias de vida (ADAMS; BOICE, 1983; KOHN; CLIFFORD, 2002; SENGUPTA, 2012) e, no ser humano o início dessa fase corresponde em média à aproximadamente 12 anos de idade (ANDREOLLO et al., 2012; SENGUPTA, 2013). Considerando isso, estabelecemos para uso em nossos experimentos ratos com 60 dias de vida, o que corresponde, analogamente, ao início da idade adulta em seres humanos (a partir de 18 anos de idade), e abrange a faixa etária mais comumente susceptível e propensa a iniciar o uso de drogas (LANKENAU; CLATTS, 2005; MORGAN; MUETZELFELDT; CURRAN, 2009; KALSI; WOOD; DARGAN, 2011; UOSUKAINEN; TACKE; WINSTOCK, 2015).

Uma metodologia geralmente utilizada em modelos animais para a avaliação, principalmente dos efeitos do etanol é o *binge drinking model*. Este modelo visa mimetizar o uso compulsivo de etanol por seres humanos que corresponde à ingestão, no período de 2 horas, de 5 ou mais doses de etanol em uma única ocasião para homens, e 4 ou mais doses de etanol em uma única ocasião para mulheres (NIAAA, 2004); condição necessária para promover a elevação da concentração sanguínea alcoólica a valores iguais ou maiores que 0,08g de álcool/100mL de sangue (ANDRADE; DUARTE; OLIVEIRA, 2010), culminando para dependência física e dano cerebral e hepático resultante da ingestão de etanol (MAJCHROWICZ, 1975; COLLINS; ZOU; NEAFSEY, 1998; KNAPP; CREWS, 1999). No entanto, este estudo não foca apenas no uso recreacional do etanol e/ou a cetamina, e sim no estudo dos possíveis efeitos tóxicos e/ou imunotóxicos que podem ser decorrentes do uso prolongado destas substâncias, podendo ocorrer tanto em pacientes que fazem uso terapêutico da cetamina para o tratamento de depressão; ou mesmo devido ao seu uso, de forma associada ao etanol ou não, por profissionais de saúde.

Para isso, resolveu-se utilizar protocolos de avaliação de toxicidade estabelecidos por algumas agências regulamentadoras/normatizadoras como a OECD, que com a finalidade de padronizar protocolos toxicológicos em todo o mundo para avaliação da toxicidade de uma substância química, propõe alguns modelos de estudo *in vivo* a serem empregados durante 28 dias consecutivos, utilizando preferencialmente ratos de ambos os sexos. No entanto, o presente trabalho não somente visou avaliar a atividade tóxica destas drogas, associadas ou não, como também avaliar o potencial imunotóxico das mesmas; assim, para evitar a possível influência de hormônios femininos, como o estrógeno, sabidamente com atividade imunomodulatória (LANG, 2004; WALKER, 2011), decidimo utilizar apenas ratos machos em nossos estudos.

Assim, em um primeiro momento, para a determinação da concentração de cetamina e da dose de etanol a ser empregada nestes estudos, baseamo-nos em trabalhos prévios de diferentes pesquisadores (GARCIA et al. 2009; REZIN et al., 2009; RÉUS et al., 2015), que tiveram como objetivo comum, não avaliar a toxicidade, mas sim o potencial antidepressivo da cetamina em diferentes modelos de estresse crônico em ratos, sendo a dose 15mg/kg capaz de promover efeitos biológicos restabelecendo diferentes parâmetros alterados por tais modelos, como o retorno do consumo de ração, normalização dos níveis circulantes de corticosterona e do hormônio adrenocorticotrófico (GARCIA et al. 2009) e, principalmente, a redução dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, comum em pacientes deprimidos (RÉUS et al., 2015), evidenciando assim, o potencial imunomodulador da dose.

Para a determinação da dose de etanol a ser empregada, uma busca na literatura mostrou diferentes estudos com os mais variados modelos, inclusive o *binge drinking*, e doses com diferentes objetivos, evidenciando uma falta de padronização no tratamento que de fato mimetize o consumo por usuários de forma contínua. Assim, há sugestões de modelo com a administração pela água de bebida (BOSMA et al., 1988; KUZMIN et al., 2012; BAPTISTA et al., 2013); administração parenteral (NELSON; BAGBY; SUMMER, 1989; Greenberg et al., 1999) que foge ao escopo deste trabalho e, finalmente, estudos com administração por gavagem (JERRELLS et al., 1986; ABADIE-GUEDES; GUEDES; BEZERRA, 2012), o que, em princípio, seria o mais adequado para este trabalho.

Wong et al. (2012) e Wai et al. (2012) basearam a dose de etanol a ser empregada em seus estudos, naquela usualmente utilizada por apreciadores de vinho (teor alcoólico $\approx 12\%$), sendo o cálculo destes pesquisadores realizado sobre a ingestão de 500mL de vinho por dia, por um indivíduo adulto, o que resultaria em camundongos (peso vivo $\approx 30g$), na dose de 0,5mL de uma solução a 10% de etanol. Porém, as bebidas alcoólicas mais prevalentemente consumidas pelos frequentadores de clubes e/ou festas *raves* são aquelas capazes de apresentar alto teor alcoólico mesmo em uma única dose (os designados *spirit drinks* como: *whisky* e/ou *vodka*), além da possibilidade de serem consumidas de forma associada a outros tipos de bebidas não alcoólicas, como refrigerantes e energéticos, afim de proporcionar um sabor mais palatável (MACIEIRA et al., 1997; MILLER et al., 2006; KUNTSCHE et al., 2006; MMWR, 2007; POPOVA et al., 2007).

Assim, com base nestes estudos, decidiu-se por empregar a mesma extrapolação matemática do conteúdo de etanol presente no vinho, para a concentração presente nos destilados, que varia entre 40 a 60% do volume, em doses de 40mL a indivíduos de 60kg de peso vivo (ANVISA, 2009). Assim, utilizando um valor médio do teor alcoólico do *whisky* a

50%, uma dose desta bebida (40mL) equivaleria ao consumo de 0,27g/kg de etanol. Desta forma, inicialmente decidimos empregar em nossos experimentos, a dose de 1 mL de uma solução de etanol a 10% a ratos de aproximadamente 250g, o que equivaleria a 0,32g/kg de etanol, valor este próximo ao supostamente ingerido por usuários.

Ainda, para determinar o melhor período de exposição dos animais, inicialmente foi delineado um primeiro experimento, no qual foram estabelecidas cinco diferentes durações de tratamento (3, 7, 14, 21 e 28 dias) realizadas isoladamente e de forma consecutiva, não ultrapassando o período máximo de 28 dias, período este preconizado pela OECD (OECD, 2008).

A partir da avaliação dos resultados destes experimentos preliminares evidenciamos que as concentrações e doses empregadas (1mL de etanol a 10% via gavagem e 15mg/kg de cetamina via I.P) isoladamente ou em associação, não foram capazes de promover alterações no consumo de água, ração ou ganho de peso dos animais, porém, em outros parâmetros avaliados, como na bioquímica sérica, no estresse oxidativo e também nos parâmetros imunes, observou-se resultados indicativos de possíveis efeitos tóxicos das drogas. Assim, para o melhor entendimento destes resultados, delineou-se um segundo experimento, empregando doses maiores e por outras formas de administração o que possibilitou averiguar de fato, a pertinência dos resultados obtidos na primeira fase de experimentação, dados estes que serão discutidos em conjunto neste trabalho. Para esta segunda fase, foi estabelecida a administração I.P de 30mg/kg de cetamina (VERMA; MOGHADDAM, 1996; BECKER et al., 2003; HAYASE; YAMAMOTO; YAMAMOTO, 2006; CAMPOS; SANTOS;RAO, 2006) e/ou etanol a 10% na água de bebida, forma esta bastante empregada por vários pesquisadores para diferentes fins, e que também pode minimizar um efeito ulcerativo gástrico de altas concentrações de etanol via gavagem (PRASAD et al., 1985; FATACCIOLI et al., 1999; AGUIAR; DA-SILVA; BOAVENTURA, 2004; MOMENI; ROMAN, 2014) por um período de 28 dias.

Raros são os estudos realizados com o etanol e a cetamina, em associação ou não, que determinam o consumo de ração e ganho de peso dos animais, fato este importante para o entendimento de possíveis efeitos tóxicos, imunotóxicos e também do estresse oxidativo. De fato, sabe-se que deficiências nutricionais podem refletir em alterações relacionadas aos parâmetros imunológicos, como, por exemplo, peso relativo do timo (CHANDRA, 1992; PRENTICE, 1999), maior susceptibilidade a inflamações crônicas e infecções recorrentes (BOURKE et al., 2016), e também relacionados ao estresse oxidativo, podendo levar à peroxidação lipídica e outras alterações relacionadas às ROS decorrente do menor aporte mineral e vitamínico (KODENTSOVA et al., 2013).

As concentrações e doses iniciais empregadas (15mg/kg de cetamina via I.P e/ou 1mL de etanol a 10% via gavagem), quando em associação ou não, foram incapazes de promover alterações no consumo de água, ração ou ganho de peso dos animais durante os diferentes períodos de duração de tratamento. De fato, em um estudo realizado por Fataccioli et al. (1999) em ratos tratados somente com etanol a 10% na água de bebida por 28 dias, não foi observada qualquer alteração nestes parâmetros. Ainda, no estudo de Rofael et al. (2004), o qual avaliou por 7 dias os efeitos da cetamina (100mg/kg), por via oral, associada ou não à cocaína em ratos, verificou-se que a cetamina sozinha também não promoveu alterações nestes parâmetros, corroborando com os dados aqui obtidos. Sabe-se que a associação da xilazina com a cetamina pode promover um efeito anorexígeno em animais submetidos a este protocolo anestésico de forma transiente (WARREN et al., 1984; VAN DER EEMS; BROWN, 1986); no entanto, vale lembrar que a xilazina *per se*, possui ação direta sobre a classe de receptores α -adrenérgicos, inclusive $\alpha 1$ -adrenérgico, relacionado ao centro da fome (DOCHERTY; MCGRATH, 1980).

No entanto, o etanol é uma fonte calórica, sendo seu consumo inclusive relacionado ao ganho de peso e a ocorrência de obesidade em humanos (SUTER, 2005). Por outro lado, o consumo crônico de valores substanciais, pode levar à perda de peso, devido à substituição isocalórica de carboidratos por etanol (LIEBER, 1991a). Porém, por meio de tabelas de valores nutricionais de alimentos e bebidas disponíveis, a dose de 1mL de etanol a 10% empregada nesta fase de nossos estudos possuía uma média de 97 calorias/dia, valores não suficientes para promover efeito sobre o consumo de ração e ganho de peso (LARUE-ACHAGIOTIS et al., 1992), considerando também que os demais parâmetros nutricionais da ração estavam balanceados (HORIO, et al., 1958).

Assim sendo, quando as doses e as concentrações utilizadas nos tratamentos por 28 dias foram aumentadas (30mg/kg de cetamina via I.P e/ou etanol a 10% na água de bebida), ocorreu um fato que chamou a atenção neste estudo em que o etanol foi veiculado na água de bebida, o qual está relacionado ao próprio consumo total de água pelos diferentes grupos. Vale ressaltar no momento que, para evitar a possível diminuição da palatabilidade ocasionada pela adição do etanol na água de bebida, foi adicionado à mesma, 10% de açúcar para todos os grupos de animais, conforme sugerido por outros autores (SAMSON, 1986; SAMSON; FILES; BRICE, 1996), evitando assim outra variável experimental. Porém, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa nos valores do consumo de água de bebida pelos grupos expostos ao etanol quando comparados àqueles grupos não expostos a esta droga. Por outro lado, devido à menor ingesta de água, imaginar-se-ia, um menor consumo de ração por estes animais, corroborando com estudos que indicam uma correlação entre consumo de ração e consumo de

água (ULMAN; COMPTON; KOCHANNEK, 2008). Assim, é possível supor que na verdade, o fenômeno aqui observado, não está relacionado à diminuição no consumo de água pelos animais tratados com etanol, mas sim um aumento no consumo da bebida adocicada pelos animais não expostos ao álcool, uma vez que estudos indicam que roedores possuem um paladar mais acurado para substâncias adocicadas em detrimento à substâncias amargas (KIEFER; DOPP, 1989; BICE; KIEFER, 1990; NICHOLS et al., 1992).

Adicionalmente aos dados discutidos até o momento, em relação ao consumo de água/ração, apenas os animais expostos à cetamina e ao etanol (grupo KE) apresentaram um menor ganho de peso quando comparados ao grupo controle. Trabalhos realizados por diferentes pesquisadores indicam que a ação de neurotransmissores e outras substâncias sobre receptores do tipo NMDA podem modular o comportamento alimentar dos animais, uma vez que estes participam na regulação central do apetite, interferindo assim na ingestão de alimentos (POPIK et al., 2011; WU et al., 2012) e redução no ganho de peso. Por sua vez, o etanol também é capaz de alterar o ganho de peso dos animais, uma vez que interfere com a absorção e síntese de nutrientes essenciais ao organismo, levando a deficiências nutricionais e vitamínicas, resultando em má digestão ou menor aporte nutricional (LIEBER, 1991a; LIEBER, 2000; AGUIAR; DA-SILVA; BOAVENTURA, 2004), além de ocasionar alterações metabólicas, elevando a queima calórica decorrente do gasto energético dissipado na forma de termogênese (LIEBER; JONES; DeCARLI, 1965; AGUIAR; DA-SILVA; BOAVENTURA, 2004). Isto posto, é possível levantar a hipótese de que a associação de cetamina com o etanol promovam nos animais um efeito sinérgico sobre o peso dos mesmos, uma vez que, isoladamente estas substâncias não foram capazes de promover esta perda de peso.

Sabe-se que o uso recreativo crônico de cetamina em humanos é capaz de promover cistite hemorrágica associada à inflamação crônica e ulceração urotelial (BAKER et al., 2013); no entanto, a patogenia deste fenômeno ainda não é totalmente elucidada. Na primeira fase experimental, os resultados histopatológicos e provenientes da urinálise não foram capazes de evidenciar qualquer alteração significativa que denotasse em lesão vesical, mostrando que as doses ou período de exposição empregados não foram suficientes para promover tal efeito.

Já com os tratamentos com 30mg/kg de cetamina via I.P e/ou etanol a 10% adicionado à água de bebida, dentre os parâmetros urinários, verificou-se redução nos índices do pH dos animais pertencentes aos grupos tratados com etanol, associado ou não à cetamina quando comparados com os animais do grupo Co. Uma possível explicação para tal alteração relaciona-se aos metabólitos resultantes do processo de biotransformação do etanol que podem contribuir para a acidificação da urina (ADEWALE; IFUDU, 2014). Corrobora esta assertiva, os estudos

realizados por Kwon et al. (2014) em humanos, no qual a administração de etanol em jejum promoveu a acidificação da urina e também, elevação sérica de acetaldeído uma hora após ingestão de etanol. Foi sugerido também por Eggleton (1946) que a ingestão crônica de etanol pode ocasionar aumento da acidez da urina devido a excreção contínua do ácido acético, produto final resultante de seu processo de biotransformação hepática.

Em relação a glicose urinária, foi observada uma redução nos níveis deste açúcar nos animais tratados com etanol, associado ou não à cetamina em relação ao grupo Co. Sabe-se que resultados sobre a presença de glicose na urina refletem geralmente os níveis séricos de açúcar e de fato, a glicemia dos animais tratados com o etanol neste estudo estava reduzida. Isto posto, vale ressaltar que a cetamina possui ação dupla sobre a glicemia, podendo agir como hiperglicemiante ao atuar como agonista sobre receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos, inibindo assim a secreção de insulina e; efeito hipoglicemiante, ao atuar sobre os receptores opioides do tipo μ , potencializam a resposta de β -adrenoceptores sobre a secreção de insulina, aumentando-a (HIROSE et al., 1993; SHARIF; ABOUAZRA, 2009). Considerando isso, os efeitos glicêmicos não são considerados efeitos marcantes proveniente da administração de cetamina. Por outro lado, o processo de biotransformação do etanol envolve sucessivas oxidações dependentes da presença de NAD^+ resultando em um aumento da razão $NAD^+/NADH$ (Rang et al., 2004), sabendo que a via gliconeogênica também ocorre no fígado e é igualmente dependente dos níveis de NAD^+ disponíveis, portanto, o aumento dessa razão ($NAD^+/NADH$) promovido pelo consumo de etanol, diminui a capacidade de funcionamento desta via resultando em hipoglicemia (HAMMERSTEDT et al., 2011; KANDI et al., 2014a; KANDI et al., 2014b).

Foi observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de ácido ascórbico dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os animais do grupo Co. O ácido ascórbico ou vitamina C é um importante agente antioxidante redutor que atua como cofator em diversas reações enzimáticas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). É sabido que, diferentemente de outros mamíferos como humanos e primatas, roedores são capazes de sintetizar o ácido ascórbico por meio da presença de enzimas hepáticas da classe das gulonolactonas oxidases, que convertem glicose a ácido ascórbico (JACKEL, 1950; GABBAY et al., 2010). Em adição ao anteriormente discutido, é também possível conjecturar que, pelo fato da glicose ser um substrato para formação de ácido ascórbico em roedores (JACKEL, 1950), a redução nos níveis séricos e urinários de glicose no presente estudo pode ter relação com a maior produção de ácido ascórbico, concomitantemente observada nestes animais.

É amplamente conhecido que o consumo crônico de etanol promove efeito hepatotóxico com consequente desenvolvimento de cirrose. Um dos mecanismos tóxicos está relacionado

aos próprios produtos originados de sua via de biotransformação envolvendo as enzimas ADH e ALDH que podem induzir a síntese de colágeno por fibroblastos, culminando em fibrose hepática (LIEBER, 2000). De fato, sabe-se que um dos produtos de biotransformação pela ADH é o NADH, que pode comprometer a atividade redox das células, contribuindo para alterações no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas hepáticas; já a ALDH gera acetato responsável por causar depleção de glutatona e consequente promover a peroxidação lipídica dos hepatócitos; além disso, o processo de oxidação do etanol por ação do sistema específico do citocromo P450 (CYP2E1), é capaz de promover o catabolismo de vitaminas levando a deficiências nutricionais, influenciando na toxicidade promovida pela ingestão crônica dessa substância (LIEBER, 1991b).

A cetamina, por outro lado, pode ser biotransformada por variadas isoformas do sistema CYP, as quais variam de espécie para espécie (MÖSSNER et al., 2011). Porém, não há relatos de possível efeito hepatotóxico da mesma, exceto em casos de administração de doses elevadas por infusão para tratamento agudo de pacientes com dor crônica (NOPPERS et al., 2011).

No entanto, em ambas as fases experimentais e durante todos os períodos de tratamento, foi possível verificar que os níveis séricos de FA estavam diminuídos entre todos os animais tratados com a cetamina (K e KE); porém, o mesmo não foi observado no grupo de animais expostos somente ao etanol, quando comparados com aqueles do grupo Co.

Diferentemente das enzimas de função hepática, a ALT e a AST, a FA não é um marcador específico de hepatotoxicidade. A FA é uma enzima inespecífica que pode ser resultante da somatória da atividade de quatro isoenzimas provenientes de órgãos diferentes: o fígado, os rins, os ossos e os intestinos (MADSEN; TUBA, 1952; HOFFMANN et al., 1994). Assim, efeitos tóxicos sobre o fígado ou mesmo o processo de crescimento ósseo (GOTARDO et al., 2014) podem levar a um aumento sérico dos níveis desta enzima. Porém, a diminuição dos níveis séricos de FA apenas naqueles animais expostos à cetamina é de difícil explicação neste momento. De fato, Bennett et al. (1992) em macacos expostos à cetamina e González Gil et al. (2003) em coelhos também expostos a esta droga, evidenciaram uma redução estatisticamente significativa nos níveis de FA após serem submetidos a tratamento agudo com cetamina, porém estes autores não sugerem nenhuma possível explicação para este resultado.

Sabe-se, porém, que a diminuição da FA pode ser decorrente da privação de vitamina B6 (NARISAWA; WENNERBERG; MILLÁN, 2001), do ácido fólico e de menor absorção de vitamina E (FARROKHIFAR et al., 2013) e que, nos ratos, a principal isoforma circulante de FA é a isoenzima intestinal e não a hepática (HOFFMAN et al., 1999); no entanto, embora a redução sérica deste parâmetro possa ser um indicador relacionado com um possível

comprometimento nutricional decorrente de uma menor ingestão de alimentos, restrição alimentar e/ou estados de jejum, ainda não foi possível estabelecer uma conexão e uma explicação clara para tal alteração. Como já descrito anteriormente, nossos animais não apresentaram qualquer diminuição na ingesta de alimentos que pudesse sugerir tal causa para o decréscimo nos níveis de FA sérica evidenciados, não sendo possível, portanto, lançar qualquer hipótese acerca deste fenômeno considerando ainda que, os pesquisadores que encontraram estes mesmos resultados em espécies distintas da nossa, também não inferem qualquer teoria para o fato.

Em relação ao perfil lipídico dos animais, em todas as fases experimentais e durante todos os períodos de tratamento, foi observado um aumento nos níveis séricos de colesterol dos animais pertencentes ao grupo KE quando comparados com os do grupo Co. Em relação aos níveis séricos de triglicérides, somente os animais do grupo K revelaram uma redução estatisticamente significativa neste parâmetro quando comparados com os animais dos grupos Co e KE. Além disso, os animais de todos os grupos experimentais (K, E e KE) exibiram aumento dos índices séricos de HDL quando comparados com os animais do grupo Co.

É sabido que, o consumo crônico de etanol pode resultar em alterações hepáticas que são associadas ou iniciadas a partir da desregulação do metabolismo hepático de lipídeos (WANG; YAO; SONG, 2010), sendo comum a ocorrência de aumento nos níveis de HDL (FEINMAN; LIEBER, 1999, RIMM et al., 1999), colesterol (DeCARLI; LIEBER, 1967; LEFÈVRE; DeCARLI; LIEBER, 1972) e triglicérides (LIEBER; PIGNON, 1989; LIEBER, 1991).

As interações do etanol com o metabolismo de lipídios são múltiplas e complexas. O aumento da lipogênese associado ao consumo de etanol pode ser explicado devido ao seu processo de biotransformação que promove aumento da razão NAD^+/NADH . O aumento da presença de NADH e sua capacidade de doar íons H^+ interfere na atividade da enzima alfa-glicerofosfato, promovendo aumento de sua atividade que consiste em reagir e capturar ácidos graxos, acumulando-os no fígado e convertendo-os à triglicerídeos (LIEBER; PIGNON, 1989; LIEBER, 1991).

O consumo de etanol também estimula os microssomas hepáticos, onde estão localizados os retículos endoplasmáticos lisos que compreendem um sistema microssomal responsável pela oxidação do etanol (LIEBER; DeCARLI, 1970), sendo assim, o consumo dessa substância favorece o aumento na atividade das enzimas dos retículos envolvidas na síntese de lipoproteínas, como o HDL (LIEBER, 1984), e também a síntese de colesterol (BUCHER; McGARRAHAN, 1956; SIPERSTEIN; FAGAN, 1966).

O consumo de etanol além de promover aumento da colesterogênese no fígado, também diminui a degradação do colesterol a ácidos biliares, e a consequente excreção destes ácidos biliares (LEFÈVRE; DeCARLI; LIEBER, 1972); uma vez que, atuando diretamente sobre os hepatócitos, além de induzir um sistema microsomal enzimático responsável pela sua oxidação, o etanol é capaz também de inibir algumas enzimas hepáticas (RUBIN; LIEBER, 1967) como a 7-alfa-hidroxilase, envolvida no catabolismo do colesterol à ácidos biliares (SHEFER; HAUSER; MOSBACH, 1968), favorecendo, assim, o acúmulo hepático de colesterol (LEFÈVRE; DeCARLI; LIEBER, 1972).

Sabe-se que a administração de cetamina é capaz também de promover aumento nos níveis séricos de colesterol (VAN DER MERWE et al., 1987; ROVIROSA-HERNÁNDEZ et al., 2011) e alterações nos níveis séricos de triglicérides (YOSHIDA et al., 1986; GONZÁLEZ GIL et al., 2004) e HDL (PERUMAL et al., 2007). Estudos realizados em diferentes espécies de macacos expostos à cetamina, promoveram, ora aumento de colesterol e triglicérides em *Macaca fascicularis* (KIM et al., 2005), ora efeito contrário em *Macaca radiata* (VENKATESAN et al., 2006), sendo possível sugerir assim que o tratamento com cetamina e/ou etanol pode promover efeitos sinérgicos ou mesmo antagônicos sobre diferentes marcadores lipídicos séricos, embora não seja possível ainda estabelecer exatamente por quais vias metabólicas essas alterações ocorrem.

A avaliação da função renal ocorre por meio da mensuração da concentração sérica de alguns biomarcadores considerados produtos residuais do metabolismo de proteínas (GUYTON, 1992). Tanto a ureia, que é sintetizada no interior das mitocôndrias no fígado, a partir da desaminação oxidativa dos grupos amino presentes nos aminoácidos e amônia, consistindo no produto final do metabolismo de nitrogênio e o principal produto do metabolismo protéico; quanto a creatinina, produto de degradação da fosfocreatina, consistindo no catabólito final do metabolismo muscular (GOWDA et al., 2010); possuem excreção renal e são alguns dos biomarcadores que devem ser considerados primordialmente na avaliação da taxa de filtração glomerular e investigação da função renal, auxiliando no diagnóstico de doenças renais (DRAIBE, CENDOROGLO; 2001).

Os resultados referentes a função renal, aos 28 dias de tratamento em nossa primeira fase experimental, evidenciaram que a cetamina em associação com o etanol (KE) promoveu aumento nos níveis de ureia e creatinina quando comparados apenas ao tratamento com a cetamina (K). De fato, um estudo realizado por Gvozdenovic et al. (1993) em cães expostos a cetamina e também ao etanol a 12% em água de bebida por 30 dias revelaram que a creatinina também se encontrava elevada nestes animais, não tendo sido, no entanto, observado qualquer

efeito sobre os níveis de ureia, o que não caracteriza assim, lesão renal. A cetamina é uma droga anestésica de escolha para ser utilizada em cirurgias de pacientes que apresentam algum risco de doença renal, visto que não é capaz de ocasionar efeitos deletérios aos rins (REZENDE; MAMA, 2015). No caso do etanol, estudos reportam que o seu consumo crônico pode elevar significativamente os níveis séricos de ureia e creatinina, assim como foi observado por Das et al. (2008), em ratos expostos ao etanol (1,6 g/kg/PV/dia) por 12 semanas.

