

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

**Efeito neuroprotetor dos anestésicos intravenosos,
Etomidato e Propofol, em um modelo de isquemia
cerebral *in vitro***

Aluna: Nancy Scardua Binda

Orientador: Renato Santiago Gomez

Belo Horizonte 2013

Nancy Scardua Binda

**Efeito neuroprotetor dos anestésicos intravenosos,
Etomidato e Propofol, em um modelo de isquemia
cerebral *in vitro***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para o grau de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

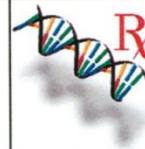
Orientador: Renato Santiago Gomez

Belo Horizonte 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DOS ANESTÉSICOS INTRAVENOSOS, ETOMIDATO E PROPOFOL, NA ISQUEMIA CEREBRAL

NANCY SCARDUA BINDA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovada em 26 de setembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof.(a) Renato Santiago Gomez Orientador
UFMG


Prof(a). Cristina Guatimosim Fonseca
UFMG


Prof(a). Luciene Bruno Vieira
UFMG


Prof(a). Ana Cristina do Nascimento Pinheiro
SCBH


Rafael Mourão Agostini

IEP-SCBH

Belo Horizonte, 26 de setembro de 2013.

Apoio Institucional

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Medicina Molecular (INCT Medicina Molecular).

***“A MENTE QUE SE ABRE A UMA NOVA IDEIA JAMAIS RETORNA
AO TAMANHO ORIGINAL.”***
(Albert Einstein)

*Ao meu filho João Henrique, meu amor, minha vida, meu tudo.
Aos meus pais, José Antônio e Nanci, e irmãos, mesmo de longe, sempre
estiveram presentes.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, que sempre ilumina meus passos.

Ao meu querido e amado filho, João Henrique, por ter tornado os meus dias mais felizes e doces.

Aos meus pais, agradeço pela minha existência, pelo amor e por nunca medirem esforços. Amo vocês!

Aos meus irmãos Felipe, Felício e Nathália, obrigada pelo amor, pelo apoio, por sempre estarem presentes em minha vida mesmo tão longe. Amo vocês!

Ao Felipe por ter me acompanhando durante toda esta jornada, sempre com muita compreensão, carinho e amor.

À querida amiga e irmã Aninha, por ter me encaminhado para o mundo da isquemia, ensinando-me o que é ciência de qualidade.

A tia Jocélia, Ralphe, Guido e Rodolpho. Vocês são a minha segunda família.

À minha grande amiga Juliana pela amizade verdadeira, carinho, convivência e conselhos. Irmã científica e da vida!

À Patrícia Lima pesquisadora séria, sempre sensata e com ótimos conselhos científicos e de vida! Uma grande amiga que a ciência me presenteou.

Ao grande amigo Bráulio, por ter me apresentado o mundo da ciência e pelo exemplo de disciplina e garra!

À Luciene pelos sorrisos sinceros, pela grande amizade, carinho e companhia.

Ao meu orientador, Renato Santiago Gomez, por ter aceitado encarar o desafio de me orientar. Obrigada pela confiança, ensinamentos e orientação.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, boa vontade e suporte científico.

Aos professores Marco Antônio Máximo Prado e Vânia Prado pelos ensinamentos científicos.

Aos professores Luiz Armando e Marco Aurélio pela acolhida no laboratório de Neurociências para que eu pudesse concluir este trabalho.

À professora Cristina Guatimosin pelos conselhos.

À aluna de iniciação científica Flávia Lage e Karen pela convivência, amizade, ajuda na realização dos experimentos e sugestões científicas.

Aos amigos do antigo laboratório de Neurociências e Genética Molecular: Alexandre Magno, Alexandre Barros, Antônio, Célio, Cíntia, Cláudio, Cristina, Daniela, Danuza, Elizete, Flávia Lage, Flávia Melo, Gabriel, Jessika, Luiza, Lucélia, Luciana, Nayara, Patrícia, Patrícia Couto, Paulo Henrique, Priscila, Simone, Vítor; pela convivência, conselhos e discussões científicas, carinho e amizade.

Aos amigos da Veterinária: Karen e Mário Sérgio, vocês vieram de passagem, mas ficaram para sempre!

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo.....	xv
Abstrat.....	xvii
1. Introdução	1
1.1 Isquemia Cerebral	2
1.2 Cascata Isquêmica	4
1.3 Neurotransmissão Glutamatérgica.....	6
1.4 Excitotoxicidade Glutamatérgica	11
1.5 Estresse Oxidativo	13
1.6 Papel do Cálcio na Isquemia Cerebral.....	18
1.7 Uso de Anestésicos como Agentes Neuroprotetores	20
1.8 Etomidato	22
1.9 Propofol	23
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. Material e Método	28
3.1 Material	29
3.1.1 Drogas e Reagentes	29
3.1.2 Equipamentos.....	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Animais.....	30
3.2.2 Soluções.....	30
3.2.3 Preparo de fatias de hipocampo.....	30
3.2.4 Modelo de privação de glicose e oxigênio <i>in vitro</i>	30
3.2.5 Marcação com a sonda etídeo homodímero	31
3.2.6 Obtenção de imagens no Microscópio de Fluorescência.....	32
3.2.7 Quantificação das imagens obtidas no Microscópio de Fluorescência	32
3.2.8 Determinação da viabilidade celular através da dosagem de lactato desidrogenase	32

3.2.9 Ensaio de dosagem de glutamato.....	33
3.2.10 Preparo do sinpatosoma.....	33
3.2.11 Ensaio para avaliar o sódio interno sinaptosomal com a sonda SBFI 10.....	34
3.2.12 Ensaio para avaliar cálcio interno sinaptosomal com a sonda FURA-2.....	35
3.2.13 Transfecção com os subtipos de canais de cálcio –P/Q e –N.....	35
3.2.14 Ensaio para avaliar o cálcio interno em células transfectadas com os subtipos de canais de cálcio.....	36
3.2.15 Homogeneização das fatias de hipocampo.....	37
3.2.16 Ensaio para quantificar as espécies reativas de oxigênio.....	37
3.2.17 Ensaio para quantificar a atividade da superóxido dismutase.....	37
3.2.18 Ensaio para quantificar a atividade da catalase.....	38
3.2.19 Ensaio para quantificar o conteúdo GSH.....	38
3.2.20 Ensaio para quantificar a atividade da glutational peroxidase.....	38
3.2.21 Ensaio para quantificar a atividade da glutational redutase.....	38
3.2.22 Ensaio para quantificar a atividade da glutational S transferase.....	39
3.2.23 Ensaio para avaliar a atividade antioxidante da molécula de propofol.....	39
3.2.24 Ensaio para quantificar a lipoperoxidação.....	39
3.2.25 Análise estatística dos dados.....	39
4. Resultados.....	40
4.1 Avaliação do efeito neuroprotetor dos anestésicos Etomidato e Propofol na isquemia cerebral <i>in vitro</i>	41
4.1.1 Avaliação da viabilidade celular através da quantificação por microscopia de fluorescência.....	41
4.1.2 Avaliação da viabilidade celular através da dosagem da atividade de lactato desidrogenase liberada.....	44
4.2 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol na liberação de glutamato na isquemia cerebral <i>in vitro</i>	46
4.3 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol o influxo de sódio em terminais sinápticos isolados.....	48
4.4 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol o influxo de cálcio em terminais sinápticos isolados.....	50
4.5 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol obre os canais de cálcio transfectados isoladamente em células HEK.....	52
4.6 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre as Espécies Reativas de	