Aos 28 dias de tratamento, em nossa segunda fase experimental, os efeitos resultantes do tratamento com a cetamina associada ao etanol (KE) sobre os parâmetros renais foram ainda mais evidentes considerando que os animais exibiram aumento nos níveis de ureia quando comparados com os animais dos grupos experimentais (K e E) e Co.

Alterações nos níveis séricos de ureia podem estar relacionadas a alterações no catabolismo proteico, síntese protéica ou ambos (FOX, 1989). Segundo Epstein (1997), os níveis séricos de ureia em pacientes que fazem uso crônico de etanol, podem apresentar-se elevados, no entanto, raramente ao grau evidenciado em pacientes que possuem insuficiência renal. Mirzaei; Mirzaei e Alamdari (2015) determinaram que a administração de 1,6 mL/kg/dia de etanol por 12 semanas a ratos da linhagem Wistar foi capaz de promover lesões renais indicadas pelo aumento concomitante nos níveis séricos de ureia e creatinina destes animais, quando comparados com os animais pertencentes ao grupo controle.

A coenzima NAD^+ é necessária no processo de desaminação oxidativa dos aminoácidos para síntese de amônia; no entanto, a depleção nos níveis de NAD^+ ocasionada durante o processo de oxidação do etanol pode promover redução da formação de amônia e, consequentemente, comprometer a síntese de ureia (JENSEN et al., 1991; KREBS; HEMS; LUND, 1973). No entanto, além de interferir com a síntese de amônia, o consumo de etanol também é capaz de comprometer a integridade das membranas dos hepatócitos, interferindo na permeabilidade e no transporte de aminoácidos (ROSA; RUBIN, 1980). Considerando isso, a ingestão crônica de etanol, por si só, não é considerada nefrotóxica, porém, quando associada a danos hepáticos induzidos pelo consumo de etanol que culminam para o comprometimento da síntese proteica, seus metabólitos e, comprometimento da capacidade da biossíntese hepática representada por alteração dos níveis séricos de ureia, pode ser considerada um fator determinante para a ocorrência concomitante de lesões renais (MAJUMDAR et al., 1982).

Sabe-se que, em cães, a cetamina é capaz de ocasionar redução no fluxo sanguíneo da região cortical dos rins e, consequentemente, diminuir a taxa de filtração glomerular (HIRASAWA; YONEZAWA, 1975), reduzindo assim, a produção de urina e aumentando os níveis séricos de ureia e creatinina (GONZÁLEZ GIL et al., 2003). González Gil et al. (2003),

e Mavadati, Habibian e Denghani (2011) também observaram aumento nos níveis séricos de ureia após a administração de cetamina associada à xilazina em coelhos; no entanto, este pareceu ser um efeito de curto prazo sobre a função renal, visto que, os níveis séricos destes biomarcadores retornaram a normalidade em menos de 24 horas após a administração.

Considerando que o etanol é capaz de interferir nos processos hepáticos envolvidos no metabolismo de proteínas e consequente síntese de ureia e creatinina, e que a administração contínua de cetamina pode comprometer a função dos rins, podemos sugerir que a administração à longo prazo de ambas às drogas de forma associada, representa um risco em potencial para o comprometimento da função renal.

A proteção antioxidante é conferida por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, sendo assim, um aumento na produção de ROS pode promover uma maior atividade deste mecanismo de proteção que visa normalizar os níveis destas espécies reativas, caso contrário, o dano oxidativo pode ocorrer (SIES, 2015). A produção de ROS é um processo normal resultante do metabolismo de qualquer célula do organismo; porém, a biotransformação de xenobióticos, entre outros processos fisiológicos, pode promover uma maior produção destas espécies, tornando o fígado um alvo importante para estudos toxicológicos relacionados ao estresse oxidativo. No entanto, outros órgãos também podem ser afetados, como o SNC (PATEL, 2016; SALIM, 2017), rins (DAS et al., 2008; NIE; HOU, 2012), entre outros. Dados da literatura mostram que tanto a cetamina (KAWASAKI et al., 1999) como o etanol (GIAVAROTTI et al., 2002) são capazes de romper com o equilíbrio oxidativo em modelos experimentais, embora os resultados possam variar de acordo com as doses e períodos de tratamento.

Nos animais tratados com 15mg/kg de cetamina via I.P e 1mL de etanol a 10% via gavagem por 3, 7, 14, 21 e 28 dias de tratamento, foram analisados parâmetros de estresse oxidativo no fígado, nos rins e na bexiga em relação às atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), conteúdo de glutatona total e oxidada (tGSH e GSSG) e peroxidação lipídica (TBARS). A maioria dos resultados estatisticamente significantes observados referem-se aos parâmetros analisados no fígado, visto que este é o órgão responsável em grande parte pela biotransformação tanto da cetamina quanto do etanol, decorrente da ação de enzimas hepáticas pertencentes ao citocromo P450, resultando em um processo fisiológico que culmina na produção de ROS (KOHR; DURIEUX, 1998; MENEGUZ et al., 1999; KNOBLOCH et al., 2006).

Em relação aos parâmetros avaliados nos tecidos hepáticos dos animais, logo no início do período de tratamento, aos 3 dias, foi verificado aumento dos níveis de TBARS no fígado,

evidenciando o aumento estatisticamente significativo da peroxidação lipídica neste órgão, ocasionada pela administração de cetamina isoladamente quando comparada com o grupo Co. Esses resultados corroboram estudos previamente realizados por Abdel-Salam et al. (2015) que demonstraram que uma única dose aguda e subcutânea de cetamina (15 ou 30 mg/kg) foi capaz de aumentar o potencial peroxidativo no fígado de ratos 4 horas após sua administração.

Aos 21 dias de tratamento houve também aumento do potencial peroxidativo no grupo de animais que receberam a associação de tratamentos (KE) quando comparados com o grupo Co e E, indicando que, possivelmente, a cetamina é a principal responsável por este aumento sem a participação do etanol na dose estudada. Venâncio et al. (2013) em seus estudos com a administração subcutânea de cetamina (5 e 10 mg/kg) sugerem que após 14 dias de tratamento ocorra disfunção do complexo I mitocondrial, que consiste na primeira enzima da cadeia respiratória responsável por desempenhar um papel central na fosforilação oxidativa (EFREMOV; BARADARAN; SAZANOV, 2010), desencadeando assim um aumento da geração de ROS culminando para o desenvolvimento de estresse oxidativo e o processo de lipoperoxidação. Considerando isso, é possível que o aumento no TBARS evidenciado aos 21 dias no presente estudo possa ser um indicativo deste efeito mitocondrial.

Sabe-se que a administração de xenobióticos pode resultar em estresse oxidativo, principalmente nos períodos iniciais do tratamento; no entanto, após períodos prolongados de tratamento, fisiologicamente pode ocorrer um processo adaptativo e, consequentemente, estes marcadores de estresse oxidativo podem não mais ser detectados (ROFAEL, 2004; VENÂNCIO et al., 2013).

Assim como evidenciado em nossos estudos, ao observarmos o comportamento dos parâmetros antioxidantes durante os períodos de tratamento, notamos que o aumento do potencial peroxidativo no fígado detectado aos 3 e 21 dias de tratamento, foi acompanhado por uma tendência, apesar de não significativa, do aumento da atividade da SOD e da CAT em relação ao grupo Co. Com o evoluir do tratamento por tempo maior, a peroxidação lipídica hepática não mais foi observada entre os animais tratados com a cetamina e/ou etanol quando comparados com os do grupo Co. Conjuntamente, estes dados podem indicar a ocorrência de uma possível resposta hepática em busca do equilíbrio entre a produção de espécies pró-oxidantes e a mobilização de suas defesas antioxidantes. De fato, Miyazaki et al (1989) em um estudo *in vitro* notou que, após uma semana em incubadora junto a uma solução contendo cetamina 1 mM, hepatócitos de ratos apresentaram estabilização em suas membranas e redução da produção de ROS pela mitocôndria, resultando na normalização dos valores referentes aos parâmetros de estresse oxidativo.

De fato, aos 28 dias de tratamento, notou-se um aumento na atividade da GPx no grupo de animais que receberam cetamina associada ao etanol (KE), quando comparados com os animais do grupo Co. A GPx aumenta a sua atividade em situações de peroxidação (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998), portanto, o aumento da resposta desta enzima pode refletir em sua tentativa de equilibrar as espécies pró-oxidantes e antioxidantes presentes no fígado durante este período de tratamento. Em um estudo realizado por Gvozdenovic et al (1993) em cães tratados com etanol 12% *ad libitum* por 30 dias, também observou-se aumento na atividade da GPx no fígado dos animais após este período, essa mesma alteração foi observada para o grupo tratado com etanol associado à cetamina administrada na dose de 1 mg/kg, 3 horas antes da coleta do fígado.

Devido ao seu potencial anti-inflamatório, alguns autores atribuem à cetamina propriedades reguladoras contra o desenvolvimento de estresse oxidativo (ZILBERSTEIN et al., 2002; SALMAN et al., 2005) e lesões desencadeadas por isquemia e/ou reperfusão no cérebro, músculo esquelético, coração, intestino e rins (REEKER et al., 2000; CÁMARA et al., 2008; YUZER et al., 2009). No entanto, sabe-se que a administração I.P de 25mg/kg de cetamina por 14 e 28 dias, pode induzir fibrose renal em ratos (JANG et al., 2017), uma condição resultante da geração de ROS e instalação de estresse oxidativo (NIE; HOU, 2012). Considerando este potencial modulador atribuído a cetamina, em relação à análise de parâmetros nos tecidos renais, os valores da maioria dos parâmetros analisados estão bem próximos entre os grupos estudados, não havendo diferenças estatisticamente significantes para este órgão, sendo apenas observado aos 21 dias de tratamento aumento do potencial peroxidativo no grupo de animais tratados com cetamina em relação ao grupo Co, que é novamente equilibrado aos 28 dias.

Devido a particular característica do tecido epitelial de transição da vesícula urinária, houve dificuldade de proceder a sua divulsão e consequentemente de obter material suficiente para os procedimentos experimentais relacionados ao estresse oxidativo deste órgão. Assim, devido a esta dificuldade e à ausência de alterações estatisticamente significantes envolvendo este tecido nos primeiros estudos realizados, optamos por não mais utilizá-lo para análises de estresse oxidativo em um segundo momento.

Quando aumentamos a dose de cetamina para 30mg/kg e/ou adicionamos etanol a 10% na água de bebida dos animais, notamos umaumento do conteúdo de GSSG no fígado dos ratos pertencentes aos grupos experimentais quando comparados com os animais do grupo Co, não acompanhada de alteração nos níveis de GSH. Este mesmo aumento no conteúdo de GSSG

também pôde ser observado no tecido renal dos animais pertencentes aos grupos E e KE em relação ao grupo Co.

A glutathione é um agente redutor intracelular e, em sua forma oxidada (GSSG) representa um marcador da ocorrência de estresse oxidativo (CHAUSSE et al., 2015). O consumo crônico de etanol resulta no aumento da formação de peróxidos lipídicos e, a fim de exercer sua atividade protetora reduzindo estas espécies reativas, a glutathione é oxidada (ALTOMARE; VENDEMIALE; ALBANO, 1988), colaborando para aumentar o conteúdo de GSSG presente no fígado. Ainda, nos estágios iniciais da insuficiência renal crônica, também é possível observar elevação dos níveis plasmáticos de alguns marcadores de estresse oxidativo, como a GSSG, que aumenta regularmente de acordo com a progressão da doença (WITKO-SARSAT et al., 1998; SANTANGELO et al., 2004). O tratamento agudo com cetamina, assim como o etanol, também pode contribuir para aumentar os índices de peroxidação lipídica, bem como a atividade da catalase e também os níveis de GSSG em camundongos submetidos a estresse por restrição de movimentos (CHIU et al., 2015). Vale ressaltar no momento que a GSH pode também servir como um substrato para a dehidroascorbato redutase, atuando no ciclo redox do ácido ascórbico (ciclo de recuperação do ácido ascórbico), funcionando como um agente redutor/doador de elétrons, gerando GSSG (SUTTON et al., 1942; MAY et al., 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; MAY; QU; MORROW, 2001; RUCKER; MORRIS; FASCETTI, 2008). Considerando isso e sabendo que tanto a cetamina como o etanol possuem potencial oxidativo, podemos sugerir que o aumento nos níveis de GSSG evidenciado nos parâmetros referentes à análise do estresse oxidativo dos animais pertencentes ao grupo KE, pode ter alguma relação com o concomitante aumento nos níveis de ácido ascórbico evidenciado na urinálise destes animais. Sabendo que a GPx catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos orgânicos, ao mesmo tempo em que oxida a GSH, gerando GSSG; em condições de estresse oxidativo essa enzima pode aumentar a sua atividade, com consequente aumento da geração de GSSG (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Assim, o aumento estatisticamente significativo da atividade da GPx, simultaneamente ao conteúdo de GSSG, observado no grupo de animais que receberam cetamina associada ao etanol, reforça a hipótese do potencial oxidativo tanto da cetamina quanto do etanol, que pode ainda ser intensificado quando da administração de ambas as drogas em associação.

Assim como a GPx, a CAT também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio e o utiliza como cofator promovendo a oxidação do etanol à acetaldeído nos peroxissomos (STEWART; DAY, 2006); portanto, por atuar em seu processo de biotransformação, o tratamento com etanol pode promover aumento da atividade da CAT (JORDÃO JÚNIOR et al.,

1998; DAS et al., 2008; CEDERBAUM, 2012), assim como foi observado no grupo de animais tratados isoladamente com o etanol quando comparados com o grupo Co.

Apesar de alguns trabalhos relacionarem os efeitos do etanol ou da cetamina isoladamente sobre parâmetros imunes, nenhum trabalho de imunotoxicidade foi encontrado na literatura relacionando o efeito da associação destas substâncias. Estudos com roedores expostos à cetamina, geralmente associados com desafio imunológicos por agentes infecciosos, determinaram que a mesma possui efeitos imunes, com menor liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (DeKOCK; LOIX; LAVAND'HOMME, 2013) e também efeito inibitório sobre a síntese de óxido nítrico (NO) de macrófagos *in vitro*, evidenciando um efeito imunossupressor sobre a resposta inflamatória (KAWASAKI et al., 1999). Já estudos com o etanol evidenciaram um potencial imunossupressor do mesmo, caracterizado pela supressão da secreção de citocinas (SZABO et al., 2001) e da redução da população de linfócitos B e T em órgãos linfoides (JERRELLS et al., 1994; PRUETT et al., 1994).

Nos estudos aqui realizados, em relação à avaliação de órgãos linfoides e parâmetros hematológicos, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos de animais; porém, os resultados provenientes de ambas as fases experimentais indicaram alterações significantes nos parâmetros referentes ao diferencial de leucócitos, aos 14 e 28 dias, respectivamente; com destaque para a ocorrência de redução do número de neutrófilos e também aumento do número de linfócitos circulantes (grupos E e KE em relação ao grupo Co). Ainda, foi observado um aumento na celularidade da medula óssea dos mesmos animais tratados por 28 dias em relação ao grupo Co, lembrando que este resultado referente a medula só ocorreu quando do tratamento com a maior dose.

É sabido que o etanol é capaz de interferir na função e prejudicar a integridade das células polimorfonucleares (LIU, 1980; JAREO; PREHEIM; GENTRY, 1996; SZABO et al., 2015), particularmente os neutrófilos (LIU, 1980; MacGREGOR; SAFFORD; SHALIT, 1988; BALLARD, 1997), ocasionando redução da expressão de moléculas de adesão na superfície destas células (MacGREGOR; SAFFORD; SHALIT, 1988; ZHANG et al. 1997), comprometendo, assim, a aderência e a migração aos locais da inflamação (GLUCKMAN; DVORAK; MacGREGOR, 1977; THIEL, 1983; NELSON et al. 1991) e consequentemente, interferindo em sua atividade antimicrobiana, aumentando a susceptibilidade do indivíduo à infecções (COOK et al. 1990; JAREO; PREHEIM; GENTRY, 1996).

Na técnica de diferencial de células hemáticas, os resultados obtidos para cada população celular circulante é mensurado em proporcionalidade global, ou seja, em porcentagem. Assim, ao observarmos um aumento ou diminuição estatisticamente significativa

numa dada população, a interpretação dos dados deve ser criteriosa, já que uma alteração em porcentagem de uma população irá interferir matematicamente na porcentagem de outra. Em indivíduos alcoólatras, o número de neutrófilos presentes no sangue geralmente apresenta-se reduzido, acompanhado por granulocitopenia e diminuição da celularidade da medula óssea (LIU, 1980; YEUNG; KLUG; LESSIN, 1988; BALLARD, 1997; LATVALA; PARKKILA; NIEMELÄ, 2004). No entanto, este não é considerado um achado universal nem um efeito tóxico direto do consumo crônico de etanol sobre a medula, visto que, alguns autores determinaram que o efeito do etanol sobre a hematopoiese medular é indireto e reversível (COWAN; HINES, 1971; MICHOT; GUT, 1987; NAKAO et al., 1991) não interferindo diretamente sobre as células tronco hematopoiéticas, mas sendo considerado um reflexo dependente das alterações ocasionadas pelo consumo da bebida sobre as células presentes na circulação sanguínea (COWAN; HINES, 1971; MICHOT; GUT, 1987; PANASIUK; KEMONA, 1995).

Considerando isto, podemos sugerir que nossos tratamentos com etanol, associado ou não à cetamina, promoveram nos animais uma diminuição na contagem global de neutrófilos circulantes, à semelhança dos estudos acima citados. Ainda, o aumento de celularidade de medula óssea destes mesmos animais, pode estar relacionado, não a um efeito direto do etanol sobre a medula, mas a uma maior atividade hematopoiética deste órgão com o intuito de compensar a redução na proporcionalidade de neutrófilos circulantes (NIH, 2009).

Como dito anteriormente, até este momento, os animais estudados não haviam sido imunologicamente desafiados; no entanto, para os estudos de imunotoxicidade é mister a realização de desafios imunes com o objetivo de averiguar a integridade do desenvolvimento da resposta imune. Portanto, quando os animais foram desafiados com o KLH, foi observado um aumento nos níveis de IgM anti-KLH no grupo de animais tratados com cetamina quando comparados com os animais do grupo que recebeu ambos os tratamentos (grupo KE). Tonk et al. (2013), após expor ratos por 21, 42 ou 70 dias a diferentes concentrações de etanol, observaram uma diminuição nos títulos de IgM anti-KLH. Ainda, Gluckman e colaboradores (1977) também observaram em indivíduos expostos ao etanol por 28 dias, redução nos títulos de anticorpos anti-KLH. Assim, é possível supor, que o etanol promova naqueles animais expostos à cetamina, uma redução no título de anticorpos específicos, o que acaba sendo traduzido com valores dentro da normalidade.

O consumo de etanol também está associado a redução no desenvolvimento do “tumor” gerado em animais desafiados com KLH para o estudo do DTH, evidenciando um comprometimento da resposta imune celular envolvida e, conseqüentemente, destacando o

potencial imunossupressor dessa substância (KIM, 1991; SEITZ; AGARWAL, 2001; SMITH et al., 2004); no entanto, quando foi avaliado este tipo de hipersensibilidade, os tratamentos não promoveram alterações significantes entre os grupos de animais. Assim, é possível supor que, apesar do etanol e a cetamina em associação atuarem sobre a resposta do tipo Th2, estes tratamentos não promoveram qualquer imunomodulação sobre a resposta do tipo Th1. Porém, com a metodologia empregada neste estudo, não é possível levantar neste momento qualquer hipótese do porquê da não observação de efeitos sobre a resposta do tipo Th1, que pode estar relacionada às doses aqui empregadas, ou mesmo a duração de tratamento ou a linhagem/espécie utilizada quando comparados com os estudos dos autores acima citados.

Apesar do tratamento na primeira fase experimental não ocasionar alterações histopatológicas, na segunda fase experimental, o tratamento com maior dose e concentração induziu a ocorrência de algumas alterações histopatológicas evidentes no fígado e na bexiga dos animais pertencentes aos grupos experimentais quando comparados com os animais do grupo Co.

É sabido que tratamentos com etanol e/ou cetamina podem alterar a arquitetura do tecido hepático (HANSEN; CHERWITZ; ALLEN, 1994; YIN et al., 1999; THOMPSON et al., 2002; LEE et al., 2009; WONG et al., 2012; WAI et al., 2013). El-Fattah e Ismail (2015) determinaram que, a administração diária, duas vezes ao dia de 100mg/kg de cetamina via I.P por 14 dias, pode ocasionar aumento da produção de espécies reativas e, conseqüentemente, comprometer a vascularização do fígado, causando vasodilatação aparente dos sinusóides hepáticos. Estes achados corroboram a alteração nos índices de GSSG aqui evidenciados e, mais discretamente, as avaliações histopatológicas do fígado dos animais pertencentes ao grupo K quando comparados com os animais do grupo Co.

Apesar de não ter sido observada a presença de aumento nos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST dos animais pertencentes ao grupo E, quando comparados com o grupo Co, a análise histopatológica dos mesmos revelou a presença de hepatócitos contendo múltiplos vacúolos citoplasmáticos de tamanhos variados, como possíveis indicativos de alterações adaptativas das células visando resistir à lesão hepática incitada pela administração do etanol (HANSEN; CHERWITZ; ALLEN, 1994; NAYAK et al., 1996), sugerindo que talvez, a administração crônica de etanol pode vir a ocasionar a perda desta plasticidade adaptativa e lesão celular com aumentos característicos dos marcadores de função hepática.

Ibrahim, Khalaf; Galal (2015) observaram que o fígado dos ratos que receberam ambas as drogas apresentou áreas difusas com dilatação sinusoidal moderada e sinais marcantes de vacuolização hepatocelular, caracterizada por hepatócitos exibindo tamanhos variados e alguns

parcialmente “desintegrados” devido à degeneração celular; sendo assim, pode-se sugerir que a congestão vascular observada ocorreu como resultado do distúrbio ocasionado na microcirculação hepática (VANHEULE et al., 2008; WAI et al., 2013; WONG et al., 2012). De fato, nossos resultados indicaram que, o tratamento com K ou E pôde ocasionar alterações hepáticas comumente observadas após a administração destas drogas. Esses efeitos hepatotóxicos foram agravados quando a K foi administrada juntamente com o E, corroborando achados de estudos anteriores e fornecendo evidências de que o abuso à longo prazo de ambas as drogas pode evoluir para a ocorrência de danos hepáticos irreversíveis (ZAKHARI, 2006; WAI et al., 2012; JANG et al., 2017).

Os achados histopatológicos vesicais referentes ao tratamento dos animais com cetamina e etanol foram representados pela presença de edema difuso associado à congestão na região de lâmina própria, indicando o possível desenvolvimento de um processo inflamatório, reforçado pela presença de discreto infiltrado mononuclear composto por macrófagos e linfócitos, localizado na camada muscular adjacente; corroborando os dados presentes em literatura (CHU et al., 2008; SELIUS; SUBEDI, 2008; ZIJOO et al., 2016) e sugerindo que as possíveis alterações histopatológicas observadas, podem ser advindas do consumo de ambas às drogas, e que podem ainda, exibirem-se mais marcantes quando consideramos o consumo das mesmas em associação.

A manifestação de sintomas do trato urinário inferior (dor intensa ao urinar, maior frequência de micção, hematúria e disúria) é frequentemente reportada por usuários crônicos de cetamina de forma recreacional (CHU et al., 2008; WINSTOCK et al., 2012), essas desordens podem progredir para quadros de cistite hemorrágica e ulcerativa decorrentes da apoptose de células da vesícula urinária (LIU et al., 2015).

Apesar da patogênese exata dos efeitos da cetamina sobre o trato urinário inferior ainda não ter sido totalmente elucidada, vários mecanismos tem sido sugeridos visando explicar tais sequelas decorrentes de seu consumo, considerando que a cetamina também sofre excreção renal (HIJAZI; BOULIEU, 2002). Os efeitos tóxicos diretos da cetamina e seus metabólitos sobre as células intersticiais da bexiga podem resultar no comprometimento da microcirculação local, aumentando a permeabilidade vascular endotelial, resultando no surgimento de edema, hemorragia e/ou congestão, com consequente manifestação de dor ao urinar e disúria; além do desenvolvimento de resposta inflamatória local, que pode evoluir para fibrose vesical (CHU et al., 2008). Outro possível mecanismo sugerido consiste no desenvolvimento de estresse oxidativo mediado pela mitocôndria e pelo retículo endoplasmático, em resposta à cetamina e seus metabólitos, com consequente sinalização de vias apoptóticas, resultando na morte das

células vesicais (OTT et al., 2007; LIU et al., 2015) e no desenvolvimento de uma resposta inflamatória seguida da fibrose, com consequente redução da capacidade de distensão e armazenamento de urina na bexiga, refletindo no aumento da frequência de micção (CHU et al., 2008, YEK et al., 2015).

Em relação ao etanol, sabe-se que essa substância química também pode afetar o trato urinário inferior provocando diurese (BASTABLE; DE JODE; WARREN, 1959) e hiperdistensão vesical, devido aos efeitos inibitórios centrais do etanol e também sobre os receptores α -adrenérgicos (BULLOCH; MCGRATH, 1992; SAITO et al., 1994) relacionados a contratilidade do músculo detrusor vesical (YOKOI et al., 1996; OHMURA et al., 1997); podendo seu consumo excessivo até mesmo culminar para a ocorrência de ruptura espontânea da bexiga (DAIGNAULT; SAUL; LEWISS, 2012; ZIJOO et al., 2016). A retenção urinária secundária à redução da contratilidade da bexiga (YOKOI et al., 1996; OHMURA et al., 1997; ARUN, 2002) pode resultar no desenvolvimento de lesões no epitélio vesical caracterizadas pela presença de edema e inflamação local, devido a alteração no fluxo urinário e a retenção prolongada de urina, podendo culminar para a ocorrência de cistite (SELIUS; SUBEDI, 2008; ZIJOO et al., 2016).

Os resultados provenientes da neuroquímica dos animais tratados com etanol (E) revelaram aumento na concentração das catecolaminas: DA e NOR em regiões específicas do SNC. Observou-se elevação nos níveis de DA presentes no hipocampo destes animais quando comparados com os animais pertencentes aos demais grupos experimentais (Co, K e KE), no córtex pré-frontal quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co; e ainda, detectou-se também aumento na concentração de NOR presente no hipocampo, quando comparados com os animais pertencentes aos grupos Co e K. Estes resultados relatados, estão de acordo com o conhecimento prévio acerca da atividade desta droga sobre o SNC, conforme discorrido a seguir.

É sabido que as drogas de abuso possuem a capacidade de regular a via de recompensa do SNC, influenciando diretamente a ação da DA sobre o sistema dopaminérgico mesolímbico-mesocortical, ou indiretamente modificando a atividade de outros neurotransmissores como: a NOR, a 5HT, os opioides e o GABA, que também são capazes de modular a atividade deste sistema (TOMKINS; SELLERS, 2001).

A DA é o principal neurotransmissor presente na via mesolímbica-mesocortical que origina-se a partir da área tegmental ventral do mesencéfalo (McINTOSH; CHICK, 2004), conectando-se com o sistema límbico por meio do *nucleo accumbens*, passando pelo hipocampo e pelo córtex pré-frontal (IKEMOTO, 2010), consistindo em uma das principais “vias

dopaminérgicas de recompensa”, estimulada pelo uso de drogas de abuso (JIAO et al., 2015). Assim sendo, vários estudos comprovam a existência de uma relação dose-resposta entre a ingestão de etanol e o aumento da concentração de DA nestas regiões encefálicas (YOSHIMOTO et al., 1992; YAN, 1999). Pesquisas utilizando modelos animais determinaram possíveis mecanismos envolvidos nessa alteração, sugerindo que o consumo de etanol promove aumento da liberação de DA na fenda sináptica, em detrimento à inibição de seus transportadores e sua consequente recaptação neuronal (YIM; GONZALES, 2000). Outros estudos sugerem que o etanol é capaz de, indiretamente, aumentar os níveis de DA ao estimular os receptores opioides devido a interação existente entre a neurotransmissão opioide e a dopaminérgica, visto que ambas convergem para as vias mesolímbica-mesocortical (COWEN; LAWRENCE, 1999). Ainda, considerando que o etanol é uma droga agonista gabaérgica, estudos sugerem a existência de uma correlação entre o estímulo de neurônios gabaérgicos que se estendem para a localização da “via de recompensa dopaminérgica” e a liberação de DA nesta região após o consumo de etanol; reforça esta hipótese, o fato desta ser uma das propriedades das drogas de abuso responsável por mediar os efeitos de reforço e recompensa decorrentes de seu uso (BOILEAU et al., 2003).

O consumo de etanol é capaz de influenciar também a concentração central de NOR, determinando a ocorrência de um efeito bifásico, caracterizado por um estímulo decrescente à liberação deste neurotransmissora medida em que a alcoolemia diminui (McDOUGLE et al., 1995; GIANCOLA; ZEICHNER, 1997). Rossetti et al. (1992) sugeriram que a redução na liberação central de NOR pode refletir-se nos efeitos sedativo-hipnóticos manifestados na presença de altas concentrações alcoólicas sanguíneas (mais tardiamente ao consumo de etanol); enquanto que o aumento central da liberação de NOR pode correlacionar-se aos efeitos de excitação e alerta ocasionados na presença de baixas concentrações de etanol, no período inicial de seu consumo.

Por outro lado, em animais tratados com a cetamina isoladamente, observou-se aumento na concentração de 5HT presente no hipocampo, quando comparados com os animais pertencentes ao grupo Co; e no córtex pré-frontal, quando comparados com os animais pertencentes aos grupos Co e KE.

É sabido que a cetamina é capaz de ocasionar alterações nas vias de neurotransmissões centrais dopaminérgicas, glutamatérgicas e serotoninérgicas (BECKER et al., 2003). Estudos realizados *in vitro* determinaram que a cetamina, de uma maneira dose-dependente, é capaz de inibir os transportadores de monoaminas, incluindo o transportador de 5HT (NISHIMURA et al., 1998; ZHAO; SUN, 2008), inibindo a recaptação neuronal deste neurotransmissor

(MARTIN et al., 1990) e, conseqüentemente, promovendo um aumento na sua concentração extracelular, assim como evidenciado no cérebro de roedores tratados com esta droga (TAO; AUERBACH, 1994; CHATTERJEE et al., 2012). Ainda, várias linhas de evidência sugerem que a deficiência na neurotransmissão serotoninérgica pode ser subjacente a fisiopatologia da depressão, e que o efeito antidepressivo atribuído à cetamina pode ser explicado pelo mecanismo relacionado ao aumento da concentração encefálica deste neurotransmissor (MANN, 1999).

Sabe-se que a ação do etanol promove efeito depressor sobre o SNC ao agir como agonista em receptores gabaérgicos, promovendo assim a alteração conformacional deste receptor, que nada mais é do que um canal iônico, permitindo o influxo de íons cloreto e conseqüentemente o efeito inibitório central (SANTHAKUMAR; WALLNER; OTIS, 2007). Estudos tem evidenciado que tanto a administração aguda quanto crônica de etanol, não promove alterações na síntese do neurotransmissor GABA de forma direta; porém, na administração crônica do etanol, foi observada que a retirada ou a abstinência a esta droga promove ao nível central, especificamente no núcleo central da amígdala, maior liberação de GABA, efeito este sugerido como compensatório, neuroadaptativo ou alostático à dependência do etanol (ROBERTO, 2004). Vale ressaltar que a amígdala não foi avaliada, no entanto, como em nosso estudo o etanol foi administrado na água de bebida e o jejum hídrico não foi realizado até a eutanásia dos animais, acredita-se que os níveis de GABA não estariam alterados nos mesmos.

Embora seja considerada uma droga antagonista não-competitiva dos receptores de GLU do tipo NMDA (BRESSAN; PILOWSKY, 2003), os efeitos da cetamina sobre a liberação deste neurotransmissor são conflitantes, pois alguns estudos determinam que este mecanismo de ação antagonístico é responsável por promover aumento na liberação de GLU (MOGHADDAM et al., 1997; MOGHADDAM; ADAMS, 1998; ADAMS; MOGHADDAM, 2001), enquanto outros estudos reportam a ocorrência de diminuição na liberação deste neurotransmissor após a administração desta droga e/ou seus análogos como PCP ou MK-801 (YONEZAWA et al., 1993; STECIUK et al., 2000). De fato, ratos submetidos a modelos para estudo de estresse induzido por contenção ou *foot-pinch*, exibiram maior liberação de GLU no córtex pré-frontal (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997), no entanto, tal efeito foi reduzido após a administração de MK-801 (STECIUK et al., 2000); além disso, Moghaddam (1993) e Steciuk et al (2000) evidenciaram também que, na ausência de estresse, a administração isolada de MK-801 não foi capaz de promover alterações na liberação de GLU, sugerindo que o estresse pode ser considerado um fator determinante para incitar a liberação deste neurotransmissor. Ainda,

também concluíram que a dose influencia a liberação deste neurotransmissor, uma vez que a redução da mesma promove aumento na liberação de GLU. Considerando que o receptor do tipo NMDA é o responsável por modular o efluxo de GLU e que nossos animais não foram submetidos a estresse experimental, podemos sugerir dessa forma que nossas condições experimentais também não foram suficientes para incitar aumento na liberação de GLU.

8 CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos permitem concluir que a administração de etanol e cetamina promove efeito sinérgico quanto à redução do ganho de peso por mecanismos distintos, não relacionados ao consumo de ração.

O etanol promove acidificação da urina e diminuição da glicose urinária que também se reflete na glicemia. Ainda, pode-se concluir que o etanol em associação com a cetamina promove aumento no nível urinário de ácido ascórbico.

Os estudos bioquímicos permitem concluir que a cetamina promove diminuição nos níveis de FA independente de dose e tempo de administração. A administração da associação de drogas altera o perfil lipídico e também promove alterações nefrotóxicas na dependência da dose e no tempo de administração.

Em relação ao estudo do estresse oxidativo, é possível concluir que os tratamentos promovem efeito oxidativos em períodos iniciais de tratamento, os quais entram em equilíbrio na cronicidade, devido à ação de moléculas endógenas antioxidativas que se encontram aumentadas nos estudos de maior tempo de administração.

Em relação à imunotoxicidade, o etanol isoladamente ou em associação promove diminuição dos neutrófilos circulantes com consequente aumento na celularidade da medula óssea. Porém, o tratamento não foi capaz de promover alterações imunotóxicas nos desenvolvimentos das respostas imunes humoral e celular.

O etanol e/ou a cetamina promovem alterações histopatológicas hepáticas, porém, apenas a associação das drogas promoveu alterações vesicais.

Com os resultados obtidos é possível concluir que tanto a cetamina quanto o etanol promovem alterações no perfil neuroquímico cerebral, porém, a associação das drogas, não promoveu efeito sinérgico sobre os parâmetros avaliados.

9 REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. E.; YOUNESS, E. R.; MOHAMMED, N. A.; OMARA, E. A.; SLEEM, A. A. Effect of ketamine on oxidative stress following lipopolysaccharide administration. **Comparative Clinical Pathology**. v. 24, p. 53-63, 2015.
- ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R. C. A.; BEZERRA, R. S. The Impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. **Alcoholism - Clinical & Experimental Research**, v. 36, n. 9, 2012.
- ABANADES, S.; PEIRO, A. M.; FARRE, M. Club drugs: old medicines as new party drugs. **Medicina Clínica**. v. 123, p. 305-311, 2004.
- ACMD, Advisory Council on the Misuse of Drugs. **Ketamine: a review of use and harm**. United Kingdom, 2013. 48 p.
- ADAMS, N.; BOICE, R. A. longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. **Journal of Comparative Psychology**. v. 97, p. 24-33, 1983.
- ADAMS, B. W.; MOGHADDAM, B. Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the pre-frontal cortex. **Biological Psychiatry**.v. 50, p. 750-757, 2001.
- ADEWALE, A.; IFUDU, O. Kidney injury, fluid, electrolyte and acid-base abnormalities in alcoholics. **Nigerian Medical Journal**. v. 55, n. 2, p. 93-98, 2014.
- AGUIAR, A. S.; DA-SILVA, V A.; BOAVENTURA, G. T. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, p. 841-846, 2004.
- ALTOMARE, E.; VENDEMIALE, G.; Albano, O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. **Life Sciences**. v. 43, n. 12, p. 991-998, 1988.
- ANDRADE, A. G.; DUARTE, P. C. A. V.; OLIVEIRA, L. G. **I Levantamento Nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras**. Brasília: SENAD, 2010. 282 p.
- ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F.; ARAUJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012.
- ARUN, C. P. A queue paradigm formulation for the effect of large-volume alcohol intake on the lower urinary tract. **Alcohol and Wine in Health and Disease**. v. 957, n. 1. p. 292-294, 2002.
- ADLER, C. M.; MALHOTRA, A. K.; ELMAN, I.; GOLDBERG, T.; EGAN, M.; PICKAR, D.; BREIER, A. Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**. v. 156, n. 10, p. 1646-1649, 1999.

ADAMS, B.; MOGHADDAM, B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. **Journal of Neuroscience**. v. 18, p. 5545-5554, 1998.

AGARWAL, D. P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. **Pathologie Biologie**. v. 49, p. 703-709, 2001.

ALENCAR, I. Veterinário é preso por tráfico de drogas. **Sindicato dos Médicos de Pernambuco (SIMPE)**. 28 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.simepe.com.br/novo/veterinario-e-presos-por-trafico-de-drogas/>>. Acesso em: 09 fev. 2018.

ALTAMURA, C. A.; MAURI, M. C.; FERRARA, A.; MORO, A. R.; D'ANDREA, G.; ZAMBERLAN, F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatry disorders. **American Journal of Psychiatry**. v. 150, p. 1731-1733, 1993.

ALVES, H.; SURJAN, J.; NOGUEIRA-MARTINS, L.; MARQUES, A.; RAMOS, S.; LARANJEIRA, R. Perfil Clínico e demográfico de médicos com dependência. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 51, n. 3, p. 139-143, 2005.

ANAESTHESIAUK, 2018. Disponível em: <<http://www.anaesthesiaweb.com/>>. Acesso em: 09 fev. 2018.

ANDERSON, P.; CHISHOLM, D.; FUHR, D. C. Effectiveness and cost-effectiveness of policies and programmes to reduce the harm caused by alcohol. **The Lancet**. v. 373, n. 9682, p. 2234-2246, 2009.

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-methylaspartate. **Brazilian Journal of Pharmacology**. v. 79, p. 565-575, 1983.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. Seção 1. Resolução - RDC nº87, de 28 de junho de 2016. **Atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998**. 2016. 6 p.

ARICAN, F. O.; OKAN, T.; BADAĞ, O.; GÜNERİ, S. An unusual presentation from xylazine-ketamine. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 46, n. 6, p. 324-325, 2004.

ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Projeto de Lei nº 2014 de 2006 - Proíbe a comercialização livre de quetamina, no âmbito do Estado de São Paulo, e fixa outras providências. 2006.** Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/spl/2006/04/Arquivos/7478870_646272_PL214.txt>. Acesso em 17 mar. 2018.

BAGLEY, J.; MOGHADDAM, B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. **Neuroscience**. v. 77, p. 65-73, 1997.

BAKER, S. C.; STAHLSCHMIDT, J.; OXLEY, J.; HINLEY, J.; EARDLEY, I; MARSH, F.; GILLATT, D.; FULFORD, S.; SOUTHGATE, J. Nerve hyperplasia: a unique feature of ketamine cystitis. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 1, n. 64, 2013.

BALLARD, H. S. The hematological complications of alcoholism. **Alcohol Health and Research World**. v. 21, n. 1, p. 42-52, 1997.

BANERJEE, A.; LARSEN, R. S.; PHILPOT, B. D.; PAULSEN, O. Roles of presynaptic NMDA receptors in neurotransmission and plasticity. **Trends in Neuroscience**. v. 39, n. 1, p.26-39, 2016.

BANNERMAN, D. M.; GOOD, M. A.; BUTCHER, S. P.; RAMSAY, M.; MORRIS, R. G. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. **Nature**. v. 378, p. 182-186, 1995.

BAPTISTA, R. DE F. F.; TAIPEIRO, E. DE F. QUEIROZ, R. H. C.; CHIES, A. B.; CORDELLINI, S. Estresse isolado ou associado ao etanol libera prostanóides em aorta de ratos via $\alpha 2$ -adrenoceptores. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 3, p. 211-218, 2013.

BARBIERI, M.; COLNGHI, E.; TOMMASINO, C.; ZANGRILLO, A.; GALLI, L.; TORRI, G. Efficacy of the NMDA antagonist ketamine im preemptive analgesia. **World Congress on Pain**, v. 8, p. 343-349, 1997.

BASTABLE, J. R.; DE JODE, L. R.; WARREN, R. P. Spontaneous rupture of the bladder. **Brazilian Journal of Urology**. v. 31, n. 1, p. 78-86, 1959.

BECK; C. C.; COPPOCK, R. W.; OTT, B. S. Evaluation of vetalar (ketamine HCl): a unique feline anesthetic. **Veterinary medicine & small animal clinician**. v. 66, n. 10, p. 993-996, 1971.

BECKER, A.; PETERS, B.; SCHOEDER, H.; GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in art behavior: a possible animal model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 27, n. 4, p. 687-700, 2003.

BELENKO, S.; DUGOSH, K. L.; LYNCH, K.; MERICLE, A. A.; PICH, M.; FORMAN, R. F. Online illegal drug use information: an exploratory analysis of drug-related website viewing by adolescents. **Journal of Health Communication**, v. 14, p.612-630, 2009.

BENNETT, J. S.; GOSSET, K. A.; MCCARTHY, M. P.; SIMPSON, E. D. Effects of ketamine hydrochloride on serum biochemical and hematologic variables in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, p.15-18, 1992.

BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D. A.; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S, KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**. v. 47, p. 351-354, 2000.

BERNHEIM, F.; BERNHEIM, M. L. C.; WILBUR, K. M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. **Journal of Biochemistry**. v. 174, p. 257-264, 1948.

BEUTLER, E. Catalase. **Red Cell Metabolism - A Manual of Biochemical Methods**. New York: Grune & Stratton, 1975. 208p.

BIANCHI, S. P. Uso da cetamina como analgésico em cães e gatos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária. Monografia apresentada como requisito para obtenção da Graduação no curso de Medicina Veterinária. 2011. 34 p.

BICE, P. J.; KIEFER, S. W. Taste reactivity in alcohol preferring and nonpreferring rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**. v. 14, n.5, p. 721-727, 1990.

BLACHFORD, E. S. L.; KRAPP, K. Ketamine. **Drugs and Controlled Substances: Information for Students**. Detroit: Gale, 2010.

BOILEAU, I.; ASSAAD, J. M.; PIHL, R. O.; BENKELFAT, C.; LEYTON, M.; DIKSIC, M.; TREMBLAY, R. E.; DAGHER, A. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. **Synapse**. v. 49, n. 4, p. 226-231, 2003.

BORGHESE, C. M.; HICKS, J. A.; LAPID, D. J.; TRUDELL, J. R.; HARRIS, R. A. GABA_A receptor transmembrane amino acids are critical for alcohol action: disulfide crosslinking and alkyl methanethiosulfonate labeling reveal relative location of binding sites. **Journal of Neurochemistry**. v. 128, n. 3, p.363-375, 2014.

BOSMA, A.; BROUWER, A.; SEIFERT, W. F.; KNOOK, D. Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 156, p. 15-21, 1988.

BOURKE, C. D.; BERKLEY, J. A.; PRENDERGAST, A. J. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. **Review Trends in Immunology**, v. 37, n. 6, p. 386-398, 2016.

BOUVIER G.; BIDORET, C.; CASADO M.; PAOLETTI P. Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. **Neuroscience**. v. 311, p. 322-340, 2015.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**. v. 128, n. 3, p. 617-630, 1972.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. **Oxygen, gene expression and cellular function**. New York: Dekker, p. 1-25, 1997.

BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 25, p 177-183, 2003.

BUCHER, N. L. R.; MCGARRAHAN, K. The biosynthesis of cholesterol from acetate-1-¹⁴C by cellular fractions of rat liver. **Journal of Biological Chemistry**. v. 222, p.1-15, 1956.

BUCHER, R. Drogas e drogadição no Brasil. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992. 323 p.

BULLOCH, J. M.; MCGRATH, C. The effect of ethanol on responses of isolated rabbit ileocolic artery. **European Journal of Pharmacology**. v. 211, n. 1, p. 1-8, 1992.

BRASIL, Secretaria Nacional Antidrogas. **II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades do País.** São Paulo: SENAD, 2006. 473 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional Antidrogas, Diretoria de Políticas de Prevenção e Tratamento. **I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Brasília - DF, 2007.

BRASIL, Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). **I Levantamento nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras.** Brasília - DF, 2010. 282p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia Estratégico para o Cuidado de Pessoas com Necessidades Relacionadas ao Consumo de Álcool e Outras Drogas.** Brasília - DF, n. 1, 100p. 2015.

BRASIL, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. Ministérios da Justiça e Segurança Pública. Governo Federal. Brasil: SENAD, 2018. Disponível em: <<http://www.justica.gov.br/sua-protecao/politicas-sobre-drogas>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

BYUN, J. S.; JEONG, W. I. Involvement of hepatic innate immunity in alcoholic liver disease. **Immune Network.** v. 10, p. 181-187, 2010.

CAJAZEIRO, J. M. D.; BICALHO, D. M.; ARRUDA, A. L. R. P.; LOPES, T. J. A.; GOMEZ, R. S. Toxicologia e profissionais de saúde: uso abusivo e dependência. **Revista de Medicina de Minas Gerais.** v. 22, n. 2, p. 153-157, 2012.

CÁMARA, C. R.; GUZMÁN, F. J.; BARRERA, E. A.; CABELLO, A. J.; GARCIA, A.; FERNÁNDEZ, N. E.; CABALLERO, E.; ANCER, J. Ketamine anesthesia reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. **World Journal of Gastroenterology.** v. 14, p. 5192-5196, 2008.

CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Ketamine-induced potentiation of morphine analgesia in rat tail-flick test: role of opioid-, alpha2-adrenoceptors and ATP-sensitive potassium channels. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** v. 29, p. 86-89, 2006.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J.C.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A. **I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil - 2001.** Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia, UNIFESP, São Paulo - SP, 2002. 380 p.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J.C. Secretaria Nacional Antidrogas. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país.** Brasília - DF, 2007.

CARNEIRO, H. S. As necessidades humanas e o proibicionismo das drogas do século XX. **Revista do Instituto de Estudos Socialistas.** n. 6, 2002.

CARNEIRO, H. S. **As bebidas alcoólicas e as drogas psicoativas na história**. Universidade de São Paulo (USP) - Faculdade de Filosofia Letras e Ciências Humanas (FFLCH). Núcleo de Estudos Interdisciplinares sobre Psicoativos. Departamento de História, 2004. 15 p.

CARRUBA, M. O.; BONDILOTTI, G.; PICOTTI, G.B.; CATTERUCCIA, N.; PRADA, M.da. Effects of diethyl ether, halothane, ketamine and urethane on sympathetic activity in the rat **European Journal of Pharmacology**. v. 134, p. 15-24, 1987.

CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. **Clinical Liver Disease**.v. 16, p. 667-685, 2012.

CESAR, Center for Substance Abuse Research. **Ketamine**. University of Maryland, College Park, 2013.

CHAN, W. M.; XU, J.; FAN, M.; TSUI, Y. M.; WAI, S. M.; LAM, W. P.; YEW, D. T. Downregulation in the human and mice cerebella after ketamine versus ketamine plus ethanol treatment. **Microscopy Research and Technique**, 2011.

CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 597-600, 1992.

CHATTERJEE, M.; VERMA, R.; GANGULY, S.; PALIT, G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. **Neuropharmacology**. v. 63, p. 1161–1171, 2012.

CHAUSSE, B.; VIEIRA-LARA, M. A.; SANCHEZ, A. B.; MEDEIROS, M. H. G.; KOWALTOWSKI, A. J. Intermittent fasting results in tissue-specific changes in bioenergetics and redox state. **Plos One**. v. 10, n. 3, 2015.

CHEN, J.; ROBINSON, N. C.; SCHENKER, S.; FROSTO, T. A.; HENDERSON, G. I. Formation of 4-hydroxynonenal adducts with cytochrome c oxidase in rats following short-term ethanol intake. **Hepatology**, v.29, p.1792-1798, 1999.

CHIU, C. T.; SCHEUING, L.; LIU, G.; LIAO, H. M.; LINARES, G. R.; LIN, D.; CHUANG, D. The mood stabilizer lithium potentiates the antidepressant-like effects and ameliorates oxidative stress induced by acute ketamine in a mouse model of stress. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 18, n. 6, p. 1-13, 2015.

CHU, P. S.; MA, W.K.; WONG, S. C.; Chu, R. W.; Cheng, C. H.; Wong, S.; Tse, J. M.; Lau, F. L.; Yiu, M. K.; Man, C. W.. The destruction of the lower urinary tract by ketamine abuse: a new syndrome? **BJU International**. v. 102, p. 1616-1622, 2008.

CLARK, M. R.; TREISMAN, G. J. **Chronic Pain and Addiction**. Zwitterland: Karger, 2011.

CLEMENTS, J. A.; NIMMO, W. S. Pharmacokinetics and analgesic effects of Ketamine in man. **British Journal of Anaesthesia**, v. 53, n. 1, p. 27-30, 1981.

COFFIN, P.; GALEA, S.; AHERN, J.; LEON, A.; VLAHOV, D.; TARDIFF, K. Opiates, cocaine and alcohol combinations in accidental drug overdose deaths in New York City. **Addiction**, v. 98, n. 6, p. 739-747, 2003.

COFFIN, P.; SHERMAN, S.; CURTIS, M. Underestimated and overlooked: A global overview of drug overdose and overdose prevention. **Global State of Harm Reduction**. London: International Harm Reduction Association, 2010.

COLLINS, M. A.; ZOU, J. Y.; NEAFSEY, E. J. Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: Furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. **FASEB Journal**. v. 12, p. 221-230, 1998.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 37, p. 205-237, 1997.

COOK, R. T.; KEINER, J. A.; YEN, A. Ethanol causes accelerated G1 arrest in differentiating HL-60 cells. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 14, n. 5, p. 695-703, 1990.

CORSSEN, G.; DOMINO, E. F. Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. **Anesthesia and Analgesia**. v. 45, p. 29-40, 1966.

COSMAN, K. M.; BOYLE, L. L.; PORSTEINSSON, A. P. Memantine in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 8, p. 203-214, 2007.

COSTA, A. C.; MOTTA, C. Operação desarticula rede de tráfico de drogas sintéticas. O Globo. Rio de Janeiro. 30 nov. 2006. **Rio**. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/rio/operacao-desarticula-rede-de-trafico-de-drogas-sinteticas-4542892>>. Acesso em: 09 fev. 2018.

COTTRELL, A. M.; GILLATT, D. Consider ketamine misuse in patients with urinary symptoms. **Practitioner**. v. 252, p. 5, 2008.

COWAN, D. H.; HINES, J. D. Thrombocytopenia of severe alcoholism. **Annals of Internal Medicine**. v. 74, p. 37-43, 1971.

COWEN, M. S.; LAWRENCE, A. J. The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 23, n. 7, p. 1171-1212, 1999.

CRITCHLOW, D. G. A case of ketamine dependence with discontinuation symptoms. **Addiction**. v. 101, p. 1212-1213, 2006.