Oxigênio.....	56
4.7 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre Superóxido Dismutase	58
4.8 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre Catalase	60
4.9 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o sistema glutaciona	62
4.9.1 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o conteúdo de GSH... ..	62
4.9.2 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre a GPx	64
4.9.3 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre a GR	66
4.9.4 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre a GST	68
4.10 Avaliação da atividade antioxidante da molécula de Propofol <i>per si</i>	70
4.11 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre Lipoperoxidação.....	71
5. Discussão	74
5.1 Etapa 1: Avaliação da viabilidade celular através da quantificação por microscopia de fluorescência e dosagem da atividade de lactato desidrogenase liberada.....	75
5.2 Etapa 2: Avaliação do efeito dos anestésico Etomidato e Propofol na liberação de glutamato	77
5.3 Etapa 3: Efeito dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o estresse oxidativo	82
6. Conclusões preliminares.....	87
7. Referências Bibliográficas.....	90

Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama com os principais eventos que ocorrem após a oclusão de um vaso cerebral e subsequente reperfusão	6
Figura 2: Diagrama esquemático mostrando diferenças relativas entre um receptor NMDA..	10
Figura 3: Desenho esquemático da sinalização neuronal dos receptores metabotrópicos de glutamato	11
Figura 4: Representação esquemática de algumas das principais vias de geração de radicais livres após injúria do SNC.....	14
Figura 5: Esquema representativo da cadeia respiratória na mitocôndria e a geração de radicais livres de oxigênio	14
Figura 6: Principais fontes e vias de geração de oxidantes que levam ao dano cerebral após a isquemia e reperfusão do tecido	15
Figura 7: Controle do estresse oxidativo das células descrevendo o sistema glutaciona.....	17
Figura 8: Efeito neuroprotetor do Etomidato e Propofol em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas	43
Figura 9: Efeito neuroprotetor do Etomidato e Propofol em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas através da dosagem de lactato desidrogenase liberada	45
Figura 10: Efeito do etomidato e propofol sobre a liberação de glutamato em fatias de hipocampo isquemiadas.....	47
Figura 11: Efeito do etomidato e propofol sobre o influxo de sódio em terminais sinápticos isolados	49
Figura 12: Efeito do etomidato e propofol sobre o influxo de cálcio em terminais sinápticos isolados	51
Figura 13: Influxo de cálcio em células HEK 293 transfectadas com CCSV do tipo -N	54
Figura 14: Influxo de cálcio em células HEK 293 transfectadas com CCSV do tipo -P/Q.....	55
Figura 15: Efeito do Etomidato e Propofol na produção de EROs	57
Figura 16: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da superóxido dismutase.....	59
Figura 17: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da catalase.....	61
Figura 18: Efeito do Etomidato e Propofol o conteúdo de GSH	63
Figura 19: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da glutaciona peroxidase	65
Figura 20: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da glutaciona redutase	67
Figura 21: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da glutaciona S transferase.....	69

Figura 22: Avaliação da atividade antioxidante da molécula de propofol <i>per si</i>	71
Figura 23: Efeito do Etomidato e Propofol na peroxidação lipídica	73

Lista de Abreviaturas

AVE	Acidente vascular encefálico
LCEA	Líquido cérebro espinhal artificial
Λ	Comprimento de onda
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
min	Minuto
H	Hora
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGTA	Etilenoglicol-bis- β -aminoetil éster
HEK	Human embryonary kidney Cells
HEPES	(N-[2-hidroxiethyl] piperazina-N-[2-ácido etano sulfônico])
Ca^{2+}	Íons cálcio
Cl^-	Íons cloreto
Na^+	Íons sódio
K^+	Íons potássio
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole-propionato
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
GABA	Ácido γ aminobutírico
IP_3	Inositol 1,4,5 trifosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
CCSV	Canais para cálcio sensíveis a voltagem
IC_{50}	Concentração capaz de inibir 50% da ação máxima efetiva de uma determinada droga
TTX	Tetrodotoxina
OMS	Organização Mundial de Saúde
RE	Retículo Endoplasmático
CSSV	Canais de sódio sensíveis à voltagem
DGO	Deprivação de glicose e oxigênio

[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
H ⁺	Íons hidrogênio
SNC	Sistema nervoso central
NMDA _R	Receptor glutamatérgico NMDA
AMPA _R	Receptor glutamatérgico AMPA
KA	Cainato
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
PSD-95	Proteína densidade pós-sináptica 95
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
MVIIA	Omega conotoxina MVIIA
ERO	Especies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
XO	Xantina oxidase
XDH	Xantina desidrogenase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
COX	Ciclooxigenase
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
REDOX	Reação de redução e oxidação
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GST	Glutationa S transferase

RESUMO

Vários trabalhos sugerem que o propofol e o etomidato, anestésicos intravenosos, são capazes de reduzir a injúria neuronal decorrente da isquemia cerebral. Porém, resultados dessa neuroproteção em modelos de isquemia cerebral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm sido conflitantes. Além disso, os mecanismos envolvidos na neuroproteção do propofol e do etomidato ainda não foram esclarecidos. Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito neuroprotetor do propofol e do etomidato em um modelo de isquemia cerebral *in vitro* e os prováveis mecanismos envolvidos. **Metódos:** Para avaliar o efeito neuroprotetor, foi utilizado o modelo de fatias de hipocampo submetidas à deprivação de glicose e oxigênio durante 20 minutos. Para investigar os possíveis locais de ação desse anestésico na neuroproteção avaliamos a liberação de glutamato, vias envolvendo cálcio e sódio e o estresse oxidativo. **Resultados:** Em todas as concentrações avaliadas do propofol (1-300 μM) e do etomidato (1-100 μM) foram capazes de reduzir a morte neuronal na região CA1 do hipocampo. O propofol e o etomidato foram capazes de reduzir a liberação de glutamato após o insulto isquêmico. Esse efeito parece ser dependente da redução pelo propofol do influxo de Na^+ pelos canais de Na^+ dependentes de voltagem sensíveis à tetrodotoxina e do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, pelos canais -P/Q e -N. Já o etomidato reduz o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, pelos canais -P/Q e -N, atuando em maior extensão sobre os canais -N do que em -P/Q, mas não atua sobre os canais de Na^+ dependentes de voltagem. No ensaio para quantificar as ERO, tanto o propofol, quanto o etomidato na concentração de 10 μM reduziram a quantidade de ERO em relação ao grupo isquemia. Na avaliação da peroxidação lipídica, o propofol e o etomidato conseguiram reduzir o conteúdo de MDA ao nível observado no grupo controle. Ao avaliar a ação desses anestésicos sobre o sistema de defesa antioxidante observou-se o seguinte resultado: o propofol e o etomidato foram capazes de aumentar a atividade das enzimas do sistema glutaciona, como a glutaciona peroxidase e redutase, além de aumentar o nível de glutaciona reduzida disponível. Somente o propofol foi capaz de modular positivamente a atividade da glutaciona S-transferase. Somente o etomidato foi capaz de aumentar a atividade da superóxido dismutase da catalase, efeito não observado com o grupo tratado com propofol. Além disso, foi verificada a atividade antioxidante per si da molécula de propofol. **Conclusão:** Os anestésicos intravenoso propofol e etomidato possuem efeito neuroprotetor em um modelo de fatias de hipocampo submetidas à privação de oxigênio

e baixa de glicose, e este efeito neuroprotetor pode estar relacionado à redução da liberação de glutamato e atenuação da lesão por estresse oxidativo. A redução da liberação de glutamato pelo propofol parece ocorrer devido à redução do influxo de sódio dependentes de voltagem sensíveis à tetrodotoxina e cálcio do subtipo $-P/Q$ e $-N$ do meio extracelular. Já redução da liberação de glutamato pelo etomidato parece ocorrer somente devido à redução do influxo cálcio do subtipo $-P/Q$ e $-N$ do meio extracelular. A atenuação da lesão por estresse oxidativo está diretamente relacionada à capacidade destes anestésicos reduzirem a quantidade de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica após o insulto isquêmico. Este fato se explica pela modulação positiva na atividade das enzimas do sistema antioxidante e pela atividade antioxidante per si do propofol.