CSCB. Canadian Society of Customs Brokers. **Status of ketamine under Controlled Drugs and Substances Act (CDSA)**. 2005.

CURRAN, H. V.; MORGAN, C. Cognitive, dissociative and psychotogenic effects of ketamine in recreational users on the night of drug use and 3 days later. **Addiction**, v. 95, n. 4, p. 575-90, 2000.

DAIGNAULT, M. C.; SAUL, T.; LEWISS, R. E. Bedside ultrasound diagnosis of atraumatic bladder rupture in an alcoholintoxicated patient: a case report. **Critical Ultrasound Journal**. v. 4, n.1, p. 1-5, 2012.

DALGARNO, P. J.; SHEWAN, D. Illicit use of ketamine in Scotland. **Journal of Psychoactive Drugs**. v. 28, p. 191-199, 1996.

DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 18, p. 23-32, 2003.

DAS, S. K.; VARADHAN, S.; DHANYA, L.; MUKHERJEE, S.; VASUDEVAN, D. M. Effects of chronic ethanol exposure on renal function tests and oxidative stress in kidney. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 23, n. 4, p. 341-344, 2008.

DAY, C. P. Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Intenational**. v.26, p. 1021-1028, 2006.

DEA. U.S. Department of Justice Drug Enforcement Administration. **Drugs of abuse - A DEA resource guide**, 2011. 33 p.

DEA. U.S. Department of Justice Drug Enforcement Administration. **Drugs of abuse - A DEA resource guide**, 2017. 94 p.

DeCARLI, L. M.; LIEBER, C S. Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. **Journal of Nutrition**, v. 91, p. 331-336, 1967.

DEGENHARDT, L.; DUNN, M. The epidemiology of GHB and ketamine use in an Australian household survey. **International Journal of Drug Policy**, v. 19, p. 311-316, 2008.

De KOCK, M.; LAVAND'HOMME, P.; WATERLOOS, H. Balanced analgesia in the perioperative period: is there a place for ketamine. **Pain**. v. 92, p. 373-380, 2001.

De KOCK, M.; LOIX, S.; LAVAND'HOMME, P. Ketamine and peripheral inflammation. **CNS Neuroscience & Therapeutics**. v. 19, p. 403-410, 2013.

DEB ROY, S. Government makes notorious "date rape" drug ketamine harder to buy or sell. **The Times of India**. 2013.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Diretoria Colegiada. **Resolução - RDC nº 87, de 28 de Junho de 2016**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33868/3233596/51+-+RDC+N%C2%BA+87-2016.pdf/08506a8f-f848-4cfd-a5bf-05d93f23b327>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº35, de 11 de Setembro de 2017**. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=21/09/2017&jornal=1&pagina=16&totalArquivos=192>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

DILLON, P.; COPELAND, J.; JANSEN, K. Patterns of use and harms associated with non-medical ketamine use. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 69, n. 1, p.23-28, 2003.

DINIS-OLIVEIRA, R. J., CARVALHO, F., DUARTE, J. A., DIAS, R., MAGALHÃES, T., SANTOS, A. Suicide by hanging under the influence of ketamine and ethanol. **Forensic Science International**. v. 202, p. 23-27, 2010.

DIXON, H. Party drug ketamine to be upgraded to Class B. **The Daily Telegraph**. 2014.

DOCHERTY, J. R.; MCGRATH, J. C. A comparison of pre and post junctional potencies of several alpha-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygeus muscle of the rat. Evidence for two types of post junctional alpha-adrenoceptor. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 312, n. 2, p. 107-116, 1980.

DOMINO, E. F.; CHODOFF, P.; CORSSSEN, G. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic in man. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v. 6, p. 279-291, 1965.

DOMINO, E. F. Taming the Ketamine tiger. **Anesthesiology**. v. 113, n. 3, p 678-84, 2010.

DOWDY, E. G.; KAYA, K. Studies of the mechanism of cardio-vascular responses to CI-581. **Anesthesiology**. v. 29, p. 931-943, 1968.

DRAIBE, S. A.; CENDOROGLO, M. Tratamento conservador da insuficiência renal crônica. **Revista Diagnóstico & Tratamento**. v. 6, n. 2, p. 17-23, 2001.

DUNCAN, E. J.; MADONICK, S. H.; PARWANI, A.; ANGRIST, B.; RAJAN, R.; CHAKRAVORTY, S.; EFFEREN, T. R.; SZILAGYI, S.; STEPHANIDES, M.; CHAPPELL, P. B.; GONZENBACH, S.; KO, G. N.; ROTROSEN, J. P. Clinical and sensorimotor gating effects of ketamine in normals. **Neuropsychopharmacology**. v. 25, p. 72-83, 2001.

DURIEUX, M. E. Inhibition by ketamine of muscarinic acetylcholine receptor function. **Anesthesia & Analgesia**. v. 81, p. 57-62, 1995.

DUVAL NETO, G. F. Anestésicos Venosos. **Anestesiologia. Princípios e Técnicas**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 560-597.

ECDD, Expert Committee on Drug Dependence. Conference in Geneva, Switzerland, 2006. 30 p.

EFREMOV, R. G.; BARADARAN, R.; SAZANOV, L. A. The architecture of respiratory complex I. **Nature**. v. 465, n. 7297, p. 441-445, 2010.

EGGLETON, M. G. Urine acidity in alcohol diuresis in man. **Journal of Physiology**. v. 104, p. 312-320, 1946.

ELBERT, T. Ketamine as a model of schizophrenia: evidence from human and animal studies. **Entheogenesis Australis 2008 Symposium**. 2008.

EL-FATTAH, L. I. A.; ISMAIL, D. I. Histological study on the protective effect of green tea extract on the liver of rats exposed to ketamine. **Journal of Cytology and Histology**. v. 6, n. 5, 2015.

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, **Report on the risk assessment of ketamine in the framework of the joint action on new synthetic drugs**, 2002. 120 p.

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, **European Drug Report - Trends and Development**, 2016. 84 p.

ENGLEMAN, E. A.L.; RODD, Z. A.; BELL, R. L.; MURPHY, J. M. The Role of 5-HT₃ Receptors in Drug Abuse and as a Target for Pharmacotherapy. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 7, n. 5, p. 454-467, 2008.

ENOMOTO, N.; TAKASE, S.; TAKADA, N. TAKADA, A. Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. **Hepatology**. v. 13, p.1071-1075, 1991.

EPSTEIN, M. Alcohol's impact on kidney function. **Alcohol Health & Research World**. v. 21, n.1, p. 84-92, 1997.

EVERS, A. S.; CROWDER, C. M. General Anesthesia. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 337-365.

FATACCIOLI, V.; ANDRAUD, E.; GENTIL, M.; FRENCH, S. W.; ROUACH, H. Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. **Hepatology**, v. 29, n. 1, p. 14-20, 1999.

FARROKHIFAR, S. H.; JAFARI, R. A.; MAJD, N. E.; TABATABAEE, S. R. F.; MAYAHI, M. Effects of dietary vitamin E on mucosal maltase and alkaline phosphatase enzyme activities and on the amount of mucosal malonyldialdehyde in broiler chickens. **Veterinary Research Forum**, v. 4, n. 4, p. 221-225, 2013.

FDA. Food and Drug Administration. Ketamine abuse. **FDA Drug Bulletin**. v. 9, n. 24, 1979.

FEDERAL REGISTER, v. 64, n. 68, 1999. Disponível em: <<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1999-04-09/pdf/FR-1999-04-09.pdf>>. Acesso em 14 mar. 2018.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, p. 253-256, 1996.

FEINMAN, L.; LIEBER, C. S. Ethanol and lipid metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 791-792, 1999.

FERREIRA, P. E. M.; MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 96-99, 2001.

FIGUEIREDO, T. No Rio, 17 são presos acusados de tráfico. **Folha de São Paulo**. 2006. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u486762.shtml>>. Acesso em 14 jul. 2018.

FIELDS, H L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. **Textbook of Pain**, 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p. 243-257.

FOCCHI, G. R. A. Dependência de drogas: uma abordagem para leigos. **Psychiatry on line Brasil**. v. 9, p. 1-15, 2004.

FORMAN, R.; MARLOWE, D. B.; MCLELLAN, A. T. The Internet as a source of drugs of abuse. **Current Psychiatry Reports**, n. 8, p. 377-382, 2006.

FORMIGONI, M. L. O. DE S.; KESSLER, F.; PECHANESKY, F.; BALDISSEROTTO, C. F. P.; ABRAHÃO, K. P. Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas (SENAD). Ministério da Justiça e Cidadania. **Sistema para detecção do uso abusivo e dependência de substâncias psicoativas: encaminhamento, intervenção breve, reinserção social e acompanhamento**. Brasília - DF, 11 ed., 2017.

FOX, R. R. Clinical chemical studies applicable to laboratory animal species and their interpretation in the rabbit. **The clinical chemistry of laboratory animals**. New York: Pergamon Press, 1989. p. 41-47.

FREUD, S. Uber coca. **Centralblatt für die gesamte Therapie**. v. 7, n. 2, p. 289-314, 1884.

FREZZA, M.; DI PADOVA, C.; PAZZATO, G.; TERPIN, M.; BARAONA, E.; LIEBER, C. S. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. **New England Journal of Medicine**. v. 322, p. 95-99, 1990.

GABBAY, K. H.; BOHREN, K. M.; MORELLO, R.; BERTIN, T.; LIU, J.; VOGEL, P. Ascorbate synthesis pathway - Dual role of ascorbate in bone homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 25, p. 19510-19520, 2010.

GARCIA, J. B. S. Cetamina uma nova leitura. **Prática Hospitalar**. v. 53, p. 214-216, 2007.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; STERZ, L.; KAPCZINSKI, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450-455, 2009.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; BARBOSA, L. M.; ANDREAZZA, A. C.; STERTZ, L.; FRIES, G. R.; GAVIOLI, E. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 32, p. 140-144, 2008.

GATELY, I. **Drink: A Cultural History of Alcohol**. 1 ed. New York: Gotham Books. 2008. 633 p.

GAWRYSZEWSKI, V. P.; MONTEIRO, M. G. Mortality from diseases, conditions, and injuries where alcohol is a necessary cause in the Americas, 2007-2009. **Addiction**. v. 109, 2014.

GAYNOR, J. S. **Outras drogas utilizadas para o tratamento da dor**. Manual de controle da dor em Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2009.p. 260-276.

GELLER, J. Dark shadows: drug abuse and addiction in the veterinary workplace. **DVM360 Magazine**. Colorado: Fort Collins, 2016.

GIANCOLA, P. R.; ZEICHNER, A. The biphasic effects of alcohol on human physical aggression. **Journal of Abnormal Psychology**. v. 106, n. 4, p. 598-607, 1997.

GIAVAROTTI, L.; D'ALMEIDA, V.; GIAVAROTTI, K. A. S. AZZALIS, L. A.; RODRIGUES, L.; CRAVERO, A. A. M.; VIDELA, L. A.; KOCH, O. R.; JUNQUEIRA, V. B. C. Liver necrosis induced by acute intraperitoneal ethanol administration in aged rats. **Free Radical Research**. v. 36, n. 3, p. 29-275, 2002.

GILL, J.; STAJIC, M. Ketamine in non-hospital and hospital deaths in New York City. **Journal of Forensic Sciences**. v. 45, n. 3, p.655-658, 2000.

GLABE, R. S. Acute toxic effects of club drugs. **Journal of Psychoactive Drugs**. v. 36, p. 303-313, 2004.

GLUCKMAN, S. J.; DVORAK, V. C.; MacGREGOR, R. R. Effect of acute alcohol intoxication on granulocytemobilization and kinetics. **Blood**. v. 52, n. 3, p. 551-559, 1977.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN JUNIOR, A. H.; ARMSTRONG E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios da Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 882 p.

GOLD, M. S.; BYARS, J. A.; FROST-PINEDA, K. Occupational exposure and addictions for physicians: case studies and theoretical implications. **Psychiatric Clinics of North America**. v. 27, p. 745-753, 2004.

GOLDFRANK, L. R. **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. 7 ed. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 95.

GONZALES, J. M.; LOEB, A. L.; REICHARD, P. S.; IRVINE, S. Ketamine inhibits glutamate-N-Methyl-D-Aspartate and quisqualate stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons. **Anesthesiology**. v. 82, p. 205-213, 1995.

GONZÁLEZ GIL, A.; ILLERA, J. C.; SILVÁN, G.; ILLERA, M. Effects of the anaesthetic/tranquillizer treatments on selected plasma biochemical parameters in NZW rabbits. **Laboratory Animals**, v. 37, p. 155-161, 2003.

GONZÁLEZ GIL, A.; SILVAN, G.; ILLERA, M.; ILLERA, J. C. The effects of anesthesia on the clinical chemistry of New Zealand White rabbits. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 25-29, 2004.

GOOTENBERG, P. Between Coca and Cocaine: A Century or More of US-Peruvian Drug Paradoxes, 1860-1980. **The Hispanic American Historical Review**. v. 83, n. 1, p. 119-150, 2003.

GORDH, T.; KARLSTEN, R.; KRISTENSEN, J. Intervention with spinal NMDA, adenosine and NO systems for pain modulation. **Annals of Medicine**. v. 27, p. 229-234, 1995.

GORGULHO, M. **Convivendo com a dependência**. 6º Encontro de Pesquisadores em Saúde Mental e 5º Encontro de Especialistas em Enfermagem Psiquiátrica, Ribeirão Preto, SP, 2000.

GOTARDO, A. T.; HUEZA, I. M.; RASPANTINI, P. C. F.; MAIORKA, P. C. Evaluation of the use of goats as an animal model in *Solanum malacoxylon* toxicity: growing goats and prenatal study. **Annals of Clinical Pathology**, v. 2, p. 1032-1038, 2014.

GOWDA, S.; DESAI, P. B.; KULKARNI, S. S.; HULL, V. V.; MATH, A. A.; VERNEKAR, S. N. Markers of renal function tests. **North American Journal of Medicine & Science**. v. 2, n. 4, p.170-173, 2010.

GOYAL, S.; AMBEKAR, A.; RAY, R. Ketamine dependence in an anesthesiologist: an occupational hazard? **Indian Journal of Psychological Medicine**. v. 36, n. 3, p. 335-337, 2014.

GRINSPOON, L.; BAKALAR, J. B. **Psychedelic Drugs Reconsidered**. Lindesmith, 1997.

GUYTON, A. C. Kidneys and fluids in pressure regulation. Small volume but large pressure changes. **Hypertension**. v. 19, n.1, p. I2-I8, 1992.

GVOZDENOVIC, L. V.; POPOVIC, M. R.; JAKOVLJEVIC, V. S.; LUKIC, V. Effect of fentanyl, ketamine and thalamonal on some biochemical parameters in ethanol-treated and untreated dogs. **Human and Experimental Toxicology**, v. 12, p. 279-283, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: University Press, 1999.

HAMMERSTEDT, H.; CHAMBERLAIN, S. L.; NELSON, S. W.; BISANZO, M. C. Alcohol - related hypoglycemia in rural Uganda: socioeconomic and physiologic contrasts. **International Journal of Emergency Medicine**. p .4-5, 2011.

HAMMOND, D. L.; TYCE, G. M.; YAKSH, T. L Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. **Journal of Physiology**. v. 359, p. 151-162, 1985.

HAN, Y. C.; LIN, T. L.; PRUETT, S. B. Thymic atrophy caused by ethanol in a mouse model for binge drinking: involvement of endogenous glucocorticoids. **Toxicology and Applied Pharmacology**.v. 123, p. 16-25, 1993.

HANSEN, G.; JANSEN, S. B.; CHANDRESH, L.; HILDEN, T. The psychotropic effect of ketamine. **Journal of Psychoactive Drugs**. v. 20, p. 419-425, 1988.

HANSEN, J.; CHERWITZ, D. L.; ALLEN, J. I. The role of tumor necrosis factor-alpha in acute endotoxin-induced hepatotoxicity in ethanol-fed rats. **Hepatology**. v. 20, n.2, p. 461-474, 1994.

HARRISON, N. L.; SIMMONDS, M. A. Quantitative studies on some antagonists of N-Methyl D-Aspartate in slices of rat cerebral cortex. **Brazilian Journal of Pharmacology**. v. 84, p. 381-391, 1985.

HASEGAWA, M.; KINOSHITA, H.; AMANO, T.; HASEGAWA, T.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. MK-801 increases endogenous acetylcholine release in the rat parietal cortex: a study using brain microdialysis. **Neuroscience Letters**. v. 150, p. 53-56, 1993.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders, **Biological Psychiatry**. v. 62, p. 1310-1316, 2007.

HAYASE, T.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, K. Behavioral effects of ketamine and toxic interactions with psychostimulants. **BMC Neuroscience**. v. 7, p. 1-10, 2006.

HAYASHI, Y.; KAWAJI, K.; SUN, I.; ZHANG, X.; KOYANO, K.; YOKOYAMA, T.; KOHSAKA, S.; INOUE, K.; NAKANISHI, H. Microglia Ca^{2+} -activated K^{+} channels are possible molecular targets for the analgesic effects of S-ketamine on neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**. v. 31, p. 17370-17382, 2011.

HEMELRIJCK, J. V.; WHITE, P. Nonopioid intravenous anesthesia. **Clinical Anesthesia**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 312-327, 1997.

HIJAZI, Y.; BOULIEU, R. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. **Drug Metabolism & Disposition**. v. 30, 853-858, 2002.

HIRASAWA, H.; YONEZAWA, T. The effects of ketamine and innovar on the renal cortical and medullary blood flow of the dog. **Anaesthesist**, v. 24, n.8, p. 349-353, 1975.

HIROSE, H.; MARUYAMA, H.; ITO, K.; KIDO, K.; KOYAMA, K.; SARUTA, T. Effects of alpha 2- and beta-adrenergic agonism on glucagon secretion from perfused pancreata of normal and streptozocin-induced diabetic rats. **Metabolism**. v. 42, n. 8, p. 1072-1076, 1993.

HOFFMANN, W. E.; EVERDS, N.; PIGNATELLO, M.; SOLTER, P. F. Automated and semiautomated analysis of rat alkaline phosphatase isoenzymes. **Toxicologic Pathology**, v. 22, n. 6, 1994.

HOFFMAN, W.E.; SOLTER, P. E.; WILSON, B. W.; LOEB, W. F.; QUIMBY, F. W. Clinical enzymology. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. 2 ed. Philadelphia: P. A. Taylor & Francis, 1999. p. 399-444.

HORIO, F.; OZAKI, K.; YOSHIDA, A.; MAKINO, S.; HAYASHI, Y. Requirement for ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 1630-1640, 1985.

HUGHES, P. H.; CONARD, S. E.; BALDWIN, D. C.; STORR, C. L.; SHEEHAN, D. V. Resident physician substance use in the United States. **The Journal of the American Medical Association**. v. 265, p. 2069-2073, 1991.

HUSTVEIT, O.; MAURSET, A.; OYE, I. Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. **Pharmacology and Toxicology**. v. 77, p. 355-359, 1995.

HIRABAYASHI, J.; SATOH, S.; OHYAMA, Y.; KASAI, K. Purification and characterization of β -galactoside-binding proteins from *Caenorhabditiselegans*. **Journal of Biochemistry**. v. 111, p. 553-555, 1992.

IADAROLA, N. D.; NICIU, M. J.; RICHARDS, E. M.; VANDEVOORT, J. L.; BALLARD, E. D.; LUNDIN, N. B.; NUGENT, A C.; MACHADO-VIEIRA, R.; ZARATE, C. A. Ketamine and other N-Methyl-D-aspartate receptor antagonists in the treatment of depression: a perspective review. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**. v. 6, p. 97-114, 2015.

IBRAHIM, M. A.; KHALAF, A. A.; GALAL, M. K. Ameliorative influence of green tea extract on copper nanoparticle-induced hepatotoxicity in rats. **Nanoscale Research Letters**. v. 10, p. 363, 2015.

IKEMOTO, S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 35, n. 2, 129-150, 2010.

IMBERT, L.; BOUCHER, A.; DELHOME, G.; CUETO, T.; BOUDINAUD, M.; MAUBLANC, J.; DULAURENT, S.; DESCOTES, J.; LACHATRE, G.; GAULIER J. Analytical Findings of an Acute Intoxication after Inhalation of Methoxetamine. v. 38, p. 410-415, 2014.

INABA, S. B.; COHEN, W. E. **Drogas: estimulantes, depressores, alucinógenos, efeitos físicos e mentais das drogas psicoativas**. Rio de Janeiro: Zahar, 1991.

IRIFUNE, M.; SATO, T.; KAMATA, Y.; NISHIKAWA, T.; DOHI, T.; KAWAHARA, M. Evidence for GABA(A) receptor agonistic properties of ketamine: Convulsive and anesthetic behavioral models in mice. **Anesthesia & Analgesia**. v. 91, p. 230-236, 2000.

JACKEL, S. S.; MOSBACH, E. H.; BURNS, J. J.; KING, C. G. The synthesis of l-ascorbic acid by the albino rat. **Journal of Biological Chemistry**. v. 186, p. 569-579, 1950.

JAKSCH, W.; LANG, S.; REICHHALTER, R.; RAAB, G.; DANN, K.; FITZAL, S. Perioperative small-dose S(+)-ketamine has no incremental beneficial effects on postoperative pain when standard-practice opioid infusions are used. **Anesthesia and Analgesia**. v. 94 p. 981-986, 2002.

JANG, M.; SHEN, J.; GENG, J.; WANG, H.; CHUANG, S.; LEE, C.; LEE, Y.; W. U. W.; JUAN, Y. Ketamine induced renal fibrosis in a ketamine addition rat model. **Urological Science**.v. 28, p. 123-127, 2017.

JANSEN, K. L. Non-medical use of ketamine. **BMJ Case Reports**, v. 306, p. 601-602, 1993.

JANSEN, K. L. A review of the nonmedical use of ketamine: Use, users and consequences. **Journal of Psychoactive Drugs**. v. 32, p. 419-433, 2000.

JANSEN, K. L.; DARRACOT-CANKOVIC, R. The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. **Journal of Psychoactive Drugs**. v. 33, p. 151-158, 2001.

JANSEN, K. L. R. **Ketamine: Dreams and realities**. 2 ed. London: MAPS, 2004. 355 p.

JENSEN, S. A.; ALMDAL, T. P.; VILSTRUP, H. Acute in vivo effects of low ethanol concentration on the capacity of urea synthesis in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 15, p. 90-93, 1991.

JAREO, P. W.; PREHEIM, L. C.; GENTRY, M. J. Ethanol ingestion impairs neutrophil bactericidal mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 20, p.1646-1652, 1996.

JERRELLS, T. R.; MARIETTA, C. A.; ECKARDT, M. J.; MAJCHROWICZ, E.; WEIGHT, F. F. Effects of ethanol administration on parameters of immunocompetency in rats. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 39, p.499-510, 1986.

JERRELLS, T. R.; SLUKVIN, I.; SIBLEY, D.; FUSELER, J. Increased susceptibility of experimental animals to infectious organisms as a consequence of ethanol consumption. **Alcohol**, p. 425-430, 1994.

JC ONLINE, Jornal do Commercio. Veterinário é preso com mais de 400 comprimidos de ketamina no Recife. JC Online. 2015. Disponível em:<<http://jconline.ne10.uol.com.br/canal/cidades/policia/noticia/2015/01/27/veterinario-e-preso-com-mais-de-400-comprimidos-de-ketamina-no-recife-165738.php>>. Acesso em 14 jul. 2018.

JIAO, D.; LIU, Y.; LI, X.; LIU, J.; ZHAO, M. The role of the GABA system in amphetamine-type stimulant use disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 9, n. 162, p. 1-13, 2015.

JOE-LAIDLER, K.; HUNT, G. Sit down to float: the cultural meaning of ketamine use in Hong Kong. **Addiction Research & Theory**, v.16, n. 3, p. 259-271, 2008.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**.v. 31, p. 434-449, 1998.

JUNGERMAN, F. S.; PALHARES-ALVES, H. N.; CARMONA, M. J.; CONTI, N. B.; MALBERGIER, A. Anesthetic drug abuse by anesthesiologists. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 62; p. 375-386, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12 ed, 2013. 556p.

KANDI, S.; DESHPANDE, N.; RAO, P.; RAMANA, K.V. Alcoholism and its relation to hypoglycemia- An overview. **American Journal of Medicine Studies**. v. 2, n. 3, p. 46-49, 2014a.

KANDI, S.; DESHPANDE, N.; PINNELLI, V. B. K.; DEVAKI, R.; RAO, P.; RAMANA, K.V. Alcoholism and its role in the development of oxidative stress and DNA damage: An insight. **American Journal of Medical Sciences and Medicine**, v. 2, n. 3, p.64-66, 2014b.

KAHN, R. S.; DAVIS, K. L. New developments in dopamine and schizophrenia. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 1193-1201.

KALSI, S. S.; WOOD, D. M.; DARGAN, P. I. The epidemiology and patterns of acute and chronic toxicity associated with recreational ketamine use. **Emerging Health Threats Journal**. v. 4, p. 1-10, 2011.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Does fast dissociation from the dopamine D₂ receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. **American Journal of Psychiatry**. v. 158, p. 360-9, 2001.

KAWAMATA, T.; OMOTE, K.; SONODA, H.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Analgesic mechanisms of ketamine in the presence and absence of peripheral inflammation. **Anesthesiology**. v. 93, p. 520-528, 2000.

KAWASAKI, T.; OGATA, M.; KAWASAKI, C.; INOUE, Y.; SHIGEMATSU, A. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. **Anesthesia & Analgesia**. v. 89, p. 665-669, 1999.

KENNA, G. A.; LEWIS, D. C. Risk factors for alcohol and other drug use by healthcare professionals. **Substance Abuse Treatment, Prevention and Policy**. v.3, n.3, 2008.

KIEFER, S.W.; DOPP, J. M. Taste reactivity to alcohol in rats. **Behavioral Neuroscience**. v. 103, n.6, p. 1318-26, 1989.

KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7 ed. New York: McGraw-Hill, 2008. 1309 p.

KNABLE, M. B.; WEINBERGER, D. R. Dopamine, the pre-frontal cortex and schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**. v. 11, p. 123-236, 1997.

KNAPP, D. J.; CREWS, F. T. Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 23, p.1-11, 1999.

NOBLOCH, M.; PORTIER, C. J.; LEVIONNOIS, O. L.; THEURILLAT, R.; THORMANN, W.; SPADAVECCHIA, C.; MEVISSSEN, M. Antinociceptive effects, metabolism and disposition of ketamine in ponies under target-controlled drug infusion. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 216, p. 373-386, 2006.

KNOFLACH, F.; KEMP, J. A. Metabotropic glutamate group II receptors activate a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ current in neurones of the rat cerebellum. **The Journal of physiology**. v. 509, p. 347-354, 1998.

KELLY, K. The little book of ketamine. **Little book series**. 1 ed. California: Ronin Publishing, 1999. 96 p.

KIKUCHI, T.; WANG, Y.; SHINBORI, H.; SATO K.; OKUMURA, F. Effects of ketamine and pentobarbitone on acetylcholine release from the rat frontal cortex in vivo. **British Journal of Anaesthesia**. v. 79, p. 128-130, 1997.

KIM, K. J. The effect of ethanol administration on the immune response of mice. **Journal of Korean Academic Society of Nursing**. v. 21, n. 1, p. 5-15, 1991.

KIM, C. Y.; LEE, H. S.; HAN, S. C.; HEO, J. D.; KWON, M. S.; HA, C. S.; HAN, S. S. Hematological and serum biochemical values in Cynomolgus monkeys anesthetized with ketamine hydrochloride. **Journal of Medical Primatology**, v. 34, n. 2, p. 96-100, 2005.

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; CIRIMELE, V.; LUDES, B. GHB in post-mortem toxicology. Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens. **Forensic Science International**. v. 143, p. 177-178, 2004.

KODENTSOVA, V. M.; VRZHESSINSKAIA, O. A.; MAZO, V. K. Vitamins and oxidative stress. **Voprosy Pitaniia**, v. 82, n. 3, p. 11-18, 2013.

KOHN, D. F.; CLIFFORD, C. B. BIOLOGY AND DISEASES OF RATS. IN: FOX, J. G.; ANDERSON, L. C.; LOEW, F. M.; QUIMBY, F. W. **Laboratory animal medicine**. 2 ed. New York: Academic Press, 2002. p. 121-165.

KOHR, R.; DURIEUX, M. E. Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks. **Anesthesia and Analgesia**. v. 87, p. 1186-1193, 1998.

KOOB GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 13, p. 77-185, 1992.

KREBS, H. A.; HEMS, R.; LUND, P. Accumulation of amino acids by the perfused rat liver in the presence of ethanol. **Biochemical Journal**. v. 134, p. 697-705, 1973.

KRYSTAL, J. H. Ketamine and the potential role for rapid-acting antidepressant medications. **Swiss Medical Weekly**, v. 137, p. 215-216, 2007.

KUNTSCHKE, E.; KNIBBE, R.; GMEL, G.; ENGELS, R. "I drink spirits to get drunk and block out my problems..." - Beverage preference, drinking motives, and alcohol use in adolescence. **Alcohol and Alcoholism**. v. 41, p. 566-573, 2006.

KUZMIN, A.; LILJEQUIST, S.; MEIS, J.; CHEFER, V.; SHIPPENBERG, T.; BAKALKIN, G. Repeated moderate-dose ethanol bouts impair cognitive function in Wistar rats. **Addiction Biology**. v. 17, n. 1, p. 132-140, 2012.

KWON, S. K.; KIM, S. J.; KIM, K.; KIM, S. M.; KIM, H. Ethanol induced urine acidification is related with early acetaldehyde concentration. **Kidney Research and Clinical Practice**. v. 33, n. 2, p. 1-7, 2014.

LACERDA, R. B. de.; NOTO, A. R. Drogas perturbadoras (maconha, LSD-25, êxtase e outros): efeitos agudos e crônicos. Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas (SENAD). **Ministério da Justiça e Cidadania. Sistema para detecção do Uso abusivo e dependência de substâncias Psicoativas: Encaminhamento, intervenção breve, Reinserção social e Acompanhamento (SUPERA) - Módulo 2 - Efeitos das Substâncias Psicoativas**. Brasília: SENAD, 11 ed., 2017.

LANG, T. J. Estrogen as an immunomodulator. **Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 224-230, 2004.

LANKENAU, S. E.; CLATTS, M. C. Patterns of polydrug use among ketamine injectors in New York City. **Substance Use and Misuse**, v. 40, p. 1381-1397, 2005.

LANKVELD, D. P. K.; BULL, S.; VAN DIJK, P.; FINK-GREMMELS, J.; HELLEBREKERS, L. J. Ketamine inhibits LPS-induced TNF alpha and interleukin-6 in an equine macrophage cell line. **Veterinary Research**. v. 36, p. 257-262, 2005.

LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S. Abuso e dependência de álcool e drogas. **Manual de psiquiatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 84-89, 1996.

LARANJEIRA, R.; SURJAN, J. Conceitos básicos e diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Dependência Química**. v. 2, p. 2-6, 2001.

LARUE-ACHAGIOTIS, C.; MARTIN, C.; VERGER, P.; LOUIS-SYLVESTRE, J. Dietary self-selection vs. complete diet: body weight gain and meal pattern in rats. **Physiology & Behavior**.v. 51, p. 995-999, 1992.

LATVALA, J.; PARKKILA, S.; NIEMELÄ, O. Excess alcohol consumption is common in patients with cytopenia: Studies in blood and bone marrow cells. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 28, n. 4, p. 619-624, 2004.

LAWRENCE, C. Shock central: veterinarian suicides. **The Horsemen's Corral Magazine**. Connecticut. 2005.

LEBEAU, M. A.; MOZAYANI, A. **Drug-facilitated sexual assault**. A Forensic Handbook. London: Academic Press. 2001.

LEE, S. T.; WU, T. T.; YU, P. Y.; CHEN, R. M. Apoptotic insults to human HepG₂ cells induced by S-(+)-ketamine occurs through activation of a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. **Brazilian Journal of Anesthesiology**. v. 102, p. 80-89, 2009.

LEFÈVRE, A. F.; DeCARLI, L. M.; LIEBER, C. S. Effect of ethanol on cholesterol and bile acid metabolism. **Journal of Lipid Research**.v. 13, p. 48-55, 1972.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression, **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 36, p. 764-785, 2012.

LEVITT, M. D. Review article: Lack of clinical significance of the interaction between H₂-receptor antagonists and ethanol. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 7, p.131-138, 1993.

LI, J. H.; VICKNASINGAM, B.; CHEUNG, Y. W.; ZHOU, W.;NURHIDAYAT, A. W.; JARLAIS, D. C.; SCHOTTENFELD, R. To use or not to use: An update on licit and illicit ketamine use. **Substance Abuse and Rehabilitation**, v.2, n. 1, p. 11-20, 2011.

LIEBER, C. C.; JONES, D. P.; DeCARLI, L. M. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. **Journal of Clinical Investigation**. v. 44, n. 6, p. 1009-1021, 1965.

LIEBER, C. S.; DeCARLI, L. M. Hepatic microsoma ethanol oxidizing system: in vitro characteristics and adaptive properties in vivo. **Journal of Biological Chemistry**. v. 245, p. 2505-2512, 1970.

LIEBER, C. S. To drink (moderately) or not to drink? **New England Journal of Medicine**. v. 310, n. 13, 846-848, 1984.

LIEBER, C. S.; PIGNON, J. P. Ethanol and lipids. In:Fruchart, I. C.; Shepherd, J. Human plasma lipoproteins: chemistry, physiology and pathology. Berlin, New York: Walter De Gruyter and Co., p. 245-280, 1989.

LIEBER, C. S. Medical disorders of alcoholism. **New England Journal of Medicine**. v. 333, p. 1058-1065, 1995.

LIEBER, C. S. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years (1968-1998) - A review. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**. v. 23, p. 991-1007, 1999.

LIEBER, C. S. Perspectives: do alcohol calories count? **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 54, p. 976-982, 1991a

LIEBER, C. S. Metabolism of ethanol and associated hepatotoxicity. **Drug and Alcohol Review**. v. 10, p. 15-202, 1991b.

LIEBER, C. S. Alcohol and the liver: Metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. **The Mount Sinai Journal of Medicine**. v. 67, p.84-94, 2000.

LIU, Y. K. Effects of alcohol on granulocytes and lymphocytes. **Seminars in Hematology**. v. 17, n. 2, p. 130-136, 1980.

LIU, F.; TUCKER, A. P.;SADOVOVA, N.; ZHANG, X.; SHULIANG, L.; XIAOJU, Z.; HANIG, J. P.; PAULE, M. G.; SLIKKER JR., W.; WANG, C. Ketamine-Induced Neuronal Damage and Altered N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function in Rat Primary Forebrain Culture. **Toxicological Sciences**. v. 131, n. 2, p. 548-557, 2013.

LIU, K.; CHUANG, S.; LONG, C.; LEE, Y.; WANG, C.; LU, M.; LIN, R.; LU, J.; JANG, M.; WU, W.; HO, W.; JUAN, Y. Ketamine-induced ulcerative cystitis and bladder apoptosis involve oxidative stress mediated by mitochondria and the endoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**. v. 309, p.318-331, 2015.

LO, R. S.; KRISHNAMOORTHY, R.; FREEMAN, J. G.; AUSTIN, A. S. Cholestasis and biliary dilatation associated with chronic ketamine abuse: a case series. **Singapore Medical Journal**. v. 52, n. 3, p. 52-55, 2011.

LOCKWOOD, B. **Ketamine: Dangerous Hallucinogen**. The Rosen Publishing Group, 2006. 64 p.

LODGE, D.; JOHNSON, K. M. Noncompetitive excitatory amino acid antagonists. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 11, p. 81-86, 1990.

LOVINGER, D. M. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**. v. 17, p. 19-27, 1993.

LOVINGER, D. M.; McCOOL, B. A. Metabotropic glutamate receptor-mediated presynaptic depression at corticostriatal synapses involves mGluR2 or 3. **Journal of neurophysiology**. n. 73, v. 3, p. 1076-1083, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biochemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, A. Y. H.; JUNK, K. W.; COON, M. Resolution of the cytochrome P-450 containing w-hydroxylation system of liver microsomes into three components. **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 3714-3721, 1969.

LUFT, A.; MENDES, F. F. S(+) Cetamina em Baixas Doses: Atualização. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 55, p.460-409, 2005.

MacGREGOR, R. R.; SAFFORD, M.; SHALIT, M. Effect of ethanol on functions required for the delivery of neutrophils to sites of inflammation. **Journal of Infectious Diseases**. v.157, n. 4, p. 682-689, 1988.

MACIEIRA, M. S.; ALMEIDA, W. G.; SILVA, E. A.; SCHENBERG, L. C.; NAKAMURA-PALACIOS E. M. Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent intake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 30, p. 1107-1111, 1997.

MACRAE, E. **Antropologia: aspectos sociais, culturais e ritualísticos**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 25-34.

MADSEN, N. B.; TUBA, J. On the source of the alkaline phosphatase in rat serum. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 195, p. 741-750, 1952.

MAJCHROWICZ, E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. **Psychopharmacologia**. v. 43, p. 245-254, 1975.

MAJUMDAR, S. K.; SHAW, G. K; O'GORMAN, P.; THOMSON, A. D. Plasma urea and creatinine status in chronic alcoholics. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 9, p. 97-100, 1982.

MAKI, T.; TOIVONEN, L.; KOSKINEN, P.; NAVERI, H.; HARKONEN, M.; LEINONEN, H. Effect of ethanol drinking, hangover, and exercise on adrenergic activity and heart rate variability in patients with a history of alcohol-induced atrial fibrillation. **American Journal of Cardiology**. v. 82, n. 3, p. 317-322, 1998.

MANN, J. J. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. **Neuropsychopharmacology**. v. 21, n. 2, p. 99S-105S, 1999.

MANSOURI, A.; GAOU, I.; DEKERGUENEC, C.; AMSELLEM, S.; HAOUZI, D.; BERSON, A.; MOREAU, A.; FELDMANN, G.; LETTÉRON, P.; PESSAYRE, D.; FROMENTY, B. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. **Gastroenterology**. v. 117, p. 181-190, 1999.

MARIN, P.; QUIGNARD, J. F.; LAFON-CAZAL, M.; BOCKAERT, J. Non-classical glutamate receptors, blocked by both NMDA and non-NMDA antagonists, stimulate nitric oxide production in neurons. **Neuropharmacology**. v. 32, p.29-36, 1993.

MARTIN, D. C.; INTRONA, R. P.; ARONSTAM, R. S. Inhibition of neuronal 5-HT uptake by ketamine, but not halothane, involves disruption of substrate recognition by the transporter. **Neuroscience Letters**. v. 112, p. 99-103, 1990.

MASTERS, S. B. **The Alcohols**. KATZUNG, B. G.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A. J. Basic & Clinical Pharmacology. 12 ed. New York: McGraw-Hill, p. 389-399, 2012.

MASU, M.; TANABE, Y.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature**. n. 349, v. 6312, p. 760-765, 1991.

MATSUMOTO, H.; FUKUI, Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. **Addiction Biology**. v. 7, p.5-14, 2002.

MAVADATI, A. H.; HABIBIAN, R.; DENGHANI, S. N. Comparison of the effect of different anaesthetics on rabbit plasma biochemical parameters. **Research Opinion in Animal and Veterinary Science**, v. 1, n. 6, p. 339-343, 2011.

MAY, J. M.; QU, Z. C.; WHITESELL, R. R.; COBB, C. E. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, n. 4, p. 543-551, 1996.

MAY, J. M.; QU, Z.; MORROW, J. D. Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1528, p. 159-166, 2001.

McAULIFFE, W. E.; ROHMAN, M.; SANTANGELO, S.; FELDMAN, B.; MAGNUSON, E.; SOBOL, A. Psychoactive drug use among practicing physicians and medical students. **New England Journal of Medicine**. v. 315 p. 805-810, 1986.

McAULIFFE, W. E.; SANTANGELO, F.; MAGNUSON, E.; SOBOL, A.; ROHMAN, M.; WEISSMAN, J. Risk factors in drug impairment in random samples of physicians and medical students. **The International Journal of the Addictions**. v. 22, n. 9, p. 825-841, 1987.

McBRIDE, W. J.; LOVINGER, D. M.; MACHU, T.; THIELEN, R. J.; RODD, Z. A.; MURPHY, J. M.; ROACHE, J. D.; JOHNSON, B. A. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**. v. 28, p. 257, 2004.

McCARTHY, D. A.; CHEN, G.; KAUMP, D. H.; ENSOR, C. General anesthetic and other pharmacologic properties of 2(o-chlorophenyl)-2-methylaminocyclohexanone HCl (CI-581). **Journal of New Drugs**. v. 5, p. 21-33, 1965.

McCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 6049-6055, 1969.

McDOUGLE, C. J.; KRYSTAL, J. H.; PRICE, L. H.; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S. Noradrenergic response to acute ethanol administration in healthy subjects: comparison with intravenous yohimbine. **Psychopharmacology**. v. 118, n. 2, p. 127-135, 1995.

McGOVERN, P. E.; FLEMING, S. J.; KATZ, S. H. **The origins and ancient history of wine: food and nutrition in history and antropology**. Londres: Taylor & Francis Ltd, v. 1, n. 1, 1996.

McGOVERN, M. P.; ANGRES, D. H.; LEON, S. Characteristics of physicians presenting for assessment at a behavioral health center. **Journal of Addictive Diseases**. v. 19, n. 2, p. 59-73, 2000.

McINTOSH, C.; CHICK, J. Alcohol and the nervous system. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 75, n. 3, 2004.

MENEGUZ, A.; FORTUNA, S.; LORENZINI, P.; VOLPE, M. T. Influence of urethane and ketamine on rat hepatic cytochrome P450 *in vivo*. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 51, p. 392-396, 1999

MELLER, S. T. Ketamine: relief from chronic pain through actions at the NMDA receptor? **Pain**. v. 68, p. 435-436, 1996.

MICHOT, F.; GUT, J. Alcohol-Induced Bone Marrow Damage - A Bone Marrow Study in Alcohol-Dependent Individuals. **Acta Haematologica**. v. 78, p. 252-257, 1987.

MILLER, J. W.; NAIMI, T. S.; BREWER, R. D.; JONES, S. E. Binge drinking and associated health risk behaviors among high school students. **Pediatrics**. v. 119, p. 76-85, 2009.

MIRZAEI, A.; MIRZAEI, N.; ALAMDARI, A. Effects of chronic ethanol consumption on biochemical parameters and oxidative stress on rat. **Indian Journal of Science and Technology**. v. 8, n. 25, p. 1-5, 2015.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; MAEDA, K.; ASHBY JR., C. R.; KAWAHARA, R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 30, p. 1155-1158, 2006.

MIYAZAKI, M.; UTSUMI, K.; SATO, J. Mechanisms responsible for long-term survival of adult rat hepatocytes in the presence of phenobarbital in primary culture. **Experimental Cell Research**. v. 182, p. 415-424, 1989.

MIYAMOTO, S.; MAILMAN, R. B.; LIEBERMAN, J. A.; DUNCAN, G. E. Blunted brain metabolic response to ketamine in mice lacking D (1A) dopamine receptors. **Brain Research**. v. 894, p. 167-180, 2001.

MOGHADDAM, B. Stress preferentially activates extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: a comparison to hippocampus and basal ganglia. **Journal of Neurochemistry**. v. 60, p. 1650-1657, 1993.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience**. v. 17, p. 2921-2927, 1997.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B. W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. **Science**. v. 281, p. 1349-1352, 1998.

MOLINA, P. E.; HAPPEL, K. I.; ZHANG, P.; KOLLS, J. K.; NELSON, S. Focus on: alcohol and immune system. **Alcohol and health**, v. 33, n. 1, p. 97-108, 2010.

MOMENI, S.; ROMAN, E. Subgroup-dependent effects of voluntary alcohol intake on behavioral profiles in outbred Wistar rats. **Behavioural Brain Research**. v. 275, p. 288-296, 2014.

MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. Types of Alcoholic Beverages Usually Consumed by Students in 9th - 12th Grades - Four States, 2005. **Centers for Disease Control and Prevention**. v. 56, n. 29, p. 737-740, 2007. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5629a3.htm>>. Acesso em 10 abr. de 2018.

MOORE, K. A.; KILBANE, E. M.; JONES, E. R.; KUNSMAN, G. W.; LEVINE, B.; SMITH, M. Tissue distribution of ketamine in a mixed drug fatality. **Journal of Forensic Sciences**. v. 2, p. 1183-1185, 1997.

MOORE, K. A.; SKLEROV, J.; LEVINE, B.; JACOBS, A. J. Urine concentrations of ketamine and norketamine following illegal consumption. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 25, p. 583-588, 2001.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; DOS SANTOS, D. B.; ANTUNES, A.; DAUFENBACH, J. F.; MANOSSO, L. M.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **Journal of Molecular Neuroscience**. V. 49, p. 68-79, 2013.

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**. v. 104, p. 77-87, 2009.

MORGAN, C. J. A.; CURRAN, H. V. Ketamina use: a review. **Addiction**. v. 107, p. 27-38, 2011.

MOSSNER, R.; MIKOVA, O.; KOUTSILIERI, E.; SAOUD, M.; EHLIS, A. C.; MÜLLER, N.; FALLGATTER, A. J.; RIEDERER, P. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. **World Journal of Biological Psychiatry**. v. 8, p. 141-174, 2007.

MÖSSNER, L. D.; SCHMITZ, A.; THEURILLAT, R.; THORMANN, W.; MEVISSEN, M. Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs, and humans. **American Journal of Veterinary Research**. v. 72, p. 1505-1513, 2011.

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 and Alcohol Dependence**. v. 95, p. 219-229, 2008.

MUIR, W. W. Physiology and pathophysiology of pain. **Handbook of veterinary pain management**. 2 ed. St. Louis Missouri: Mosby Elsevier, 2009. p. 14.

NAGY, J. Alcohol related changes in regulation of NMDA receptor functions. **Current Neuropharmacology**. n. 6, p. 39-54, 2008.

NAKAO, S.; HARADA, M.; KONDO, K.; MIZUSHIMA, N.; MATSUDA, T. Reversible bone marrow hypoplasia induced by alcohol. **American Journal of Hematology**. v. 37, n. 2, p. 120-123, 1991.

NARISAWA, S.; WENNBURG, C.; MILLÁN, J. L. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. **The Journal of Pathology**. v. 193, n. 1, p. 125-133, 2001.

NAYAK, N. C.; SATHAR, S. A.; MUGHAL, S.; DUTTAGUPTA, S.; MATHUR, M.; CHOPRA, P. The nature and significance of liver cell vacuolation following hepatocellular injury - an analysis based on observations on rats rendered tolerant to hepatotoxic damage. **Virchows Archives**. v. 428, p. 353-365, 1996.

NELSON, S.; BAGBY, G.; SUMMER, W. R. Alcohol suppresses lipopolysaccharide- induced tumor necrosis factor activity in serum and lung. **Life Sciences**, v. 44, p. 673-676, 1989.

NELSON, S.; SUMMER, W.; BAGBY, G.; NAKAMURA, C.; STEWART, L.; LIPSCOMB, G.; ANDRESEN, J. Granulocyte colony-stimulating factor enhances pulmonary host defenses in normal and ethanol treated rats. **Journal of Infectious Diseases**. v. 164, n. 5, p. 901-906, 1991.

NIAAA. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Council Approves Definition of Binge Drinking. **NIAAA Newsletter**. v. 3, 2004.

NICASTRI, S.; RAMOS, S. D. P. Prevenção do uso de drogas. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**. v. 2, n. 1, p. 25-29, 2001.

NICHOLS, M. L.; DELCONTE, J. D.; WILD, K. D.; HUBBELL, C. L.; REID, L. D. Rats' intakes of different alcoholic beverages. **Novel Pharmacological Interventions for Alcoholism**. v. 3, p. 232-236, 1992.

NIDA. National Institute on Drug Abuse. Commonly Abused Drug Charts. 2002. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/drugs-abuse/commonly-abused-drugs-charts>>. Acesso em 14 jul 2018.

NIE, J.; HOU, F. F. Role of reactive oxygen species in the renal fibrosis. **Chinese Medical Journal**. v. 125, n. 14, p. 2598-2602, 2012.

NIE, Z.; ZORRILLA, E. P.; MADAMBA, S. G.; RICE, K. C.; ROBERTO, M.; SIGGINS, G. R. Presynaptic CRF1 receptors mediate the ethanol enhancement of GABAergic transmission in the mouse central amygdala. **Scientific World Journal**. v. 18, p. 68-85, 2009.

NIH. National Institute of Health. Bone marrow, thymus and blood: changes across the lifespan. NIH Public Access. **Aging Health**. v. 5, n. 3, p. 385-393, 2009.

NISHIMURA, M.; SATO, K.; OKADA, T.; YOSHIYA, I.; SCHLOSS, P.; SHIMADA, S.; TOHYAMA, M. Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. **Anesthesiology**. v. 88, p. 768-774, 1998.

NOPPERS, I.; NIESTERS, M.; AARTS, L.; SMITH, T.; SARTON, E.; DAHAN, A. Ketamine for the treatment of chronic non-cancer pain. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 11, p. 2417-2429, 2010.

NOPPERS, I. M.; NIESTERS, M.; AARTS, L. P.; BAUER, M. C.; DREWES, A. M.; DAHAN, A.; SARTON, E. Y. Drug-induced liver injury following a reported course of ketamine treatment for chronic pain in CRPS type I patients. A report on 3 cases. **Pain**. v. 152, p. 2173-2178, 2011.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Guidelines for testing of chemicals** Test No. 407, 2008. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd407-2008.pdf>>. Acesso em: 11 abr. de 2018.

OGLE, W. Statistics of mortality in the medical profession. **MedicoChirurgical Transactions**. v. 69, p. 218-237, 1886.

OHMURA, M.; KONDO, A.; SAITO, M. Effects of ethanol on responses of isolated rabbit urinary bladder and urethra. **International Journal of Urology**. v. 4, n. 3, p. 295-299, 1997.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GARCIA, J. B. S. Cetamina e Analgesia Preemptiva. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 54, n.5, p.739-752, 2004.

OLNEY, J.W. Endogenous excitotoxins and neuropathological disorders. **Excitatory amino acids in health and disease**. England: John Wiley & Sons, 1988. p. 337-351.

OLSEN, R. W.; LI, G. D. GABA_A receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. **Canadian Journal of Anesthesia**. v. 58, p. 206-215, 2011.

ORTH, A. P. S.; MOREÍ, C. L. O. O. Funcionamento de famílias com membros dependentes de substâncias psicoativas. **Psicologia Argumento**. v. 26, n.55, p. 293-303, 2008.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**.v. 12, p. 913-922, 2007.

OYE, I.; PAULSEN, O.; MAURSET, A. Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-Methyl-D-Aspartate receptors. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 260, p. 1209-1213, 1992.

PADDLEFORD, R. R. Analgesia and Pain Management. **Manual of Small Animal Anesthesia**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p. 227-246.

PANASIUK, A.; KEMONA, A. Bone marrow failure and hematological abnormalities in alcoholic liver cirrhosis.**Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku**. v. 46, p. 100-105, 1995.

PARROTT, A.; MORINAN, A.; MOSS, M.; SCHOLEY, A. Understanding drugs and behaviour. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. 336 p.

PASSAGLI, M. Toxicologia forense: teoria e prática. 3ed. Campinas: Millennium Editora, 2011. 552 p.

PATEL, M. Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 37, n. 9, p. 768-778, 2016.

PAUL, R.; KINGSTON, R.; TSANACLIS, L.; BERRY, A.; GUWY, A. Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medicolegal cases. **Forensic Science International**. v. 176, p. 82-86, 2008.

PEKOE, G. M.; SMITH, D. J. The involvement of opiate and monoaminergic neuronal systems in the analgesia effects of ketamine. **Pain**. v. 12, p. 57-73, 1982.