ABSTRACT

Several studies shows that propofol and etomidate, intravenous anesthetic, reduces neuronal injury due to brain ischemia. However, the results of such neuroprotection in ischemic models have been conflicting, both *in vitro* and *in vivo* studies. In addition, the mechanisms involved in propofol and etomidato neuroprotection have not been clarified. The aim of the present study was to investigate the neuroprotector effect of propofol and etomidate in a model of brain ischemia *in vitro*, as well as probable mechanisms involved. **Methods:** To investigate the neuroprotector effect of propofol and etomidate, we used the model hippocampus slices submitted to glucose and oxigen deprivation for 20 minutes. To investigate the possible sites of action of anesthetic neuroprotection, we evaluate the release of glutamate pathways involving calcium and sodium and oxidative stress. **Results:** In all the concentrations of propofol (1-300 μM) and etomidate (1-100 μM) evaluated were efficient in reducing neuronal death in the CA1 region of the hippocampus. Propofol and etomidate were able to reduce glutamate release after ischemic insult. This effect appears to be dependent on the reduction of propofol by the influx of Na^+ by the Na^+ channels voltage dependent tetrodotoxin-sensitive and the reduction on Ca^{2+} influx by the P/Q and N subtypes channels, from the extracellular environment. However etomidate reduces only Ca^{2+} influx by the P/Q and N subtypes channels, from the extracellular environment, acting on a greater extent than N channel P/Q. Etomidate has no effect on Na^+ channels voltage dependent . In assay for quantifying ROS both, propofol and etomidato, in the concentration of 10 μM reduced ROS amount in relation to ischemia group. Lipid peroxidation assessment, propofol and etomidato, managed to reduce the MDA content to the level observed in the control group. In assessing the action of these anesthetics on the antioxidant defense system observed the following result: propofol and etomidate were able to increase the activity of the glutathione system enzymes, such as glutathione peroxidase and reductase, and increase the level of glutathione reduced available. Only propofol was able to positively modulate the activity of glutathione S-transferase. While only etomidate was able to increase the activity of superoxide dismutase and catalase, an effect not observed in the group treated with propofol. In addition, the antioxidant activity was observed per molecule of propofol itself. **Conclusion:** The intravenous anesthetic, propofol and etomidato, have neuroprotective effect in a model of hippocampal slices subjected to oxygen deprivation

and low glucose, and this neuroprotective effect may be related to reduced glutamate release and attenuation of oxidative stress injury. The reduction in glutamate release in propofol group treated appears to occur due to the reduced influx of sodium by sodiumdependent voltage sensitive to tetrodotoxina channels and calcium P/Q and N subtype channels, from the extracellular medium. Already reduced glutamate release by etomidate seems to occur only due to reduced calcium influx of P/Q and N subtype channels, from the extracellular medium. The attenuation of oxidative stress injury is directly related to the ability of these anesthetics reduce the amount of reactive oxygen species and lipid peroxidation after the ischemic insult. This fact is explained by the positive modulation of the activity of the enzymes of the antioxidant system and the antioxidant activity of propofol itself.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Isquemia Cerebral

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma definição clínica usada para descrever sintomas de desordens neurológicas agudas causadas por distúrbios do fluxo sanguíneo cerebral. É caracterizado pela rápida progressão dos sinais e sintomas de perda de função cerebral (Feuerstein and Wang 2000). É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a segunda causa de morte e morbidade entre adultos no mundo. Nos países do hemisfério norte, a isquemia cerebral é responsável por cerca de 10-12% das mortes, sendo que 12% dessas ocorrem em pessoas com menos de 65 anos (Murrays e cols 1997, Donnan e cols 2008). Em 2002, o AVE foi considerado a sexta causa mais comum de incapacidade (Donnan e cols 2008).

As estatísticas brasileiras seguem os dados mundiais. Segundo a OMS, a taxa de mortalidade das doenças cerebrovasculares no Brasil, no ano de 2004, foi de 49,35 por 100.000 habitantes, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares e das neoplasias malignas.

Os fatores de risco associados a um AVE são classificados em fixos, como a idade e sexo, e fatores modificáveis como tabagismo, sedentarismo, obesidade e comorbidades, tais como hipertensão e diabetes. A incidência de isquemia cerebral em homens é maior do que em mulheres na faixa etária mais jovem, em faixas etárias mais avançadas essa proporção se iguala (American Heart Association). É interessante destacar que a frequência de eventos cerebrovasculares em mulheres aumenta acentuadamente após a menopausa (McCullough e cols, 2003).

Dentre as pessoas que são acometidas por algum tipo de evento isquêmico, 20% morrem na primeira semana e, 33% morrem no primeiro ano. Além da alta taxa de mortalidade, cerca de 2/3 dos pacientes que sobrevivem permanecem com sequelas físicas e neurológicas (Pulsinelli 1995, Ricci e cols 1991).

O AVE pode ter origem isquêmica ou hemorrágica, com maior proporção de eventos isquêmicos – 80% (Donnan e cols 2008). A isquemia cerebral é decorrente de uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral em uma determinada região do cérebro (isquemia focal) ou, em todo o cérebro (isquemia global). A isquemia focal é causada, geralmente, pela oclusão de uma determinada artéria cerebral por um êmbolo ou trombo. Por outro lado, a isquemia global está

relacionada com uma hipotensão prolongada, choque e parada cardiocirculatória. Enquanto que o AVE hemorrágico ocorre devido ao rompimento de uma artéria causando extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico (Wise e cols 2005).

A gravidade da lesão cerebral durante a isquemia depende de vários fatores como: tempo de duração, localização da oclusão vascular, presença de circulação colateral e medidas de proteção do cérebro isquêmico (Gert, 1997). O tecido cerebral possui alto consumo de glicose e oxigênio e depende, exclusivamente, da fosforilação oxidativa para a produção de energia, não possuindo nenhuma reserva energética. A interrupção ou redução do fluxo sanguíneo cerebral restringe a chegada de nutrientes, principalmente glicose e oxigênio, prejudicando o fornecimento de energia necessário à manutenção do gradiente iônico das células do tecido cerebral (Martin e cols 1994). Com a depleção energética, o potencial de membrana é modificado ocorrendo a despolarização dos neurônios e da glia.

A escassez de geração de ATP interrompe a atividade de vários mecanismos celulares vitais, incluindo principalmente as bombas iônicas presentes na membrana que dependem de energia para a sua funcionalidade. Devido a isso, há um aumento da concentração de íons, principalmente do Ca^{2+} e Na^+ intracelular e de K^+ extracelular assim como, o aumento liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, especialmente o glutamato (Gert 1997). Ao mesmo tempo, processos dependentes de energia e gradiente eletrogênico, como a recaptção de glutamato pelos astrócitos e neurônios, são impedidos, contribuindo para o aumento da concentração de glutamato na fenda sináptica. O excesso de glutamato presente na fenda sináptica promove a ativação de receptores inotrópicos, NMDA e AMPA, e metabotrópicos (via fosfolipase C e sinalização IP_3), contribuindo para a sobrecarga de Ca^{2+} na célula (Dirnagl e cols, 1999).