PETERS, A.; DAVIES, T.; Richardson, A. Multi-site samples of injecting drug users in Edinburgh: prevalence and correlates of risky injecting practices. **Addiction**, v. 92, n. 2, p. 253-267, 1998.

PETRILLI, J. F.; BUENO S. M. V. Uso de substâncias psicoativas entre michês: subsídios para análise de sua vulnerabilidade às DST/AIDS. **6º Encontro de Pesquisadores em Saúde Mental e 5º Encontro de Especialistas em Enfermagem Psiquiátrica**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2000.

PERUMAL, N.; RAMASAMY,V.; KUMAR, M. J. M.; MAJUMDAR, S. S. Effects of ketamine and thiopentone anesthesia on serum lipid parameters in adult bonnet monkeys (*Macaca radiata*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 46, n. 3, p. 21-23, 2007.

PIETRASZEK, M. Significance of dysfunctional glutamatergic transmission for the development of psychotic symptoms. **Polish Journal of Pharmacology**. v. 55, p. 133-54, 2003.

PITTENGER, C.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J. H. The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**. v. 6. p. 101-115, 2007.

PLENNINGER, E. G.; DURIEUX, M. E.; HIMMELSEHER, S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. **Anesthesiology**. v. 96, p.357-366, 2002.

POPOVA, S.; REHM, J.; PATRA, J.; ZATONSKI, W. Comparing alcohol consumption in central and eastern Europe to other European countries. **Alcohol and Alcoholism**. v. 42, p. 465-473, 2007.

POPIK, P.; KOS, T.; ZHANG, Y.; BISAGA, A. Memantine reduces consumption of highly palatable food in a rat model of binge eating. **Amino Acids**. v. 40, n. 2, p. 477-485, 2011.

POZZI, A.; MUIR, W. W.; TRAVERSO, F. Prevention of central sensitization and pain by N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonists. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 228, p. 53-60. 2006.

PUBCHEM. PubChem Source Information. Open Chemistry Database. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 11 jun. 2018.

PRASAD, J. S.; CRANKSHAW, D. L.; ERICKSON, R. R.; ELLIOTT, C. E.; HUSBY, A. D.; HOLTZMAN, J. L. Studies on the effect of chronic consumption of moderate amounts of ethanol on male rat hepatic microsomal drug-metabolizing activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 34, p. 3427-3431, 1985.

PRENTICE, A. M. The thymus: A barometer of malnutrition. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 81, p. 345-347, 1999.

PRUETT, S. B.; HAN, Y. C.; WU, W. J. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol: Involvement of neuroendocrine pathways. **Alcohol**, p. 431-437, 1994.

PRUETT, S. B.; ZHENG, Q.; FAN, R.; MATTHEWS, K.; SCHWAB, C. Acute exposure to ethanol affects toll-like receptor signaling and subsequent responses: an overview of recent studies. **Alcohol**. v. 33, p.235-239, 2004.

QUESSADA, A. M., DA SILVA, A. M. M., DRUMOND, K. O., DE SOUSA, J. M., RODRIGUES, M. C., ALMENDRA, S. R. de S. Comercialização de Cetamina em Estabelecimentos Veterinários em Teresina - PI. **Ciência Biologia e Saúde**. v. 11, n. 1, p. 51-52, 2009.

QUIBELL, R.; PRUMMER, E. C.; MIHALYO, M.; TWYLCROSS, R.; WILCOCK, A. **Journal of Pain and Symptom Management**. v. 41, p. 640-649, 2011.

RAEDER, J. C.; STENSETH, L. B. Ketamine: a new look at an old drug. **Current Opinion in Anaesthesiology**. v. 13, p. 463-468, 2000.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**. v. 533, n. 1-3, p. 222-239, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1939 p.

RAO, T.S.; KIM, H.S.; LEHMAN, J. WOOD, P. Differential effects of phencyclidine (PCP) and ketamine on mesocortical and mesostriatal dopamine release in vivo. **Life Sciences**. v. 45, p. 1067-1072, 1989.

REEKER, W.; WERNER, C.; MÖLLENBERG, O.; MIELKE, L.; KOCHS, E. High-dose S(+)-ketamine improves neurological outcome following incomplete cerebral ischemia in rats. **Canadian Journal of Anesthesia**. v. 47, p. 572-578, 2000.

REHM, J.; MATHERS, C.; POPOVA, S.; THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANANON, Y.; PATRA, J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. **The Lancet**. v. 373, n. 9682, p. 2223-2233, 2009.

REICHENHEIM, M. E.; HASSELMANN, M. H.; MORAES, C. L. Consequências da violência familiar na saúde da criança e do adolescente: contribuições para a elaboração de propostas de ação. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 4, n. 1, p. 109-121, 1999.

RÉUS, G. Z.; NACIF, M. P.; ABELAIRA, H. M.; TOMAZ, D. B.; DOS SANTOS, M. A.; CARLESSI, A. S.; DA LUZA, J. R.; GONÇALVES, R. C.; VUOLO, F.; DAL-PIZZOL, F.; CARVALHO, A. F.; QUEVEDO, J. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 83-87, 2015.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.

REZENDE, M. M. **Curto-circuito familiar e drogas: análise de relações familiares e suas implicações na farmacodependência**. Cabral Editora Universitária, 1997.

REZENDE, M.; MAMA, K. Anesthesia for Patients with Renal Disease. **Clinician's Brief**, p. 41-44, 2015.

REZIN, G. T.; GONÇALVEZ, C. L.; DAUFENBACH, J. F.; FRAGA, D. B.; SANTOS, P. M.; FERREIRA, G. K.; HERMANI, F. V.; COMIM, C. M.; QUEVEDO, J.; STRECK, E. L. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 418-421, 2009.

RIBEIRO, M. S.; VARGAS, E. V.; ALVES, M. J. M.; GUIMARÃES, L. S.; MOREIRA, G. M. O consumo de substâncias psicoativas em Juiz de Fora - MG. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 48, p. 405-413, 1999.

RIBEIRO, M.; DUNN, J.; SESSO, R.; COSTA DIAS, A.; LARANJEIRA, R. **Causes of death among crack cocaine users**. Revista Brasileira de Psiquiatria, v.28, n.3, p.196-202, 2006.

RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. **O tratamento do usuário de crack**. 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

RICHTER, L.; DE GRAAF, C.; SIEGHART, W.; VARAGIC, Z.; MÖRZINGER, M.; de ESCH, I. J.; ECKER, G. F.; ERNST. Diazepam-bound GABA_A receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. **Nature Chemical Biology**. v. 8, n.5, p. 455-464, 2012.

RIMM, E.B.; WILLIAMS, P.; FOSHER, K.; CRIQUI, M.; STAMPFER, M. J. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. **BMJ**, v. 319, p. 1523-1528, 1999.

RIVIER, C. Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanisms of action and interactions with other stimuli. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 20, n. 2, p. 240-254, 1996.

ROBERTO, M.; MADAMBA, S. G.; STOUFFER, D. G.; PARSONS, L. H.; SIGGINS, G. R. Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. **Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 45, p. 10159-10166, 2004.

ROFAEL, H. Z. Effect of ketamine pretreatment on cocaine-mediated hepatotoxicity in rats. **Toxicology Letters**. v. 152, p. 213-222, 2004.

ROMMANELII, F.; SMITH, K. M. X Liquid E, and Special K - the abuse of drugs at clubs and raves. **American Journal of Pharmaceutical Education**. v. 66, p. 195-199, 2002.

ROSA, J.; RUBIN, E. Effects of ethanol on amino acid uptake by rat liver cells. **Laboratory Investigation**. v. 43, p. 366-372, 1980.

ROSSETTI, Z. L.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G. L. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 221, p. 227-234, 1992.

ROVIROSA-HERNÁNDEZ, M. J.; GARCÍA-ORDUÑA, F.; CABA, M.; CANALES-ESPINOSA, D. HERMIDA-LAGUNES, J.; TORRES-PELAYO, V. R. Blood parameters are little affected by time of sampling after the application of ketamine in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). **The Journal of Medical Primatology**, v. 40, p. 294-299, 2011.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. ChemSpider - Search and share chemistry. Ketamine hydrochloride, 2015. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em 13 jul. 2018.

RUBIN, E.; LIEBER, C. S. 1967. Early fine structural changes in the human liver induced by alcohol. **Gastroenterology**. v. 52, p.1-13, 1967.

RUCKER, R. B.; MORRIS, J.; FASCETTI, A. J. Vitamins. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press. 6 ed, 2008. p. 695-730.

SAITO, M.; WEIN, A. J.; BRODERICK, G. A.; HYPOLITE, J. A.; LEVIN, R. M. Pharmacologic effects of ethanol on the function of rabbit corporeal cavernosal tissue. **Pharmacology**. v. 48, n. 5, p. 335-340, 1994.

SALASPURO, M. P.; LIEBER, C. S. Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggeration after chronic consumption. **Annals of Clinical Research**. v. 10, p. 294-297, 1978.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.360, n. 1, p. 201-205, 2017.

SALMAN, A. E.; DAL, D.; SALMAN, M.A.; ISKIT, A. B.; AYPAR, U. The effect of ketamine on acute muscular ischaemia reperfusion in rats. **European Journal of Anaesthesiology**. v. 22, n.9, p. 712-716, 2005.

SAMSON, H. H. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**. v. 10, n.4, p. 436-42, 1986.

SAMSON, H.; FILES, F.; BRICE, G. Patterns of ethanol consumption in a continuous access situation: the effect of adding a sweetener to the ethanol solution. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**. v. 20, n. 1, p. 101-109, 1996.

SANTANGELO, F.; WITKO-SARSAT, V.; DRUEKE, T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 19, p. 1951-1955, 2004.

SANTHAKUMAR, V.; WALLNER, M.; OTIS, T. S. Ethanol acts directly on extra synaptic of GABA_A receptors to increase tonic inhibition. **Alcohol**. v. 41, p. 211-221, 2007.

SARKER, M. R.; GOHDA, E. Promotion of anti-keyhole limpet hemocyaninIgM and IgG antibody productions in vitro by red bell pepper extract. **Journal of Functional Foods**. v. 5, n. 4, p. 1918-1926, 2013.

SATO, K.;WU, J.; KIKUCHI, T.; WANG, Y.; WATANABE, I.; OKUMURA, F. Differential effects of ketamine and pentobarbitone on acetylcholine release from the rat hippocampus and striatum. **British Journal of Anaesthesia**. v. 77, p. 381-384, 1996.

SCHATZMANN, U.; GIRARD, P. Anesthesia in the horse. **Tierärztliche Praxis**, v. 12, n. 3, p. 323-328, 1984.

SCHIEPERS, O. J.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression, **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 29, p. 201-217, 2005.

SCHIMID, R. L.; SANDLER, A. N.; KATZ, J. Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes. **Pain**. v. 82, p. 111-125, 1999.

SCHUCKIT, M. A. Alcohol-use disorders. **Lancelot Medical Centre**, v. 373, p.492-501,2009.

SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A.; PILEGGI, A. Fundamentos de Toxicologia, 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 389-403.

SEITZ, J.; ONETA, C. Gastrointestinal alcohol dehydrogenase. **Nutrition Reviews**. v. 56, p. 52-60, 1998.

SEITZ, H. K.; AGARWAL, D. P. Immune system. **Alcohol in health and disease**. 1 ed., 2001.

SELIUS, B. A.; SUBEDI, R. Urinary retention in adults: diagnosis and initial management. **American Family Physician**. v. 77, n. 5, p. 643-650, 2008.

SENGUPTA, P. Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How old is it in comparison with Human age? **BioMed Research International**. v. 2, p. 81-89, 2012.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**. v. 4, n. 6, p.624-630, 2013.

SHAHANI, R.; STREUTKER, C.; DICKSON, B.; STEWART, R. J. Ketamine-associated ulcerative cystitis: a new clinical entity. **Urology**. v. 69, n. 5, p. 810-812, 2007.

SHARIF, S. I.; ABOUAZRA, H. A. Effect of intravenous ketamine administration on blood glucose levels in conscious rabbits. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**. v. 4, p. 38-45, 2009.

SHEFER, S.; HAUSER, S.; MOSBACH, E. H. 7- α -hydroxylation of cholesterol by rat liver microsomes. **Journal of Lipid Research**. v. 9, p. 328-333, 1968.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**. v. 103, p.287-290, 1979.

SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. v.4, p. 180-183, 2015.

SIPERSTEIN, M. D.; FAGAN, V. M. Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. **Journal of Biological Chemistry**. v. 241, p. 602-609, 1966.

SILVA, F. C. C.; DANTAS, R. T.; CITÓ, M. C. O.; SILVA, M. I. G.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. **Revista de Neurociência**. v. 18, n. 2, p. 227-237, 2010.

SILVA, V. L.; BOTTI, N. L. O consumo de drogas lícitas e ilícitas pelos profissionais da área da saúde. **Revista de Enfermagem UFPE online**. v. 5, n. 5, 9p., 2011.

SILVEIRA, P. S. **Estigmatização do uso de álcool e outras drogas entre profissionais de saúde de Juiz de Fora**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010.

SILVERSTEIN, J. H.; SILVA, D. A.; IBERTI, T. J. Opioid addiction in anesthesiology. **Anesthesiology**. v. 79, p. 354-375, 1993.

SHBAIR, M. K. S.; ELJABOUR, S.; LHERMITTE, M. Drugs involved in drug-facilitated crimes: Part I: Alcohol, sedative-hypnotic drugs, gamma-hydroxybutyrate and ketamine. A review. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v. 68, p. 275-285, 2010.

SLINGSBY, L. S.; WATERMAN-PEARSON, A. E. The postoperative analgesic effects of ketamine after canine ovariohysterectomy - a comparison between pre or postoperative administration. **Research in Veterinary Science**. v. 69, p. 147-152, 2000.

SMITH, D. J.; PEKOE, G. M.; MARTIN, L. L.; COALGATE, B. The interaction of ketamine with the opiate receptor. **Life Sciences**. v. 26, p. 789-795, 1980.

SMITH, G. S.; SCHLOESSER, R.; BRODIE, J. D.; DEWEY, S. L.; LOGAN, J.; VITKUN, S. A.; SIMKOWITZ, P.; HURLEY, A.; COOPER, T.; VOLKOW, N. D.; CANCRO, R. Glutamate modulation of dopamine measured in vivo with positron emission tomography (PET) and 11-raclopride in normal human subjects. **Neuropsychopharmacology**. v. 18, p. 18-25, 1998.

SMITH, K. M.; LARIVE, L. L.; ROMANELLI, F. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine, hydrochloride and γ -hydroxybutyrate. **American Journal of HealthSystem Pharmacy**. v. 59, p. 1067-1076, 2002.

SMITH, A. J.; VOLLMER-CONNA, U.; BENNETT, B.; HICKIE, I. B.; LLOYD, A. R. Influences of distress and alcohol consumption on the development of a delayed-type hypersensitivity skin test response. **Psychosomatic Medicine**. v. 66, p. 614-619, 2004.

SMITH, K.; FLATLEY, J. Drug Misuse Declared: Findings from the 2010/11 British Crime Survey. Home Office Statistics. London: Home Office Statistical Bulletin, 2011.

SINNER, B.; GRAF, B. M. Ketamine. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 182, p. 313-333, 2008.

STECIUK, M.; KRAM, M.; KRAMER, G. L.; PETTY, F. Immobilization-induced glutamate efflux in medial prefrontal cortex: blockade by (+)-MK-801, a selective NMDA receptor antagonist. **Stress**, v. 3, p. 195-199, 2000.

STRECK, E. L.; DALLA COSTA, T. Isoformas do citocromo P450 e outros fatores que alteram a biotransformação de fármacos. **Drug metabolism**, v. 17, p. 36-41, 1999.

STEWART, S. F.; DAY, C. P. Alcoholic liver disease. 5 ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006. p. 579.

SNEDECOR, G. W. **Statistical methods: applied to experiments in agriculture and biology**. 4. ed. Ames: Iowa State College Press, 1946. 485p.

SPINOSA, H. de S. Introdução à farmacologia veterinária. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. p. 4, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 972 p.

STORK, C.; RENSHAW, P. F. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research, **Molecular Psychiatry**. v. 10, p. 900-919, 2005.

SUN, J.; WANG, X. D.; LIU, H. Ketamine suppresses endotoxin-induced NF-kappaB activation and cytokines production in the intestine. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. v. 48, p. 317-321, 2004.

SUTER, P. M. Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity? **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. v. 42, p. 197-227, 2005.

SUTTON, T. S.; KAESER, H. E.; HANSARD, S. L. Some factors affecting the synthesis of ascorbic acid in the albino rat. **Journal of Biological Chemistry**. v. 144, p. 183-191, 1942.

SZABO, G.; MANDREKAR, P.; DOLGANIUC, A.; CATALANO, D.; KODYS, K. Reduced all reactive T- cell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN gamma levels. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, n.12, p. 1766-1772, 2001.

SZABO, G.; SAHA, B. Alcohol's effect on host defense. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 37, n. 2, p. 159-170, 2015.

TALBOTT, G. D.; BENSON, E. B. Impaired physicians: the dilemma of identification. **Postgraduate Medical**.v. 68, n. 1, p. 56-64, 1980.

TALBOTT, G. D.; GALLEGOS, K. V.; WILSON, P. O.; PORTER, T. L. The Medical Association of Georgia's Impaired Physicians Program. Review of the first 1000 physicians: analysis of specialty. **The Journal of the American Medical Association**. v. 257, n. 21, p. 2927-2930, 1987.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Anesthetics block morphine-induced increases in serotonin release in rat CNS. **Synapse**. v. 18, p. 307-314, 1994.

TAVARES, B. F.; BERIA, J. U.; LIMA, M. Prevalência do uso de drogas e desempenho escolar entreadolescentes. **Revista de Saúde Pública**. v. 35, p. 150-158, 2001.

TAVARES, B. F.; BERIA, J. U.; LIMA, M. Fatores associados ao uso de drogas entre adolescentes escolares. **Revista de Saúde Pública**. v. 38, n.6, p. 787-796, 2004.

TESTA, C. M.; FRIBERG, I. K.; WEISS, S. W.; STANDAERT, D. G. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1a and mGluR2/3 in the rat basal ganglia. **The Journal of comparative neurology**. n. 390, v. 1, p. 15-19, 1998.

THIEL, D. H. V. Effects of ethanol upon organ systems other than the central nervous system. Tabakoff, H. Medical and social aspects of alcohol abuse. New York: Plenum Press, 1983. 404 p.

THIELEN, R. J.; ENGLEMAN, E. A.; RODD, Z. A.; MURPHY, J. M.; LUMENG, L.; LI, T. K.; MCBRIDE, W. J. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 309, p. 216, 2004.

THOMPSON, J.; BROWN, S.; KHURDAYAN, V.; ZEYNALZADEGAN, A.; SULLIVAN, P.; SCHEFF, S. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital, isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. **Comparative Medicine**. v. 52, p. 63-67, 2002.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. v. 27, p. 502-522, 1969.

TOMKINS, D. M.; SELLERS, E. M. Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. **Canadian Medical Association Journal**, v. 164, p. 817-821, 2001.

TONK, E. C. M.; VERHOEF, A.; GREMMER, E. R.; VAN LOVEREN, H.; PIERSMA, A. H. Developmental immunotoxicity in male rats after juvenile exposure to ethanol. **Toxicology**, v. 309, p. 91-99, 2013.

TRANQUILLI, W. J.; LAMONT, L. A.; GRIMM, K. A. **Pain Management for the Small Animal Practitioner**. Jackson: Teton New Media, 2004. p. 15-33.

TYCE, G.; YAKSH, T. L. Monoamine release from cat spinal cord by somatic stimuli: An intrinsic modulatory system. **Journal of Physiology**. v. 314, p. 513-529, 1981.

ULMAN, E. A.; COMPTON, D.; KOCHANNEK, J. Measuring food and water intake in rats and mice. **ALN Magazine**. 4 p., 2008.

UMBRICHT, D.; SCHMID, L.; KOLLER, R.; VOLLENWEIDER, F. X.; HELL, D.; JAVITT, D. C. Ketamine induced deficits in auditory and visual cortex dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**. v. 57, p. 1139-1147, 2000.

UNODC - United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention. **World Drug Report**, 2008.

UNODC. United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention. **World Drug Report**, 2017.

UOSUKAINEN, H.; TACKE, U.; WINSTOCK, A. R. Self-reported prevalence of dependence of MDMA compared to cocaine, mephedrone and ketamine among a sample of recreational poly-drug users. **International Journal of Drug Policy**. v. 26, p. 78-83, 2015.

VALADÃO, C. A. A. Anestésicos dissociativos. **Anestesia de Cães e Gatos**. 2 ed. São Paulo: Roca, p.237-245, 2010.

VALADÃO, C. A. A. Anestesia Dissociativa. **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 73-84.

VAN DER EEMS K, BROWN RD. Effect of caffeine sodium benzoate, ketamine hydrochloride, and yohimbine hydrochloride on xylazine hydrochloride-induced anorexia in white-tailed deer. **JWD**, v. 22, p.403-406, 1986.

VAN DER LINDEN, P.; GILBART, E.; ENGELMAN, E.; SCHMARTZ, D.; DE ROOD, M.; VINCENT, J. L. Comparison of halothane, isoflurane, alfentanil, and ketamine in experimental septic shock. **Anesthesia & Analgesia**. v. 70, p.608-613, 1990.

VAN DER MERWE, J. N, DU BRUYN, D. B.; VAN DER WALT, W. H.; SLY, M. R. Effects of certain anaesthetics on plasma metabolite concentrations in the baboon (*Papio ursinus*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 58, p. 125-129, 1987.

VANHEULE, E.; GEERTS, A. M.; VAN HUYSSSE, J.; SCHELFHOUT, D.; PRAET, M.; VAN VLIERBERGHE, H.; DE VOS, M.; COLLE, I. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 89, n. 6, p. 419-432, 2008.

VENKATESAN, R.; NAGARAJAN, P.; RAJARETNAM, R. S.; MAJUNDAR, S. S. Hematologic and serum biochemical values in aged female bonnet machaques (*Macaca radiata*) anesthetized with ketamine hydrochloride. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 45-48, 2006.

VELHO, G. Dimensão cultural e política do mundo das drogas. **Projeto e metamorfose: antropologia das sociedades complexas**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1994.

VENÂNCIO, C.; ANTUNES, L.; FÉLIX, L.; RODRIGUES, P.; SUMMAVIELLE, T.; PEIXOTO, F. Chronic ketamine administration impairs mitochondrial complex I in the rat liver. **Life Sciences**. v. 93, p. 464-470, 2013.

VERMA, A.; MOGHADDAM, B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. **Journal of Neuroscience**. v. 16, n. 1, p. 373-379, 1996.

VIALA-ARTIGUES J, MECHETTI C. **Histoire de l'alcool archéologie parti 1**. Paris: Fédération des Acteurs de l'Alcoholologie et de l'Addictologie, 2003.

YEN, C. F.; HSU, S.Y.; CHENG, C. P. Polysubstance use and its correlates in adolescent ecstasy users in Taiwan. **Addictive Behaviors**. v. 32, p. 2286-2291, 2007.

WAI, M. S. M.; CHAN, W. M.; ZHANG, A. Q.; WU, Y.; YEW, D. T. Long-term ketamine and ketamine plus alcohol treatments produced damages in liver and kidney. **Human and Experimental Toxicology**, n. 31, v. 9, p. 877-886, 2012.

WAI, M. S. M.; LUAN, P.; JIANG, Y.; CHAN, W. M.; TSUI, T. Y. M.; TANG, H. C.; LAM, W. P.; FAN, M.; YEW, D. T. Long term ketamine and ketamine plus alcohol toxicity - What can we learn from animal models? **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, n. 13, p. 273-279, 2013.

WAI-KIN, H. V. Criminal Law in Hong Kong. **Kluwer Law International**. p. 33, 2011.

WALKER, S. E. Estrogen and autoimmune disease. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 40, n. 1, p. 60-65, 2011.

WANG, X.; WANG, G.; LEMOS, J. R.; TREISTMAN, S. N. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel in neurohypophysial terminals. **Journal of Neuroscience**. v. 14, n. 9, p. 5453-5460, 1994.

WANG, Z.; YAO, T.; SONG, Z. Chronic Alcohol Consumption Disrupted Cholesterol Homeostasis in Rats: Downregulation of low density lipoprotein receptor and enhancement of cholesterol biosynthesis pathway in the liver. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 3, p. 471-478, 2010.

WANG, Y.; LIU, X. J.; ROBITAILLE, L.; EINTRACHT, S.; MACNAMARA, E.; HOFFER, L. J. Effects of vitamin C and vitamin D administration on mood and distress in acutely hospitalized patients. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 98, p. 705-711, 2013.

WARREN, R. J., KIRKPATRICK, R. L., GIBSON, D. F., SCANLON, P. F. Xylazine hydrochloride-induced anorexia in white-tailed deer. **JWD**, v. 20, p. 66-68, 1984.

WATANABE, D.; NAKANISHI, S. mGluR₂ postsynaptically senses granule cell inputs at Golgi cell synapses. **Neuron**. n. 39, v. 5, p. 821-829, 2003.

WEIGHT, F. F.; AGUAYO, L. G.; WHITE, G.; LOVINGER, D. M.; PEOPLES, R. W. GABA and glutamate gated ion channels as molecular sites of alcohol and anaesthetic action. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**. v. 47, p.335-347, 1992.

WHITE, P. F.; SCHUTTLE, J.; SHAFER, A.; STANSKI, D. R.; HORAI, Y.; TREVOR, A. J. Comparative pharmacology of the ketamine isomers. Studies in volunteers. **Brazilian Journal of Anaesthesia**. v. 57, p. 197-203, 1985.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; NGUYEN,-KHOA, T.; CAPEILLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN, A. T.; CANTELOUP, S.; DAYER, J. M.; JUNGERS, P.; DRÜEKE, T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of Immunology**. v. 161, p. 2524-2532, 1998.

WHO. World Health Organization, **Expert Committee on Drug Dependence, 34^o report. Genebra-Suíça**. 2006.

WHO. World Health Organization. Conceptual causal model of alcohol consumption and health outcomes. **Global status report on alcohol and health 2014**, 2014.

WHO. World Health Organization, **Expert Committee on Drug Dependence, 37^o report. Genebra-Suíça**. 2016.

WIDMER, H.; LEMOS, J. R.; TREISTMAN, S. N. Ethanol reduces the duration of single evoked spikes by a selective inhibition of voltage-gated calcium currents in acutely dissociated supraopticneurons of the rat. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 10, n. 6, p. 399-406, 1998.

WIJESINGHE, C. P.; DUNNE, F. Impaired practitioners notified to the Medical Practitioners Board of Victoria from 1983 to 1997. **Medical Journal of Australia**. v. 171, n. 8, p. 414-417, 1999.

WINICK, C. A theory of drug dependence based on role, access to, and attitudes towards drugs. **Research Monographs**. v. 30, p. 225-235, 1980.

WINSTOCK, A. R.; WOLFF, K.; RAMSEY, J. Pill testing: harm minimisation gone too far? **Addiction**, v. 96, p. 1130-1148, 2001.

WINSTOCK, A. R.; MITCHESON, L.; GILLATT, D. A.; COTTRELL, A. M. The prevalence and natural history of urinary symptoms among recreational ketamine users. **BJU International**. p. 1-5, 2012.

WOLFF, K., WINSTOCK, A. R. Ketamine: From medicine to misuse. **CNS Drugs**, v. 20, n. 1, p. 199-218, 2006.

WONG, Y. W.; LAM, L. H.; TANG, H. C.; LIANG, Y.; TAN, S.; YEW, D. T. Intestinal and liver changes after chronic ketamine and ketamine plus alcohol treatment. **Microscopy Research and Technique** v. 75, n. 9, p.1170-1175, 2012.

WOOD, D. M.; NICOLAOU, M.; DARGAN, P. I. Epidemiology of recreational drug toxicity in a nightclub environment. **Substance Use & Misuse**. v. 44, p. 1495-502, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Conceptual causal model of alcohol consumption and health outcomes. **Global status report on alcohol and health 2014**. Geneva, 2014.

WRIGHT, C. Physician addiction to pharmaceuticals: Personal history, practice setting, access to drugs, and recovery. **Maryland State Medical Journal**. v.39, n. 11, p. 1021-1025, 1990.

WU, Q.; CLARK, M. S.; PALMITER, R. D. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. **Nature**. v. 483, n. 7391, p. 594-597, 2012.

ZEFERINO, M. T.; SANTOS, V. E. P.; RADUNZ, V.; CARRARO, T. E.; FRELLO, A. T. Enfermeiros e uso abusivo de drogas: comprometendo o cuidado de si e do outro. **Revista Enfermagem UERJ**. v. 14, n. 4, p. 599-606, 2006.

YAN, Q. S. Extracellular dopamine and serotonin after ethanol monitored with 5-minute microdialysis. **Alcohol**. v. 19, n. 1, p. 1-7, 1999.

YANNING, L.; RUIPENG, S.; GEHUA, W.; RUNTAO, D.;AO, D.;JICHUAN, Z.; ZHIBIN, D.; XINGHUA, R.;HUI, Y.; RUI, Z.; GUOHUA, Z.; YAN, L.; XU, W. Effects of Ketamine on levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the hippocampus of mice following acute or chronic administration. **Frontiers in Pharmacology**. n. 8, v. 139, 14 p. 2017.

YEK, J.; SUNDARAM, P.; AYDIN, H.; KUO, T.; NG, L.G.The clinical presentation and diagnosis of ketamine-associated urinary tract dysfunction in Singapore. **Singapore Medical Journal**. v. 56, n. 12, p. 660-665, 2015.

YEUNG, K. Y.; KLUG, P. P.; LESSIN, L.S. Alcohol-induced vacuolization in bone marrow cells: Ultrastructure and mechanism of formation. **Blood Cells**. v. 13, n.3, p. 487-502, 1988.

YIM, H. J.; GONZALES, R. A. Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. **Alcohol**. v. 22, n. 2, p. 107-115, 2000.

YIN, M.; WHEELER, M. D.; KONO, H.; BRADFORD, B. U.; GALLUCCI, R. M.; LUSTER, M. I.; THURMAN, R. G. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. **Gastroenterology**. v. 117, p. 942-952, 1999.

YLI-HANKALA, A.; KILEURVERA, M.; RANDELL, T.; LINDGREN, L. Ketamine anesthesia in patients with septic shock. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. v. 36, p. 483-485, 1992.

YOKOI, K.; OHMURA, M.; KONDO, A.; MIYAKE, K.; SAITO, M. Effects of ethanol on in vivo cystometry and in vitro whole bladder contractility in the rat. **Journal of Urology**. v. 156, n. 4, p. 1489-1491, 1996.

YONEZAWA, Y.; HONDO, H.; HASHIMOTO, K.; MATSUMOTO, T.; HIRANO, M.; UCHIMURA, H.; KUROKI, T. Effect of phencyclidine on endogenous excitatory amino acid release from the rat anterior cingulate cortex: an in vivo microdialysis study. **Journal of Neural Transmission**. v. 94, p. 235-240, 1993.

YOSHIDA, T.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, T.; CHO, F.; HONJO, S. The effects of ketamine anesthesia on hematological and serum biochemical values in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Jikken Dobutsu**, v. 35, n. 4, p. 455-461, 1986.

YOSHIMOTO, K.; MCBRIDE, W. J.; LUMENG, L.; LI, T. K. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. **Alcohol**. v. 9, n. 1, p. 17-22, 1992.

YUZER, H.; YUZBASIOGLU, M. F.; CIRALIK, H.; KURUTAS, E. B.; OZKAN, O. V.; BULBULOGLU, E.; ATLI, Y.; ERDOGAN, O.; KALE, I. T. Effects of intravenous anesthetics on renal ischemia/reperfusion injury. **Renal Failure**. v. 31, n. 4, p. 290-296, 2009.

ZHANG, P.; NELSON, S.; SUMMER, W.R.; SPITZER, J. A. Acute ethanol intoxication suppresses the pulmonary inflammatory response in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 21, n. 5, p. 773-778, 1997.

ZHAO, Y.; SUN, L. Antidepressants modulate the in vitro inhibitory effects of propofol and ketamine on norepinephrine and serotonin transporter function. **Journal of Clinical Neuroscience**. v. 15, p. 1264-1269, 2008.

ZIJOO, R.; DIRWEESH, A.; ORDONEZ, F. N.; KAJI, A. Spontaneous rupture of urinary bladder in a young alcoholic male. **Journal of Medical Cases**. v. 7, n. 6, p. 245-247, 2016.

ZAKHARI, S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research & Health**. v. 29, n. 4, 2006.

ZARATE, C. A. JR.; SINGH, J. B.; CARLSON, P. J.; BRUTSCHE, N. E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D. A.; CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. A randomized trial of an N-Methyl-D-Aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives General Psychiatry**. v. 63, p. 856-864, 2006.

ZHUO, M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. **Molecular Brain**. v. 2, n. 4, 2009.

ZILBERSTEIN, G.; LEVY, R.; RACHINSKY, M.; FISHER, A.; GREEMBERG, L.; SHAPIRA, Y.; APPELBAUM, A.; ROYTBLAT, L. Ketamine attenuates neutrophil activation after cardiopulmonary bypass. **Anesthesia & Analgesia**. v. 95, p. 531-536, 2002.

Original Article

TOXIC AND IMMUNOTOXIC EVALUATION OF KETAMINE AND/OR ETHANOL IN RATS DURING 28 DAYS

PATRICIA FRANCISCONE MENDES¹, KARIN ARGENTI SIMON², ISIS MACHADO HUEZA^{1,2*}

¹Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, S. P., Brazil, ²Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo (ICAQF-UNIFESP), Diadema, S. P., Brazil
 Email: imhueza@unifesp.br

Received: 08 Jun 2017 Revised and Accepted: 22 Jul 2017

ABSTRACT

Objective: Studies have shown that ketamine (K) and ethanol (E) have immunomodulatory activity; however, few studies were performed with concomitant treatments. Thus, we evaluated the toxic and immunotoxic effects of this association.

Methods: Wistar rats were distributed into four groups (n=8/group), each receiving one of the following treatments, for 28 d: K group (15 mg/kg of ketamine, intraperitoneally); E group [1.0 ml of ethanol 10% (approximately 0.08g/rat), gavage]; KE group, receiving both treatments; and Control (Co) group, receiving only vehicles. On day 29, animals were euthanized for biochemical, hematological, histopathological and immunological evaluation.

Results: Although the experimental conditions did not elicit changes on immune parameters, some biochemical alterations were detected in the different groups. Even in the absence of nutritional and histopathological changes, or renal and hepatic markers that could indicate tissue damage, a reduction on alkaline phosphatase levels in rats from K and KE groups was observed. Moreover, changes in lipid markers [cholesterol, triglycerides and high-density lipoproteins (HDL)] were found in the different groups studied, suggesting that K and E could promote a synergic/antagonistic effect.

Conclusion: In conclusion, despite biochemical alterations promoted by K and E, associated or not, the doses here employed did not promote immunotoxic effects on rats treated for 28 d. (response to the suggestion in the end of the paper).

Keywords: Special K, K-hole, Immunotoxicity, Ketamine, Alcohol

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
 DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i9.20582>

INTRODUCTION

The use of substances with psychoactive properties is considered an ancient and universal practice [1], associated either with cultural or religious rituals, as well as for medicinal purposes. In the 19th century, medical sciences advancements, resulting in the discovery of new drugs and routes of administration [2, 3], collaborated to change the purposes of the use of these substances for its current consumption, focused on the recreational use and individual pleasure [4]. Later in the 20th century, when abuse and dependence epidemics began [5], causing social problems of public health concern, investigations involving the increase on the prevalence of illicit drugs use gained more prominence and importance [6, 7].

In the present scenario, a growing number of new psychoactive substances has been reported [8] and the common occurrence of the concomitant use of these different chemicals resulted in the concept of "polydrug" abuse [9], with ethanol as the most prevalent substance used in association with stimulants and/or hallucinogenic drugs, such as ketamine [10].

The total quantity of ketamine seized worldwide mostly originated from East and South-East Asia to Europe and America [11, 12], increased from an annual average of 3 tons in the period of 1998-2008 to 10 tons in the period of 2009-2014 [13].

Some harmful adverse physical (hypertension, tachycardia, abdominal and urinary pain syndrome) and neurological (disorientation, agitation, hallucinations, anxiety and psychosis) effects, after prolonged use or high doses of ketamine, framed it as a "Class B Drug", controlled by the United Kingdom Misuse of Drugs Act 1971 since 2014 [14] and added to "Schedule III" in the United States since 1999 [15].

Ketamine is a phencyclidine analog drug which acts mainly as an antagonist of N-methyl D-aspartate (NMDA) glutamate receptors [16]. It is used in human medicine as a short-term anesthetic for specific situations (palliative care, pediatric and emergency

surgeries) and, currently, as an alternative treatment for depression in patients unresponsive to conventional treatments [17, 18]. However, due to the unpleasant central effects caused to human patients under anesthesia, such as anxiety, agitation and hallucinations [19, 20], it is most commonly used in veterinary practice [21].

Studies with ketamine revealed its immunomodulatory properties [22], characterized by suppressed production of cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) [23, 24], limiting neutrophil diapedesis to inflammation sites [25, 26], even though interleukin-2 (IL-2) secretion and cellular adhesion molecules expression are maintained [23, 24].

Ethanol, the most common and popular licit drug, widely used in association with other drugs [27, 28], is a central nervous system (CNS) depressant that potentiates the gamma-amino butyric acid (GABA) effects, acting in agonist form on GABAergic receptors [29], culminating in delayed conduction of nerve impulses and, consequently, muscle relaxation and sleepiness [30]. In addition to central symptoms, ethanol exposure can trigger immunosuppressive effects on monocyte, macrophage and neutrophil activities [31].

Considering that there are few reports in the literature about the possible toxic, and/or immunotoxic effects resulting from ketamine/ ethanol association, the present study aimed to evaluate the effects of combined daily intraperitoneal injections of ketamine and oral (gavage) administration of ethanol to Wistar rats, for a period of 28 d.

MATERIALS AND METHODS

Material

Animals

Thirty-two male adult Wistar rats (60 d of age, 200-250g body weight) were obtained from our colony in the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science,

University of São Paulo. The animals were used in accordance to the ethical principles and procedures adopted by The Ethics Committee on Animal Experiments of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil (protocol number: 8108060616). All rats were housed in cages measuring 40x50x20 cm. Two rats were placed in each cage, with a dividing grid that allowed the animals visual and some physical contact, without interfering with individual feed and water consumption, thus reducing the stress resulting from isolation. The cage bottoms were lined with sterilized corncob. Cages were checked daily over the entire experimental period for soft feces, food waste, behavioral changes (e. g., piloerection, lethargy) and mortality. The animals received food and water *ad libitum* and were maintained under controlled temperature (22-25 °C), relative humidity (50-65%) and lighting (12/12h light/dark cycle).

Drugs, chemicals and reagents kits

Phormol 10% was supplied by Merck (São Paulo, SP, Brazil). Sodium heparin was obtained from Cristália (São Paulo, SP, Brazil). Archote (Curitiba, PR, Brazil) supplied ethanol. Roswell Park Memorial Institute culture medium (RPMI-1640), fetal bovine serum (FBS), and trypan blue were obtained from Gibco (United States of America, USA). Synth (Diadema, SP, Brazil) provided sodium chloride. Davol (São Paulo, SP, Brazil) supplied assay reagents for hematological parameters [red blood cells/erythrocytes (RBC), white blood cells/leukocytes (WBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), platelets (PLT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)]. Inter-teck (São Paulo, SP, Brazil) supplied assay kits for albumin, total protein, alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), glucose, cholesterol, triglycerides, and high-density lipoproteins (HDL), urea, and creatinine. Ceva (Paulinia, São Paulo, Brazil) provided Ketamin (Dopalen®-ketamine hydrochloride 1.16g; vehicle q. s. 10.0 ml) and Xylazine (Anasedan®-xylazine hydrochloride 2.3g; vehicle q. s. 100.0 ml). All other reagents were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

Methods

Toxicological and immunotoxicological evaluations

Thirty-two male Wistar rats were randomly distributed into four groups (n=8 animals/group), consisting of one control group (Co) and three experimental groups [ketamine [K], ethanol [E] and ketamine+ethanol [KE]]. Rats from K group were treated once, daily, with an intraperitoneal (I. P) injection of 15 mg/kg of ketamine [based on the dose published by Garcia *et al.*, Rezin *et al.*, and Réus *et al.* (32-34)] diluted in saline solution 0.9%, and orally by gavage with 1.0 ml of distilled water for each rat. Rats from E group were treated once, daily, by gavage with 1.0 ml of ethanol 10% [approximately ($\approx$) 0,08g/rat] [calculated dose based on studies of Wai *et al.* (35)], and with an I. P injection of 1.0 ml of saline solution 0.9% for each rat. Rats from KE group were treated once, daily, with an I. P injection of 15 mg/kg of ketamine diluted in saline solution 0.9%, and by gavage with 1.0 ml of ethanol 10% ($\approx$ 0,08g/rat). Rats from Co group were treated once, daily, with an I. P injection of 1.0 ml of saline solution 0.9% for each rat, and by gavage with 1.0 ml of distilled water for each rat, only to be subjected to similar stimuli to those applied to the animals belonging to the experimental groups. All rats were treated between 8:00 a. m. and 12:00 p. m., and all treatments were done simultaneously. Food and water consumption, as well as body weight gain, were assessed daily to determine total weight gain, as well as total water and food consumption. Rats were treated for 28 consecutive days according to immunotoxicological protocols employed worldwide. On the 28th day, food was removed and the rats were fasted for 8 h for biochemical evaluation.

After the last day of the experimental period, the animals were anaesthetized with xylazine and ketamine (5 and 50 mg/kg of body weight, respectively) for blood collection from the abdominal cava vein. Euthanasia of deeply anesthetized animals was made by cervical dislocation, in accordance to The Ethics Committee on Animal Experiments of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil. Lymphoid organs (thymus and spleen) and bone marrow from the left femur were removed for lymphohematopoietic organ and cellularity analysis.

Blood collection was performed with and without sodium heparin for the evaluation of hematological parameters and serum biochemical analyses, respectively. Hematological parameters (RBC, WBC, HGB, HCT, PLT, MCV, MCH, and MCHC) were assessed using automatic Poch-100iV Diff Sysmex® equipment; differential white blood cells analyses (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils) were performed manually (blood extension). Serum biochemistry was analyzed using ChemWell®-T automated biochemistry analyzer with the corresponding reagents. The measured markers were albumin, total protein, ALP, ALT, AST, GGT, glucose, cholesterol, triglycerides, HDL, urea, and creatinine.

For urinalysis, after bladder exposure, approximately 1.0 ml of urine was collected by puncture of the organ and placed into tubes containing urinalysis reagent strips from Labtest (Uriquest®) for semi-quantitative determination of pH, density, and presence of bilirubin, urobilinogen, ketones, ascorbic acid, glucose, protein, blood, nitrite, and leukocytes in the urine.

Tissue samples of heart, liver, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, adrenal glands, kidney, and bladder were collected and fixed in 10% formalin, routinely embedded in paraffin, cut into 5- μ m thick sections and stained with hematoxylin and eosin for histopathology. After relative organ weight analysis of thymus and spleen, these organs were fixed in formaldehyde for histopathology evaluation.

A fragment of a known weight of splenic tissue was prepared, washed in cold RPMI-1640 culture medium, and resuspended in 5 ml of the culture medium for splenocytes count; the remaining fragment was fixed for histopathology analysis. Bone marrow cell suspensions were produced by flushing the marrow cavity of the left femur of each rat with an ice-cold RPMI-1640 medium using a sterile syringe with a 26-gauge needle.

The viability of white blood cells from spleen and bone marrow was assessed by a trypan blue dye exclusion test, and cell number was determined by Neubauer Chamber cell counting.

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0® software (GraphPad Software, Inc., San Diego, California). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used for multiple comparisons. If Bartlett's test suggested that the differences among SEM values were significant, Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Dunn test for multiple comparisons was employed. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and differences were considered to be statistically significant when *P<0.05.

RESULTS

Food and water consumption, body weight gain and toxicity signs

During the experimental period, none of the rats showed signs of toxicity, such as soft feces, depression, piloerection, or mortality. Table 1 shows total food and water consumption, and total body weight gain of rats treated or not (Control) with ketamine (K), ethanol (E) or both ketamine and ethanol (KE) during 28 d.

Table 1: Total food and water consumption, and total body weight gain of rats treated or not (Control) with ketamine (K), ethanol (E) or ketamine+ethanol (KE) during 28 d

	Control (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Food consumption (g)	669.9 $\pm$ 16.0	698.1 $\pm$ 14.2	685.5 $\pm$ 15.6	704.4 $\pm$ 27.4
Water consumption (ml)	938.4 $\pm$ 24.8	923.9 $\pm$ 37.7	872.5 $\pm$ 31.6	855.5 $\pm$ 27.1
Body weight gain (g)	109.3 $\pm$ 12.0	109.6 $\pm$ 10.4	109.0 $\pm$ 11.4	103.1 $\pm$ 10.1

Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Hematological parameters and lymphoid organ evaluation (relative weight of spleen and thymus, and bone marrow and spleen cellularity)

The statistical tests employed to evaluate hematological parameters and blood counts did not reveal any significant differences among the groups and parameters evaluated (data not shown). In relation to lymphoid organ evaluation (relative weight of spleen and thymus, and bone marrow and spleen cellularity), no significant differences were found among the experimental groups, as indicated in table 2.

Urinalysis

No significant differences were found in urine parameters (pH, density, bilirubin, urobilinogen, ketones, ascorbic acid, glucose, protein, blood, nitrite, and leukocytes) among the groups after the 28-day experimental period (data not shown).

Biochemical parameters

No alteration was observed in total protein, albumin and glucose serum levels. Despite the lack of changes in hepatic parameters ALT (fig. 1A), AST (fig. 1B), and GGT (fig. 1C), a reduction in ALP levels was observed in rats treated with K compared with those treated with either E or vehicle (Co group); in addition, ALP was also reduced in rats treated with KE when compared with rats from Co group (fig. 1D).

When lipid profile was assessed, we observed higher cholesterol levels in the rats from KE group when compared with rats from Co group (fig. 2A). However, when triglycerides levels were evaluated, animals from K group revealed statistical reduction on this parameter when compared with both Co and KE group, with no statistical differences from animals of E group, as shown in fig. 2B. In addition, rats from all groups showed enhanced levels of HDL compared with rats from Co group (fig. 2C).

Table 2: Relative weight of spleen and thymus, and bone marrow and spleen cellularity of rats treated or not (Control) with ketamine (K), ethanol (E) or ketamine+ethanol (KE) during 28 d

	Control (n=8)	K (n=8)	E (n=8)	KE (n=8)
Spleen ($\times 10^{-3}$ g/100g of BW ^a)	0.27 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01
Thymus ($\times 10^{-3}$ g/100g of BW ^a)	0.14 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
Spleen cellularity ($\times 10^6$ /g of spleen)	210.7 $\pm$ 12.4	225.4 $\pm$ 24.2	201.0 $\pm$ 15.5	179.2 $\pm$ 17.4
Bone marrow cellularity ($\times 10^6$ /cells)	5.09 $\pm$ 0.7	5.70 $\pm$ 1.0	4.44 $\pm$ 0.4	5.85 $\pm$ 0.8

^aBW = Body weight. Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Fig. 1: Hepatic parameters of rats treated or not (Control-Co) with ketamine (K), ethanol (E) or ketamine+ethanol (KE) during 28 d. (A) Alanine transaminase; (B) aspartate transaminase, (C) gama-glutamyl transpeptidase and (D) alkaline phosphatase concentrations. Serum alkaline phosphatase concentrations were found reduced in both ketamine-treated groups ($P < 0.0001$ K vs. Co, $P < 0.01$ K vs. E and $P < 0.05$ KE vs. Co; Dunn test). In all cases $n = 8$ animals/group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM

Fig. 2: Lipid profile of rats treated or not (Control-Co) with ketamine (K), ethanol (E) or ketamine+ethanol (KE) during 28 d. (A) Cholesterol levels: enhanced levels were observed in KE group compared with Co group ($P < 0.05$ KE vs. Co; post-test Tukey). (B) Triglycerides levels: Rats from K group showed reduced triglycerides levels when compared with rats from both KE and Co groups ($P < 0.05$ K vs. Co and $P < 0.05$ K vs. KE; post-test Dunn). (C) High-density lipoprotein levels (HDL): All treated groups showed enhanced levels of HDL compared with control group ($P < 0.01$ K vs Co, $P < 0.01$ E vs Co, $P < 0.0001$ KE vs Co; post-test Tukey). In all cases $n = 8$ animals/group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM

Regarding renal function, treatment with ketamine did not reveal any nephrotoxic effects; however, when ethanol was associated, it

promoted a statistical enhancement on urea and creatinine levels, when compared with K alone (fig. 3A and B, respectively).

Fig. 3: Renal function of rats treated or not (Control-Co) with ketamine (K), ethanol (E) or ketamine+ethanol (KE) during 28 d. (A) Urea levels. Urea levels were higher in the rats from the KE group compared with the rats from K group ($P < 0.05$ KE vs K; post-test Tukey). (B) Creatinine levels. Creatinine levels were higher in the rats from the KE group compared with the rats from K group ($P < 0.05$ KE vs K; post-test Tukey). In all cases $n = 8$ animals/group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM

Fig. 4: Histopathological evaluation of liver (4x) of rats treated or not (Control-Co) with 15 mg/kg of ketamine intraperitoneally (IP) (K), 1 ml of ethanol 10% (gavage) (E) or ketamine (15 mg/kg, IP) followed by 1 ml of ethanol 10% (gavage) (KE) during 28 d. After the last day of treatment, organ sections were sliced, fixed, and stained with hematoxylin and eosin, as described in methods section. Livers appeared normal in all cases (n=8 animals/group). CV=central vein; PT=portal tract

Fig. 5: Histopathological evaluation of kidney (10x) of rats treated or not (Control-Co) with 15 mg/kg of ketamine intraperitoneally (IP) (K), 1 ml of ethanol 10% (gavage) (E) or ketamine (15 mg/kg, IP) followed by 1 ml of ethanol 10% (gavage) (KE) during 28 d. After the last day of treatment, organ sections were sliced, fixed, and stained with hematoxylin and eosin, as described in methods section. Kidneys appeared normal in all cases (n=8 animals/group). G=glomerulus

Histopathological evaluations

No histopathological alterations were observed in liver (fig. 4) or kidney (fig. 5), nor in any other organ analyzed (heart, thymus, spleen, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, adrenal glands and bladder).

DISCUSSION

"Polydrug" abuse is a current social phenomenon of public health concern [36], since the consumption of associated chemical substances can result not only in significant adverse effects [37, 38], but also culminate into the development of addiction processes [39-40].

Ethanol use as a licit drug [10, 41] is generally made in combination with a heterogeneous group of illegal chemical substances known as "club drugs", which are in constant renewal [42]. Ketamine, a prominent drug among these substances, was originally synthesized as an anaesthetic; however, because of its potential hallucinogenic effects, it has been used for recreational and illicit purposes [10, 41, 42].

Considering the central [43] and immunomodulatory [31, 44] effects triggered by the isolated use of ketamine or ethanol, the combined use of these drugs can elicit additive, synergistic or even potentiated adverse effects on target organs [43].

Although several studies were conducted to determine the possible effects caused by the isolated use of ketamine and ethanol, scientific reports conducted to determine the effects of the combined use of both are rare. Thus, in the present study, we established an exposure scenario to both drugs, isolated or in combination, similar to what happens in clubs and/or parties.

In order to standardize worldwide protocols to evaluate the immunotoxicity of a chemical substance, the period of 28 consecutive days of treatment was chosen. In addition, to avoid the possible influence of female hormones, known to have immunomodulatory activity, such as estrogen [45, 46], we decided to use only male rats in our studies.