Após o insulto isquêmico, ocorre o retorno do fluxo sanguíneo, período denominado como reperfusão. A reperfusão de um tecido isquêmico restaura o aporte de oxigênio e glicose. Neste momento, a fosforilação oxidativa é restabelecida, o que contribui para a normalização dos processos energéticos fisiológicos celulares. Entretanto, a reperfusão tecidual desencadeia reações bioquímicas que aceleram o processo de glicólise, aumentando a acidose láctica e a produção de radicais livres tóxicos, gerando estresse oxidativo e, conseqüentemente, formando a “lesão de reperfusão” (Hallenbeck e cols 1990). Já estão bem estabelecidos que as espécies

reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são importantes mediadores na injúria cerebral após o insulto isquêmico (revisado por Brouns e cols, 2009).

Os mecanismos descritos anteriormente não ocorrem somente na região isquêmica, mas também em áreas ao redor do trauma inicial que são atingidas com produtos tóxicos produzidos pelo evento isquêmico inicial. Isso leva a formação de uma região denominada “penumbra isquêmica”. O fenômeno de morte celular programada (apoptose) desenvolve papel crítico na penumbra. Atualmente, a redução ou prevenção da morte celular na penumbra isquêmica é um dos principais alvos de estudos de intervenção farmacológica (Gert 1997).

1.2 Cascata Isquêmica

A cascata isquêmica é definida como uma série de processos neuroquímicos que ocorrem após a isquemia cerebral. Esse evento dura, em geral, algumas horas, mas pode se estender por vários dias após o insulto isquêmico e a restauração da circulação sanguínea (Zivin e cols, 1998).

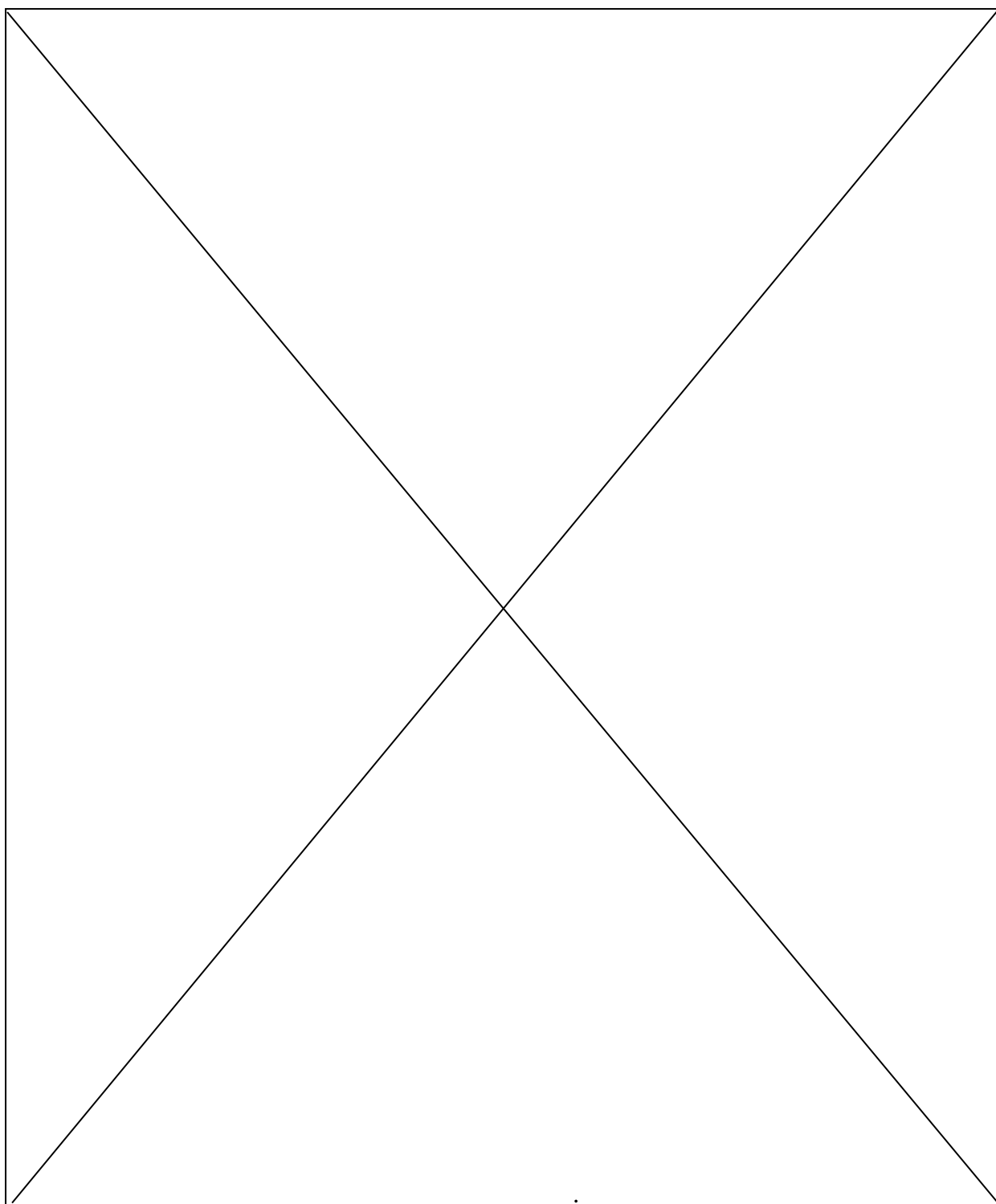
A morte das células por isquemia resulta de mudanças decorrentes da inibição da fosforilação oxidativa e o aparecimento de uma série de reações intracelulares (Figura 1). Essas mudanças incluem queda do pH e da produção de ATP, produção de radicais livres pela mitocôndria, aumento da concentração intracelular de Na^+ e, despolarização da membrana como resultado da falência das bombas de Na^+/K^+ ATPase, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase e reversão do transportador de Ca^{2+} - Na^+ (Lipton 1999).

Devido à depleção bioenergética, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tornam-se ativados e neurotransmissores, especialmente o glutamato, são liberados no espaço extracelular. Ao mesmo tempo, a recaptação pré-sináptica e pelas células da glia desses neurotransmissores, outro processo dependente de energia, é afetada levando ao acúmulo no espaço extracelular. O glutamato presente no espaço extracelular irá ativar os receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA/cainato) e os receptores metabotrópicos contribuindo para o aumento intracelular de Ca^{2+} , Na^+ e Cl^- (Nhels e cols 1989). O influxo desses íons promove a entrada de água, através do gradiente osmótico, causando edema citotóxico e lise celular (Lipton 1999). O edema subsequente pode afetar a perfusão de regiões que circundam a região isquêmica em decorrência do aumento da pressão intracraniana, compressão vascular e hérnia cerebral (Dirnagl e cols 1999).

O aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) está relacionado a vários eventos citoplasmáticos e nucleares que impactam no desenvolvimento do dano tecidual (Figura 1), como por exemplo: ativação de enzimas proteolíticas que degradam as proteínas do cito esqueleto (Chen e cols 1997, Furukawa e cols 1997), ativação de fosfolipase C e sinalização $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, ativação de fosfolipase A_2 , ciclooxigenase e óxido nítrico sintetase, enzimas geradoras de radicais livres que levam a peroxidação lipídica e dano da membrana (Dirnagl e cols 1999). É bom ressaltar que os radicais livres do oxigênio são importantes moléculas sinalizadoras envolvidas no processo de apoptose e inflamação.

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ também é capaz de afetar o funcionamento da mitocôndria, levando ao rompimento da membrana interna e a oxidação de proteínas que medeiam o transporte de elétrons, a extrusão de H^+ e a produção de ATP. Esse rompimento da membrana da mitocôndria leva à liberação de vários fatores apoptóticos no citoplasma disparando esse processo na célula. É importante compreender que todos os receptores de neurotransmissores estarão ativados durante o insulto isquêmico pelos seus respectivos ligantes. Esse processo é potencializado pela abertura sustentada e concomitante de canais de Ca^{2+} (Lipton 1999). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inibe, por sua vez, o metabolismo oxidativo, criando assim um ciclo vicioso (Verkhatsky e cols 1996, De Flora e cols 1998).

Portanto, a cascata isquêmica pode ser considerada um fenômeno heterogêneo, que pode ser resumida como uma falência do metabolismo energético das células, seguido de excitotoxicidade, estresse oxidativo, disfunção da barreira hematoencefálica, injúria microvascular, ativação hemostática, inflamação pós-isquêmica e, finalmente, morte celular de neurônios, glia e células endoteliais (Brouns e cols, 2009).



Retirado de Durukan e cols, 2007. Reprodução não autorizada.

Figura 1: Diagrama com os principais eventos que ocorrem após a oclusão de um vaso cerebral e subsequente reperfusão. Essa figura não compreende todos os eventos.

1.3 Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e, provavelmente, está envolvido na maioria das funções normais do cérebro como cognição, memória, aprendizado (Danbolt, 2001), atividade motora, plasticidade, percepção da dor e atividade sináptica (Dingledine e cols, 1999). O glutamato também desempenha um papel importante no desenvolvimento do SNC, incluindo indução e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte celular (McDonald, 1990, Komuro, 1993, Danbolt, 2001).

A maioria dos neurônios e células gliais possuem receptores de glutamato em suas membranas plasmáticas (Ho sli e cols, 1993; Shelton e cols, 1999; Bergles e cols., 2000). Além disso, o glutamato possui papel de sinalização em tecido e órgãos periféricos, bem como células endócrinas (Danbolt, 2001).

Em condições fisiológicas, a concentração extracelular de glutamato é mantida em níveis baixos, micromolar, apesar da concentração no cérebro está em torno de 10 a 15 milimolar/kg de tecido. As maiores quantidades de glutamato são encontradas nos terminais nervosos (Ottersen e cols., 1996).

A síntese desse neurotransmissor ocorre por dois processos. No primeiro, o glutamato é formado a partir da glicose via ciclo de Krebs e da transaminação do α -cetoglutarato (Danbolt, 2001). O segundo processo ocorre nos astrócitos, onde o glutamato é recaptado do fluido extracelular por meio de transportadores e é convertido em glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina é liberada, por transportador, no fluido extracelular e captada, através outros transportadores específicos, pelo terminal nervoso, onde convertida localmente pela glutaminase em glutamato (revisado por Conti e Weinber, 1999). O glutamato presente no citosol do terminal nervoso é transportado para vesículas sinápticas, de onde é liberado após um estímulo de despolarização, promovido pela entrada de íons cálcio. O glutamato, presente no citoplasma, pode ser liberado através de proteínas presentes na membrana plasmática. Esse é um processo de liberação não vesicular que ocorre em pequena extensão e é independente dos íons Ca^{2+} (Nicholls, 1987; Danbolt, 2001). O tráfego glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos parece ser a maior rota de reciclagem de glutamato no SNC (Danbolt, 2001).

Após ser liberado na fenda sináptica o glutamato interage com seus receptores nas membranas pré e pós-sinápticas. O término da ação do glutamato na fenda sináptica

ocorre pela recaptação deste por transportadores de alta afinidade específicos (transportadores de aminoácido excitatório – EAAT) que estão presentes em neurônios e astrócitos. Em mamíferos já foram caracterizados 5 isoformas de EAAT, sendo que o EAAT1 e EAAT2 são responsáveis pela maior parte do processo de recaptação do glutamato (Danbolt, 2001). O processo de recaptação pelos EAAT é dirigido pelo gradiente eletroquímico presente na membrana. É bem aceito que o transporte no EAAT envolve dois ciclos sequenciais: i) simporte de um glutamato com três de sódio e um próton do meio exterior para o interior da célula, e ii) contra transporte de um íon potássio reorientando o transportador “vazio” para a sua conformação inicial (Levy et al., 1998; Zerangue e Kavanaugh, 1996). Isto gera uma estequiometria de influxo líquido de duas cargas positivas para cada ciclo de transporte, permitindo a geração de um gradiente até 10^6 vezes de influxo de glutamato através da membrana celular (Zerangue e Kavanaugh, 1996). Além disso, os EAATs possuem uma condutância aniônica ativada pelo glutamato que resulta no influxo de cloreto, sob condições fisiológicas. Esse processo funciona como um sensor de realimentação para amortecer a excitabilidade celular e prevenir a liberação de glutamato adicional (Fairman et al., 1995; Picaud et al., 1995; Veruki et al., 2006; Wadiche et al., 1995).

O glutamato medeia a sua transmissão excitatória através de sua ligação a receptores ionotrópicos e metabotrópicos presentes na superfície celular (Nakanishi, 1994; Hollman, 1994).

Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos são uma família de canais iônicos caracterizados de acordo com o seu agonista mais seletivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metilisoxazolepropionato (AMPA) e cainato (KA). Já os receptores metabotrópicos estão acoplados à proteína G, através da quais promovem a modulação de efeitos intracelulares (segundos mensageiros), ativando ou inibindo diversos eventos de transdução do sinal celular (Obrenovitch, 1997).

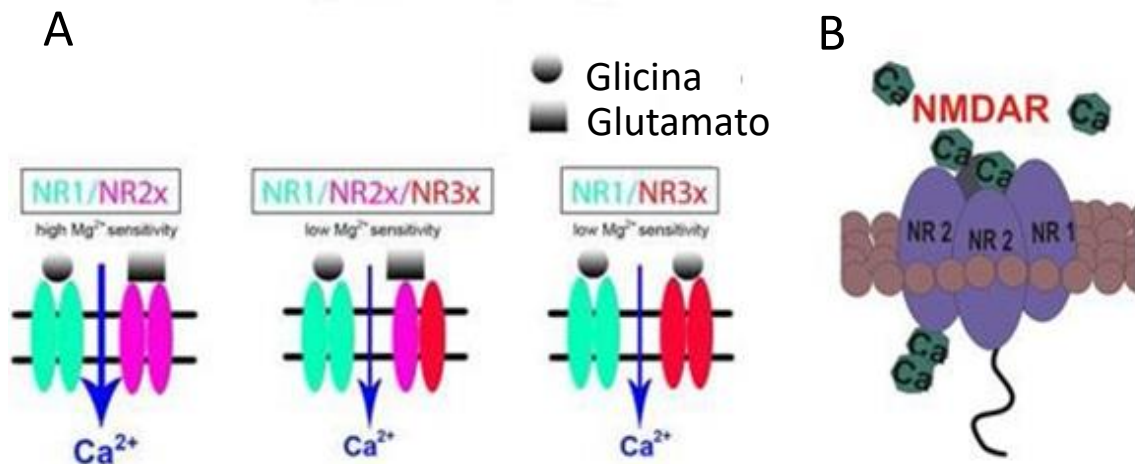
Os receptores NMDA são complexos multiméricos, geralmente tetraméricos, formados pelas subunidades NR1 associadas a uma ou mais subunidades NR2 e , em alguns casos, associados à subunidade NR3 (Chatterton e cols, 2002; McBain e cols, 1994) – Figura 2A. A subunidade NR2 possui quatro isoformas: NR2A-D, possuindo distribuições distintas pelo SNC (Ikeda e cols, 1992; Kutsuwada e cols, 1992; Monyer e cols, 1992), enquanto que a subunidade NR1 possui 8 variantes de splicing (Lau e cols, 2010). A união de 2 subunidades NR1 formam o poro do canal que exhibe as propriedades clássicas desse receptor como: ativação pelo glutamato mediada pela co-

ativação da glicina, bloqueio do poro pelo íon magnésio, interações com poliamidas e sensibilidade ao pH (Lau e cols, 2010). A subunidade NR2 possui um papel de regular e refinar a função do NMDA_R, modulando as características da subunidade NR1 (Lau e cols, 2010) – Figura 2B. Os NMDA_R são altamente permeáveis ao íons Ca²⁺, sendo particularmente eficaz na promoção da entrada Ca²⁺, mas também permitem a passagem de íons Na⁺. São responsáveis pela transmissão excitatória lenta, estando diretamente envolvidos no processo de plasticidade sináptica (Ozawa e cols, 1997).