Moreover, when *in vivo* studies are conducted to assess the toxic effects on the immune system, it is important to verify if the doses employed are not capable of causing exacerbated toxicity and/or clinical signs in the animals tested [47], since secondary health disorders, such as fever [48, 49] or stress [50], can interfere in the immunological parameters evaluation. In that respect, the most significant toxicity signs observed in animal models are related to anorexia and weight loss [51].

The chosen concentration of ketamine to be used in our studies was based on previous works from different researchers [32-34] which aimed not to evaluate the toxicity, but the antidepressant potential of ketamine on different models of chronic stress in rats. In these studies, a dose of 15 mg/kg was able to promote biological effects, re-establishing several altered parameters, such as return of food intake, normalization of the circulating levels of corticosterone and adrenocorticotrophic hormones, and reduction on proinflammatory cytokines serum levels, commonly elevated in depressed patients, evidencing, thus, the immunomodulatory potential of this dose.

In order to determine the ethanol dose to be used, a search in the literature showed different studies employing a variety of doses and models with different purposes, indicating the absence of treatment standardization in the attempt to mimic the drug consumption by its users. Thus, there are suggestions of ethanol administration in the drinking water [52-54], which in our opinion, can be stressful to the animal, since there is no other option of water intake, added to the uncertainty of the dose ingested. There are reports of parenteral administration [55, 56], which again is beyond the scope of this work. Finally, studies with administration by gavage [57, 58] appeared in our view to be the most suitable approach for our studies since it is the way that people usually use it.

Wai *et al.*, [35] based the ethanol dose to be used in their studies on the usual consumption of wine drinkers (alcohol content $\approx$ 12%), calculating a wine intake of 500 ml per day by an adult of 50 kg,

resulting in mice (body weight $\approx$ 30g) in a dose of 0.5 ml of a 10% solution of ethanol.

Knowing that club or rave-goers usually consume whiskey and energetic drinks to keep themselves "high", we decided to extrapolate on the dose employed by this researcher, considering the alcoholic content of the distillate, which varies from 40 to 60%, and a volume of 40 ml per serving, to a person with 60 kg of body weight [59]. Thus, considering the average value of the whiskey alcoholic content as 50%, one serving of this drink (40 ml) would be equivalent to the consumption of 0.27 g/kg of ethanol. Accordingly, a dose of 1 ml of a 10% ethanol solution, to rats with approximately 250g, amounts to 0.32 g/kg of ethanol, an approximate value to that supposedly ingested by users.

A fact that draws the attention in the different studies conducted to evaluate ethanol and ketamine associated effects, is the absence of evaluation of food intake and body weight gain of the animals, important parameters to be considered for immunotoxic effects determination, as evaluated in this study. In fact, it is known that nutritional changes may result in related immune parameters alterations [60], for instance, thymus relative weight [61, 62], increased chronic inflammation susceptibility and recurrent infections [63].

The doses used in the present study, whether in combination or not, were unable to promote changes in water consumption, food intake, or body weight gain. In fact, Fataccioli *et al.*, [64] in a study conducted in rats treated only with ethanol 10% on drinking water for 28 d, did not observe any changes in these parameters. In the study of Rafael *et al.*, [65] which evaluated the effects of orally administered ketamine in rats (100 mg/kg), associated or not with cocaine, ketamine alone did not promote changes in these parameters, corroborating our results. It is known that xylazine and ketamine association can promote anorexic effects in animals subjected to this anesthetic protocol [66, 67]; however, it is worth remembering that xylazine can act on a class of α -adrenergic receptors, including α_1 -adrenergic, related to the "feeding center" [68], while the central action of ketamine is mainly on NMDA receptors activity [69], which would justify the nonobservance of anorexic and body weight gain effects on the animals.

Ethanol is a caloric source and its consumption has been related to body weight gain and obesity in humans [70]. On the other hand, substantial amounts of its chronic consumption can lead to weight loss due to a carbohydrate isocaloric substitution by the ethanol [71]. However, the dose here employed presented an average of 97 calories/day, an insufficient value to promote effects on food intake and body weight gain.

Although some studies reported the effects of ethanol or ketamine on immune parameters, no data were found in the literature relating the possible immunotoxic effects resulting from the combination of these substances. Studies with rodents exposed to ketamine are usually associated with immunological challenges by infectious agents, showing reduced release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α [44], as well as *in vitro* inhibitory effects in nitric oxide (NO) synthesis by macrophages, evidencing an immunomodulatory effect on the resulting inflammatory response [72]. Studies with ethanol also showed its immunosuppressive potential, characterized by suppression of cytokines secretion and reduction of B and T lymphocytes population on lymphoid organs [73, 74].

Despite the immunomodulatory potential of ethanol or ketamine previously observed in laboratory animals, it is important to emphasize that the protocols employed by these researchers differ in several aspects, such as animal species, doses, administration routes, and experimental periods, including *in vitro* studies [72]. In none of these studies, animals were exposed to ketamine for a period of over 6 h [22, 75]. Ethanol doses varied up to 35% in drinking water, and the experimental period, up to 7 d [73].

Furthermore, it is known that the thymus is a lymphoid organ very sensitive to stress and toxic effects of substances [76]. Its relative weight, in conjunction with alterations in peripheral cellularity of white cells, constitutes important *endpoints* for testing the

immunotoxic potential of chemicals by regulatory toxicity agencies, such as OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) and FDA (Food and Drug Administration). Thus, considering the results herein obtained, with the dosages and the administration period of 28 d, it is not possible to conclude that ketamine and/or ethanol elicit immunotoxic effects, either alone or in combination.

It is known that ethanol exerts deleterious effects on the hepatocytes [77] since products originated from its biotransformation, involving the enzymes alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase, can induce liver synthesis of collagen and hepatic fibrosis. The enzyme alcohol dehydrogenase generates NADH, which can compromise the redox activity of cells and also contribute to changes in the metabolism of lipids [78], carbohydrates, proteins, and hepatic purines; and also generate acetaldehyde, causing glutathione depletion and consequent lipid peroxidation of the hepatocytes. Even more, the oxidation process by a specific system of cytochrome (CYP) P450 (P450IIE1) can also influence on the hepatotoxicity promoted by the chronic ingestion of ethanol [79-81].

Ketamine is biotransformed by several CYP system isoforms, which varies from species to species [82]. There are no reports about the possible hepatotoxic effect thereof, except in cases of high doses used for acute treatment of human patients with chronic pain, by infusion [83]. In fact, the results obtained here with the use of ketamine did not reveal any toxic effects of this anaesthetic. Moreover, despite the known toxicity of ethanol, it is possible to suggest that the dose and period of treatment used here, which also did not promote immunotoxicity, was not sufficient in terms of concentrations and exposure time, to cause any hepatotoxic effects in the animals.

Even though treatments did not elicit toxic or immunotoxic effects, some biochemical changes were observed. ALP levels were decreased in both groups of animals treated with ketamine, although the same was not observed in animals exposed only to ethanol when compared with those of the control group. It is noteworthy that, despite the serum ALP specificity, which results from the sum of four isoenzymes activities from liver, kidney, bone, and intestines [84, 85], there were no indications of adverse effects in the histopathology of these organs in any treated animals. In fact, Bennett *et al.*, [86] in monkeys exposed to ketamine, and González Gil *et al.*, [87] in rabbits also exposed to this anesthetic, showed a statistically significant decrease in ALP levels after an acute treatment with ketamine. It is known that the ALP reduction may be due to vitamin B6 [88] and folic acid deprivation, or even due to less vitamin E absorption [89]. However, as previously described, our animals did not show any reduction in food intake that could lead to this decrease in serum ALP, thus, at this time, it is not possible to suggest any hypothesis about this phenomenon. Even more, the researchers that found similar results to these evidenced by us in different species of animals also did not infer any theory to this fact.

Regarding the animals lipid profile, an increase in the serum cholesterol levels from those belonging to KE group was observed, when compared with the Co group. In relation to serum levels of triglycerides, only animals of K group showed a statistically significant reduction in this parameter, compared with the animals of Co and KE groups. Furthermore, the animals of all experimental groups (K, E and KE) exhibited an increase in the serum HDL levels when compared with the animals of Co group.

It is known that chronic ethanol consumption can interfere with the liver lipid metabolism [90], being common the occurrence of high HDL [91, 92] and cholesterol [93, 94] levels. Furthermore, ketamine administration generally promotes an increase in serum cholesterol levels [95, 96] and changes in serum triglyceride levels [97, 98]. Studies conducted in different species of monkeys exposed to ketamine promoted both cholesterol and triglycerides increase in *Macaca fascicularis* [99], or the opposite effect, in *Macaca radiata* [100]. Thus, it is possible to suggest that the ketamine and/or ethanol treatment can promote synergistic or even antagonistic effects in the serum lipid markers.

It is known that the chronic recreational use of ketamine in humans can promote hemorrhagic cystitis, associated with chronic inflammation and urothelial ulceration [101], although the toxic mechanism of action involved in this process is still not fully elucidated. Our histopathological and urinalysis results were not able to show any significant alterations that could result in bladder injury, suggesting that the dose or exposure period employed were not sufficient to promote such effects.

On the other hand, the results for renal function showed that the treatment with ketamine, in combination with ethanol, increased creatinine levels when compared with the treatment with ketamine alone. In fact, a study conducted by Gvozdenovic *et al.*, [102] in dogs exposed to ketamine and ethanol 12% in drinking water for 30 d, showed that creatinine levels were also elevated in these animals, however, no effect was observed in urea levels, which did not characterize renal injury. In fact, ketamine is the anaesthetic drug of choice to be used in surgery of patients with some risk of kidney disease, as it does not promote any harmful effects in the kidneys [103]. In the case of ethanol, studies report that its chronic use can significantly increase urea and creatinine serum levels, as was observed by Das *et al.*, [104] in rats exposed to ethanol (1.6 g/kg/BW/day) for 12 w.

CONCLUSION

In conclusion, even though the present experimental conditions of ketamine and ethanol administration did not elicit changes on immune organs of rats treated for 28 d, changes on serum biochemistry of ALP levels, lipid profile alteration, and renal function were observed. Considering this, there is no doubt of the necessity to perform further experiments in order to investigate and elucidate such effects, since different and not always consistent results were observed by other authors, using either different doses, routes of administration, animal models, or periods of experimentation from those used here. Thus, the future goal of our research group is to delineate other experimental trials targeting these effects, in order to better understand the possible toxic mechanism of action of each drug and to establish if the association of both may result in a synergistic/antagonistic mode of action to promote intoxication.

AUTHOR CONTRIBUTION

Patrícia Franciscane Mendes: performed all animal experimentation and laboratorial analyses, also executed the statistical analyses, results in interpretation and paper writing.

Karin Argenti Simon: development of the experimental design, selection of drug doses, period and route of administration, performance in some experimental procedures, discussion of the results and paper writing.

Isis Machado Hueza: first author adviser's, development of the experimental design, selection of drug doses, period and route of administration, performance in some experimental procedures, discussion of the results and paper writing.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest

FUNDING

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brazil [grant number 140019/2015-4] that provided financial support for the conduction of this research.

REFERENCES

1. Tavares BF, Beria JU, Lima M. Prevalência do uso de drogas e desempenho escolar entre adolescentes. Rev Saude Publica 2001;35:150-8.
2. Macht DI. The history of opium and some of its preparation and alkaloids. JAMA 1915;64:477-61.
3. Booth M. Opium-a history, New York: St Martin's Griffin; 1998.

4. Orth APS, More CLO. Funcionamento de famílias com membros dependentes de substâncias psicoativas. *Psicologia Argumento* 2008;26:293-303.
5. Focchi GRA. Dependência de drogas: uma abordagem para leigos. *Psychiatry Online Brazil* 2004;9:1-15.
6. Silva FCC, Dantas RT, Cito MCO, Silva MIG, Vasconcelos SMM, Fonteles MMF, et al. Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. *Rev Neurosci* 2010;18:227-37.
7. Suvarna Y, Shivamurthy MC. Therapeutic use of dependence causing agents: the past and the present. *J Crit Rev* 2016;3:44-7.
8. WHO. Ketamine: update review report. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
9. Yen CF, Hsu SY, Cheng CP. Polysubstance use and its correlates in adolescent ecstasy users in Taiwan. *Addict Behav* 2007;32:2286-91.
10. Kenna GA, Lewis DC. Risk factors for alcohol and other drug use by healthcare professionals. *Subst Abuse Treat Prev Policy* 2008;3:1-8.
11. Food and Drug Administration-FDA. Ketamine abuse. *FDA Drug Bull* 1979;9:24.
12. Jansen KL. A review of the nonmedical use of ketamine: use, users and consequences. *J Psychoactive Drugs* 2000;32:419-33.
13. UNODC. World drug report. Vienna: United Nations Publications: United Nations office on Drugs and Crime; 38. p. 2016
14. Advisory Council on the Misuse of Drugs-ACMD. A consultation on proposals to reschedule ketamine under the Misuse of Drugs Regulations; 2014. p. 1-15.
15. DEA. *Schedules of Controlled Substances: Placement of Ketamine into Schedule III*. United States: U. S. Department of Justice-Drug Enforcement Administration; 1999.
16. Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 1983;79:565-75.
17. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 2000;47:351-4.
18. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, et al. A randomized trial of an N-Methyl-D-Aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:856-64.
19. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanaesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist ketamine in humans. *Arch Gen Psychiatry* 1994;51:199-214.
20. Abanades S, Peiro AM, Farre M. Club drugs: old medicines as new party drugs. *Med Clin* 2004;123:305-11.
21. Wolff K, Winstock AR. Ketamine from medicine to misuse. *CNS Drugs* 2006;20:199-18.
22. Sun J, Li F, Cheng J, Xu J. Effect of ketamine on NF-kappa B activity and TNF-alpha production in endotoxin-treated rats. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:181-6.
23. Beilin B, Rusabrov Y, Shapira Y, Roytblat L, Greemberg L, Yardeni IZ, et al. Low-dose ketamine affects immune responses in humans during the early post-operative period. *Br J Anaesth* 2007;99:522-7.
24. Roussabrov E, Davies JM, Bessler H, Davies JM, Shapira Y. Effect of ketamine on inflammatory and immune responses after short-duration surgery in obese patients. *Open Anesthesiol J* 2008;2:40-5.
25. Zahler S, Heindl B, Becker BF. Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999;43:1011-6.
26. Weigand M, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils *in vitro*. *Anesth Analg* 2000;90:206-12.
27. PDF. Alcohol and Drug Problem Overview. New York: Partnership for a Drug-Free.org; 2010. p. 5.
28. UNODC. World Drug Report 2012. New York: United Nations Publications: United Nations office on Drugs and Crime; 2012. p. 112.
29. Davies M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* 2003;28:263-74.
30. Schuckit MA. Alcohol-use disorders. *Lancet* 2009;373:492-501.
31. Molina PE, Happel KI, Zhang P, Kolls JK, Nelson S. Focus on: alcohol and immune system. *Alcohol Res Health* 2010;33:97-108.
32. Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Stertz L, Kapczinski F, et al. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:450-5.
33. Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK, et al. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull* 2009;79:418-21.
34. Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, et al. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett* 2015;584:83-7.
35. Wai MSM, Chan WM, Zhang AQ, Wu Y, Yew DT. Long-term ketamine and ketamine plus alcohol treatments produced damages in liver and kidney. *Hum Exp Toxicol* 2012;31:877-86.
36. Engleman EA, Rodd ZA, Bell RL, Murphy JM. The role of 5-HT3 receptors in drug abuse and as a target for pharmacotherapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7:454-67.
37. Coffin P, Galea S, Ahern J, Leon AC, Vlahov D, Tardiff K. Opiates, cocaine and alcohol combinations in accidental drug overdose deaths in New York City. *Addiction* 2003;98:739-47.
38. Coffin P, Sherman S, Curtis M. Underestimated and overlooked: a global overview of drug overdose and overdose prevention. London: International Harm Reduction Association; 2010.
39. Peters A, Davies T, Richardson A. Multi-site samples of injecting drug users in Edinburgh: prevalence and correlates of risky injecting practices. *Addiction* 1998;92:253-67.
40. EMCDDA. The state of drugs problem in Europe. Luxembourg: Publications Office of the European Union: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; 2012.
41. ACMD. Ketamine: a review of use and harm. London, England: Advisory Council on the Misuse of Drugs; 2013. p. 48.
42. WHO. Expert Committee on Drug Dependence. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2006.
43. Chan WM, Xu J, Fan M, Jiang Y, Tsui TY, Wai MS, et al. Downregulation in the human and mice cerebella after ketamine versus ketamine plus ethanol treatment. *Malar Res Treat* 2011;75:258-64.
44. De Kock M, Loix S, Lavand'homme P. Ketamine and peripheral inflammation. *CNS Neurol Ther* 2013;19:403-10.
45. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol* 2004;113:224-30.
46. Walker SE. Estrogen and autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;40:60-5.
47. FDA. General Toxicology Studies. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration; 2009;4:42-67.
48. Heron I, Berg K. The actions of interferon are potentiated at elevated temperature. *Nature* 1978;274:508-10.
49. Roberts NJ Jr. Impact of temperature elevation on immunologic defenses. *Rev Infect Dis* 1991;13:462-72.
50. Idova G, Cheido M, Devoino L. Modulation of the immune response by changing neuromediator systems activity under stress. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:535-40.
51. Stevens KR, Gallo MA. Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies. Principles and methods of toxicology, New York: Raven Press; 1989. p. 929.
52. Bosma A, Brouwer A, Seifert WF, Knook DL. Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. *J Pathol* 1988;156:15-21.
53. Kuzmin A, Liljequist S, Meis J, Chefer V, Shippenberg T, Bakalkin G. Repeated moderate-dose ethanol bouts impair cognitive function in Wistar rats. *Addict Biol* 2012;17:132-40.

54. Baptista RFF, Taipeiro EF, Queiroz RHC, Chies AB, Cordellini S. Estresse isolado ou associado ao etanol libera prostanóides em aorta de ratos via α -adrenoceptores. *Arq Bras Cardiol* 2012; 102:211-8.
55. Nelson S, Bagby G, Summer WR. Alcohol suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor activity in serum and lung. *Life Sci* 1989;44:673-76.
56. Greenberg S, Zhao X, Hua L, Wang JF, Nelson S, Ouyang J. Ethanol inhibits lung clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a neutrophil and nitric oxide-dependent mechanism *in vivo*. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:735-44.
57. Jerrells TR, Marietta CA, Eckardt MJ, Majchrowicz E, Weight FF. Effects of ethanol administration on parameters of immunocompetence in rats. *J Leukocyte Biol* 1986;39:499-510.
58. Abadie-Guedes R, Guedes RCA, Bezerra RS. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:1563-7.
59. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria; 2016. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br>. [Last accessed on 01 Jul 2017].
60. Kale MA, Bindu SM, Khadkikar P. Role of antioxidants and nutrition in oxidative stress: a review. *Int J Appl Pharm* 2015;7:1-4.
61. Chandra RK. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J Nutr* 1992;122:597-600.
62. Prentice AM. The thymus: a barometer of malnutrition. *Br J Nutr* 1999;81:345-7.
63. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition-review. *Trends Immunol* 2016;37:386-98.
64. Fataccioli V, Andraud E, Gentil M, French SW, Rouach H. Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. *Hepatology* 1999;29:14-20.
65. Rofael HZ. Effect of ketamine pretreatment on cocaine-mediated hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett* 2004;152:213-22.
66. Warren RJ, Kirkpatrick RL, Gibson DF, Scanlon PF. Xylazine hydrochloride-induced anorexia in white-tailed deer. *JWD* 1984;20:66-8.
67. Van Der Eems K, Brown RD. Effect of caffeine sodium benzoate, ketamine hydrochloride, and yohimbine hydrochloride on xylazine hydrochloride-induced anorexia in white-tailed deer. *JWD* 1986;22:403-6.
68. Docherty JR, McGrath JC. A comparison of pre and post junctional potencies of several alpha-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygeus muscle of the rat. Evidence for two types of post junctional alpha-adrenoceptor. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1980;312:107-16.
69. Harrison NL, Simmonds MA. Quantitative studies on some antagonists of N-methyl D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 1985;84:381-91.
70. Suter PM. Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42:197-227.
71. Lieber CS. Perspectives: do alcohol calories count? *Am J Clin Nutr* 1991a;54:976-82.
72. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood *in vitro*. *Anesth Analg* 1999;89:665-9.
73. Starkenburg S, Munroe ME, Waltenbaugh C. Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1221-30.
74. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A, Catalano D, Kodys K. Reduced all reactive T-cell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN gamma levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1766-72.
75. Taniguchi T, Shibatta K, Yamamoto K. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rat. *Anesthesiology* 2001;95:928-32.
76. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* 2006;34:504-14.
77. Singh G, Dhadwal N, Harikumar SL. Experimental models for hepatotoxicity. *Asian J Pharm Clin Res* 2015;8:70-4.
78. Verma N. Introduction to hyperlipidemia and its treatment: a review. *Int J Curr Pharm Res* 2017;9:6-14.
79. Lieber CS. Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacol Ther* 1990;46:1-41.
80. Lieber CS. Metabolism of ethanol and associated hepatotoxicity. *Drug Alcohol Rev* 1991b;10:175-202.
81. Boubekri N, Boukaabache R, Amrani A, Belfarhi L, Zama D, Boumaza O, et al. Hepatoprotective effect of *Genista quadriflora* munby extract against ethanol induced toxicity. *Asian J Pharm Clin Res* 2014;7:226-9.
82. Mössner LD, Schmitz A, Theurillat R, Thormann W, Mevissen M. Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs, and humans. *Am J Vet Res* 2011;72:1505-13.
83. Noppers IM, Niesters M, Aarts LP, Bauer MC, Drewes AM, Dahan A, et al. Drug-induced liver injury following a repeated course of ketamine treatment for chronic pain in CRPS type 1 patients: a report of 3 cases. *Pain* 2011;152:2173-8.
84. Madsen NB, Tuba J. On the source of the alkaline phosphatase in rat serum. *J Biol Chem* 1952;195:741-50.
85. Hoffmann WE, Everds N, Pignatello M, Solter PF. Automated and Semiautomated analysis of rat alkaline phosphatase isoenzymes. *Toxicol Pathol* 1994;22:633-8.
86. Bennett JS, Gosset KA, McCarthy MP, Simpson ED. Effects of ketamine hydrochloride on serum biochemical and hematologic variables in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Vet Clin Pathol* 1992;21:15-8.
87. González Gil A, Illera JC, Silván G, Illera M. Effects of the anaesthetic/tranquillizer treatments on selected plasma biochemical parameters in NZW rabbits. *Lab Anim* 2003;37:155-61.
88. Narisawa S, Wennberg C, Millán JL. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol* 2011;193:125-33.
89. Farrokhifar SH, Jafari RA, Majd NE, Tabatabaee SRF, Mayahi M. Effects of dietary vitamin E on mucosal maltase and alkaline phosphatase enzyme activities and on the amount of mucosal malonyl dialdehyde in broiler chickens. *Vet Res Forum* 2013;4:221-5.
90. Wang Z, Yao T, Song Z. Chronic alcohol consumption disrupted cholesterol homeostasis in rats: downregulation of low-density lipoprotein receptor and enhancement of cholesterol biosynthesis pathway in the liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:471-8.
91. Feinman L, Lieber CS. Ethanol and lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* 1999;70:791-2.
92. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Crigui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Br Med J* 1999;319:1523-8.
93. DeCarli LM, Lieber CS. Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr* 1967;91:331-6.
94. Lefevre AF, DeCarli LM, Lieber CS. Effect of ethanol on cholesterol and bile acid metabolism. *J Lipid Res* 1972; 13:48-55.
95. Van Der Merwe JN, Du Bruyn DB, Van Der Walt WH, Sly MR. Effects of certain anaesthetics on plasma metabolite concentrations in the baboon (*Papio ursinus*). *J S Afr Vet Assoc* 1987;58:125-9.
96. Rovirosa-Hernandez MJ, Garcia-Orduna F, Caba M, Canales-Espinosa D, Hermine-Lagunes J, Torres-Pelayo VR. Blood parameters are little affected by time of sampling after the application of ketamine in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *J Med Primatol* 2011;40:294-9.
97. Yoshida T, Suzuki K, Shimizu T, Cho F, Honjo S. The effects of ketamine anesthesia on hematological and serum biochemical values in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Jikken Dobutsu* 1986;35:455-61.
98. González Gil A, Silvan G, Illera M, Illera JC. The effects of anesthesia on the clinical chemistry of New Zealand White rabbits. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004;43:25-9.

99. Kim CY, Lee HS, Han SC, Heo JD, Kwon MS, Ha CS, *et al.* Hematological and serum biochemical values in Cynomolgus monkeys anesthetized with ketamine hydrochloride. *J Med Primatol* 2005;34:96-100.
100. Venkatesan R, Nagarajan P, Rajaretnam RS, Majumdar SS. Hematologic and serum biochemical values in aged female bonnet macaques (*Macaca radiata*) anesthetized with ketamine hydrochloride. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2006;45:45-8.
101. Baker SC, Stahlschmidt J, Oxley J, Hinley J, Eardley I, Marsh F, *et al.* Nerve hyperplasia: a unique feature of ketamine cystitis. *Acta Neuropathol Commun* 2013;1:64.
102. Gvozdenovic LV, Popovic MR, Jakovljevic VS, Lukic V. Effect of fentanyl, ketamine and thalamonal on some biochemical parameters in ethanol-treated and untreated dogs. *Hum Exp Toxicol* 1993;12:279-83.
103. Rezende M, Mama K. Anesthesia for patients with renal disease. *Clini Brief*; 2015. p. 41-4.
104. Das SK, Varadhan S, Dhanya L, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of chronic ethanol exposure on renal function tests and oxidative stress in kidney. *Indian J Clin Biochem* 2008;23:341-4.

How to cite this article

- Patricia Franciscone Mendes, Karin Argenti Simon, Isis Machado Hueza. Toxic and immunotoxic evaluation of ketamine and/or ethanol in rats during 28 D. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9(9):205-214.