Os receptores AMPA (AMPA_R) são formados a partir da combinação de 4 subunidades (GluR1-4) e requerem somente glutamato para a sua ativação. Já os receptores kainato (KA_R) são formados pela combinação das subunidades GluR5-7 e KA1-2 (Lau e cols, 2010) e também necessitam somente do glutamato para a sua ativação. Ambos receptores são permeáveis aos íons Na⁺ e K⁺, mas alguns AMPA_R permitem a entrada de Ca²⁺ (aqueles que não possuam a subunidade GluR2) (Burnashev e cols, 1995). Fisiologicamente, os AMPA_R são responsáveis pela transmissão excitatória rápida requerida para a remoção do íon magnésio presente no poro do NMDA_R (Lau e cols, 2010). Os KA_R possuem um papel modulatório na transmissão sináptica, regulando a liberação de glutamato (Lerma, 2003). Embora a localização dos AMPA_R tenha predominância na membrana pós-sináptica, os KA_R apresentam uma ampla distribuição pelas membranas pré (Chittajallu e cols, 1996) e pós-sinápticas (Castilho e cols, 1997).

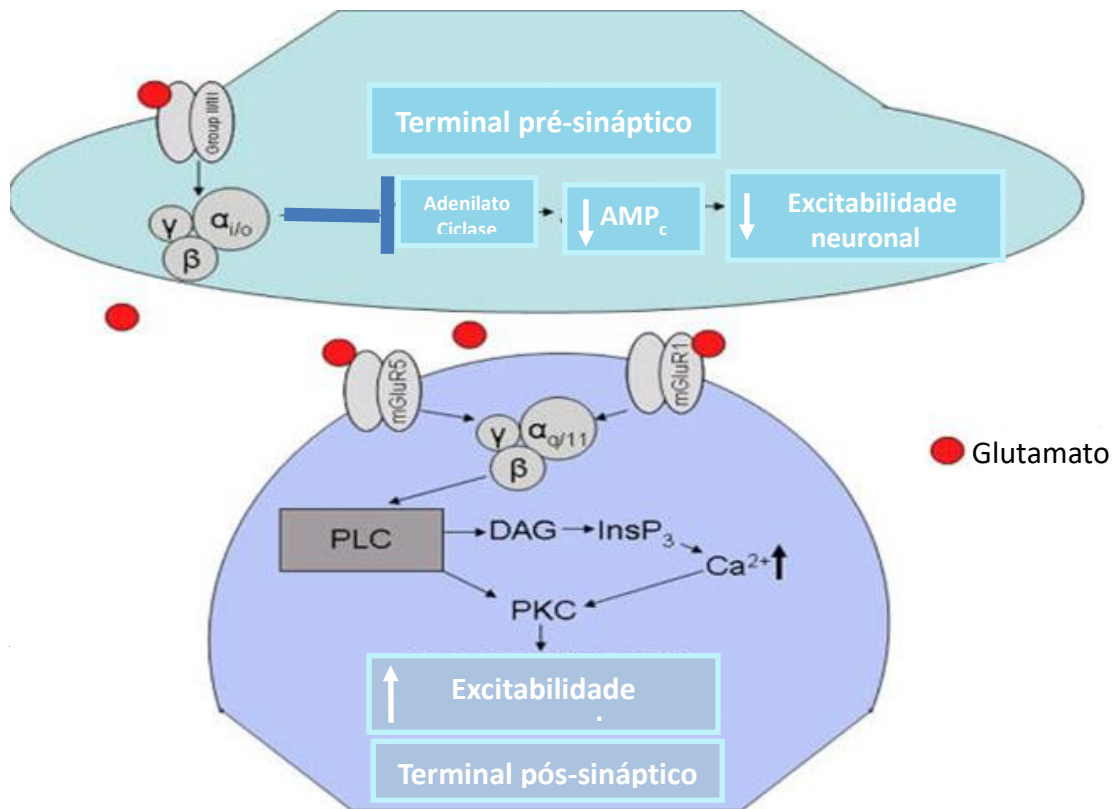
Os receptores metabotrópicos são proteínas com 7 domínios transmembranares acoplados à proteína G. Os oito subtipos são classificados em três grupos de acordo com as vias de sinal de transdução e perfis farmacológicos (Byrnes e cols, 2009) –Figura 3. O grupo I (mGluR1 e mGluR5) estão localizados na membrana pós-sináptica e atuam ativando a fosfolipase C, levando a um aumento da liberação de cálcio intracelular, (Karim e cols, 2001). Embora sejam poucos estudados os mGluR1 e mGluR5 também podem ser encontrados na microglia, astrócitos e oligodendrócitos. Fisiologicamente, os mGluR do grupo I atuam potencializando a sinalização glutamatérgica, ou seja, aumentam a excitabilidade neuronal (Zhong e cols, 2000). Os grupos II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4 a mGluR8) são preferencialmente pré-sinápticos e estão ligados a adenilato ciclase inibitória, diminuindo assim o AMPc. A ativação desses receptores resulta na inibição da liberação de glutamato através da inibição da entrada de Ca²⁺ através CCSV, reduzindo a sinalização glutamatérgica (Byrnes e cols, 2009). Similarmente ao grupo I, os mGluR do grupo II e III tem sido encontrados em astrócitos

e na micróglia (Byrnes e cols, 2009).



Adaptado de Szydlowska, 2010 (2B) e Low and Wee, 2010

Figura 2: Diagrama esquemático mostrando diferenças relativas entre um receptor NMDA. A) NMDA_R convencional NR1/NR2 (esquerda), um NMDA_R heterotrimérico NR1/NR2/NR3 (centro) e NMDA_R heterodimérico NR1/NR3 ativado pela glicina (direita). Três diferenças mais importantes são: 1. Sensibilidade relativa ao Mg²⁺, 2. Necessidade de ligação com glutamato e glicina e 3. Permeabilidade relativa ao Ca²⁺. B) Estrutura tridimensional de um NMDA_R.



Adaptado de Byrnes e cols, 2009

Figura 3: Desenho esquemático da sinalização neuronal dos receptores metabotrópicos de glutamato. DAG: diacilglicerol, InsP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol, PKC: proteína quinase C, PLC: fosfolipase C.

1.4 Excitotoxicidade glutamatérgica

Excitotoxicidade é definida como a morte neuronal decorrente da presença de altas concentrações de glutamato no meio extracelular ou de compostos com ação agonista sobre os receptores de glutamato (Olney, 1969). A excitotoxicidade glutamatérgica está envolvida em várias patologias como na isquemia cerebral, traumatismo craniano, doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson e epilepsia (Meldrum, 2000). Além de causar toxicidade para neurônios, o excesso de glutamato também está envolvido com a morte de células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos (Danbolt, 2001).

O processo de excitotoxicidade induzido pelo glutamato possui uma interação sinérgica com o estresse oxidativo e o dano mitocondrial (Novelli e cols, 1988). Embora todos os receptores ionotrópicos e alguns metabotrópicos estejam envolvidos no

processo de excitotoxicidade, o NMDA_R parece desenvolver o papel central.

O principal elemento da excitotoxicidade glutamatérgica é a concentração patológica de Ca²⁺, conseqüente, principalmente, da superativação de NMDA_R e vias intracelulares ligadas a esses receptores que levam a mais alterações da homeostase dos íons Ca²⁺ (revisado por Zadori e cols, 2012). Já foi demonstrado que os NMDA_R estão ligados a nNOS pela proteína de ancoragem PSD-95, com isso o influxo excessivo de Ca²⁺ através desses receptores pode evocar a síntese de NO em quantidades tóxicas (Sattler e cols, 1999), causando dano celular tanto pela ativação de vias dependentes de cálcio, como vias ligadas ao NO. A PSD-95 liga-se a subunidade NR2B do NMDA_R, o que possivelmente explica o fato que a excitotoxicidade do glutamato é principalmente mediado pelos receptores que contém essa subunidade (Liu e cols, 2007).

Os receptores metabotrópicos de glutamato do tipo I modulam várias vias que estão envolvidas como a morte celular quando estão superativadas, como: i) a ativação da fosfolipase C, levando a um aumento da liberação de cálcio intracelular, que pode culminar em estresse oxidativo do retículo endoplasmático (Paschen, 1996); ii) potenciação do NMDA_R, iii) liberação de ácido aracdônico, podendo levar a formação de íons superóxido e conseqüente lipoperoxidação e dano ao DNA. Com isso, não é surpreendente que a adição de agonistas de mGlu I, como o DHPG, aumente a morte neuronal induzida por NMDA_R (Allen e cols, 2001) e que antagonistas desses receptores tenham propriedades neuroprotetoras (Faden e cols, 2001).

Além da ativação enzimática patológica promovida pelo Ca²⁺, as altas concentrações desse íon excedem a capacidade de sequestro dele pelas mitocôndrias, rompendo o tamponamento de íons Ca²⁺ intracelulares promovido por essa organela; o que leva à disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, propagação da morte celular (Ichas e cols, 1998).

Outro fator que colabora para a excitotoxicidade é a reversão dos transportadores de glutamato durante a isquemia. Em condições fisiológicas, a terminação da transmissão sináptica glutamatérgica ocorre pela remoção do glutamato da fenda sináptica por transportadores de alta afinidade presentes nos astrócitos e neurônios (Rothstein e cols, 1996). Em processos patológicos, como na isquemia, esses transportadores passam a operar de forma reversa, devido ao distúrbio iônico que se estabelece nessa condição (Szatkowski e cols, 1990).

1.5 Estresse Oxidativo

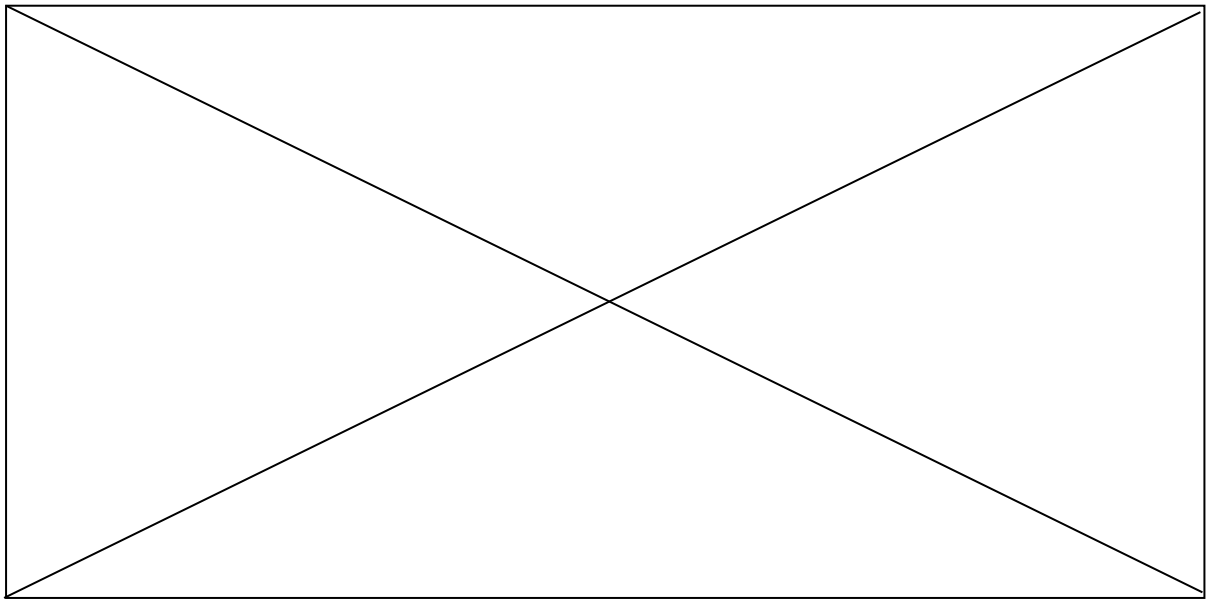
Os radicais livres são espécies moleculares que contêm um ou mais elétrons de valência desemparelhados, que não contribuem para ligações intramoleculares, porém são altamente reativos a outras moléculas como: DNA, lipídeos e proteínas; pareando seus elétrons ao substrato, e levando à oxidação dessas moléculas (Dröge, 2002). Os radicais livres, incluindo as espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de oxigênio (ERO), estão implicados na patofisiologia de várias doenças do SNC, como: traumatismos craniano e medular, isquemia e doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson e Huntington) (Léwen e cols, 2000).

Na isquemia cerebral, as liberações de glutamato juntamente com a formação de radicais livres cooperam em uma série de eventos que precedem a morte neuronal (Bondy e cols, 1993; Cheng e cols, 1994; Dugan e cols, 1995, Sengpiel e cols, 1998). O glutamato medeia o aumento intracelular de Ca^{2+} que ativa várias vias de produção de radical livres, como: i) conversão de xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO), ii) ativação da óxido nítrico sintetase, iii) ativação da via da fosfolipase A_2 (PLA_2)-ciclooxigenase (COX) (Léwen e cols, 2000) e NAPH oxidase (NOX) (Alekseenko e cols, 2012) – Figura 4.

Além da ativação de enzimas pró-oxidantes citadas acima, a mitocôndria é uma das maiores fontes intracelular de geração de EROs (revisado por Circu e cols, 2010). Cerca de 1-5% do O_2 consumido é direcionado para a produção de EROs, principalmente nos níveis dos complexos I e III da cadeia respiratória (Ames B. 1993) – Figura 5.

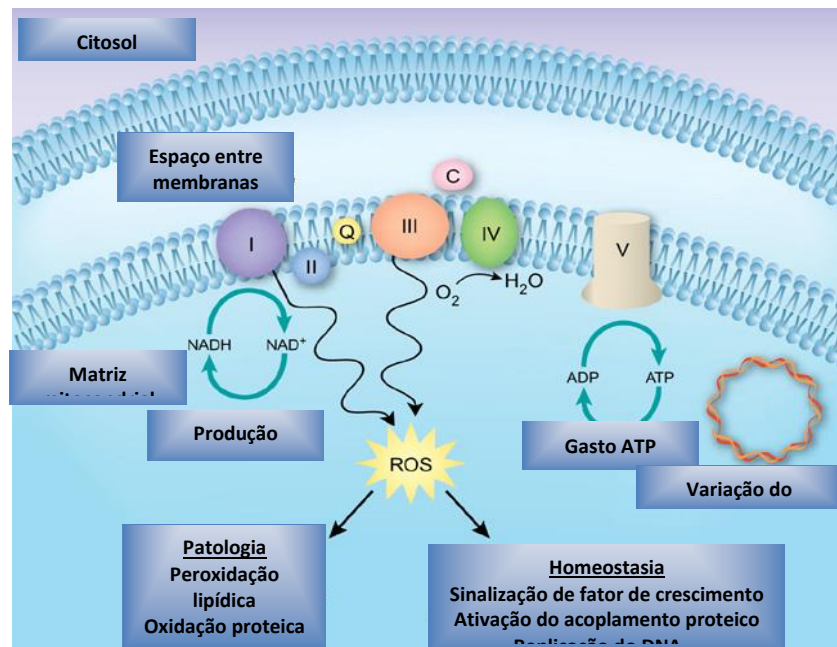
As enzimas pró oxidantes como a XO, PLA_2 -COX e NADPH oxidase (NOX) e a cadeia respiratória mitocondrial geram o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, que pode reagir com NO, proveniente da óxido nítrico sintetase, formando o íon peroxinitrito, pela reação: $\text{NO} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{ONOO}$. O íon peroxinitrito é um potente radical livre que causa nitração de proteínas e disfunção celular (Beckman e cols, 1990). O óxido nítrico também pode causar distúrbios de função celular através da reação de nitrosilação de proteínas, que é independente da formação do peroxinitrito. O processo isquêmico aumenta atividade das enzimas constitutivas NOS I (neuronal) e NOS III (endotelial), além de aumentar a expressão de NOS II (enzima induzível) através da ação de várias citocinas (Masters, 1994). A SOD (superóxido dismutase), enzima antioxidante endógena, catalisa a seguinte reação de detoxificação: $\text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$, que é posteriormente convertido

em H₂O pela catalase ou glutathiona peroxidase ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) – (Figura 6).



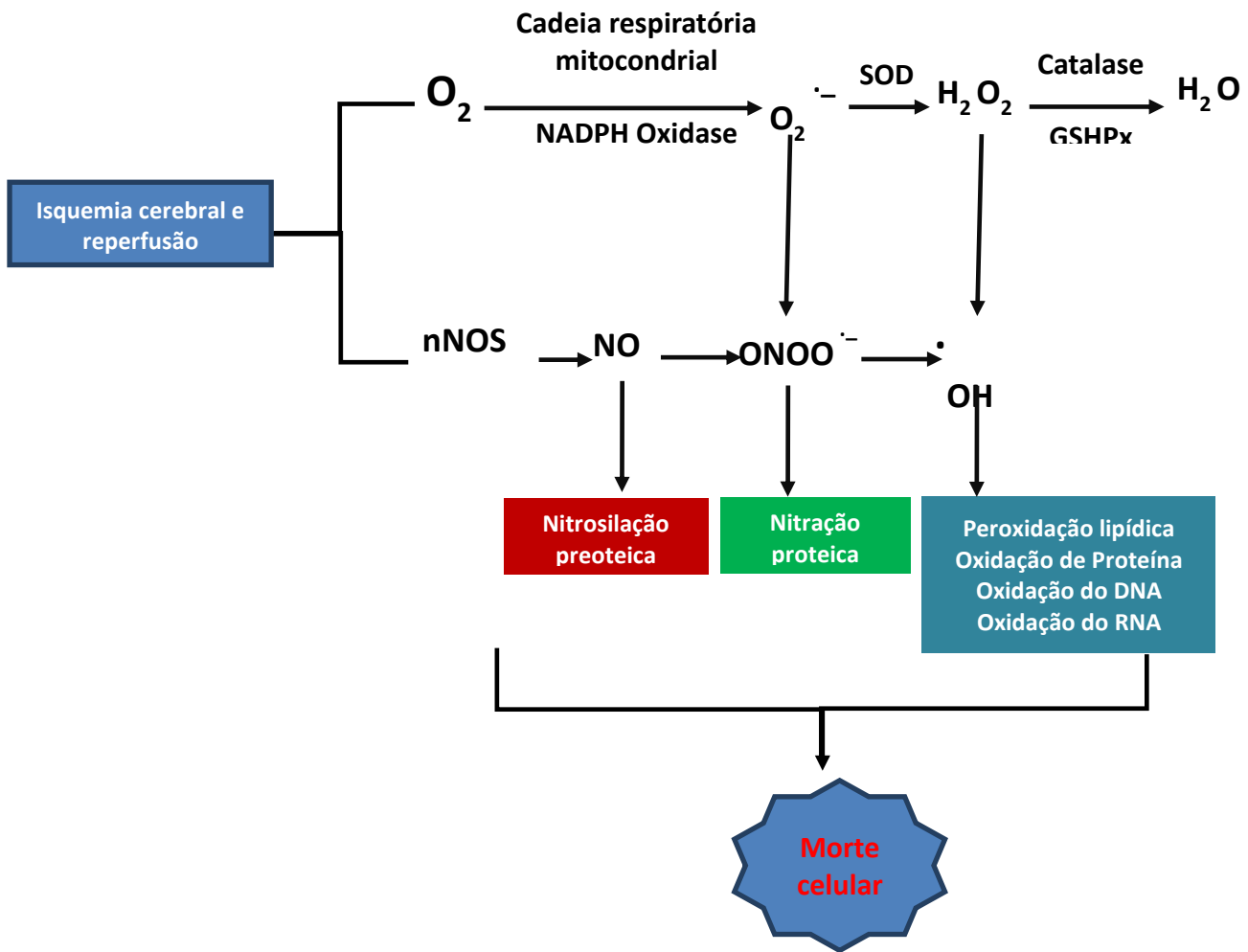
Retirado de Léwen e cols, 2000. Reprodução não autorizada

Figura 4: Representação esquemática de algumas das principais vias de geração de radicais livres após injúria do SNC. XDH: xantina desidrogenase, XO: xantina oxidase, NOS: óxido nítrico sintetase neuronal, COX-2: ciclooxigenase 2.



Adaptado de Baughm e cols, 2006.

Figura 5: Esquema representativo da cadeia respiratória na mitocôndria e a geração de radicais livres de oxigênio.



Fonte: próprio autor

Figura 6: Principais fontes e vias de geração de oxidantes que levam ao dano cerebral após a isquemia e reperfusão do tecido.

O ânion OH^{\cdot} é outro radical livre altamente reativo, envolvido com o dano celular, produzido a partir do peróxido de hidrogênio pela reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + Fe^{3+} + \cdot OH$), pela reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow OH^{\cdot} + O_2 + \cdot OH$) ou pelo $ONOO^{\cdot -}$ através de decomposição espontânea (Beckman e cols 1990; Chan, 1996).

O H_2O_2 possui boa solubilidade a lipídeos, atravessando rapidamente as membranas lipídicas. Similarmente, o íon superóxido também é capaz de atravessar as membranas através de canais aniônicos. Com isso, os efeitos desses oxidantes não ficam restritos ao local de gerador (Kontos, 2001).

A geração constitutiva de baixas concentrações de oxidantes é necessária, pois eles agem como moléculas sinalizadoras em várias funções celulares como regulação do tônus vascular, monitoramento da tensão de oxigênio e produção de eritropoetina

(Chan, 2001; Dröge, 2002). No entanto, a produção excessiva de radicais livres pode oxidar irreversivelmente macromoléculas como DNA, lipídeos e proteínas, culminando em dano tecidual.

Com a função de balancear e neutralizar os radicais livres gerados pelo organismo, as células possuem sistemas antioxidantes endógenos compostos por enzimas e moléculas antioxidantes. As principais enzimas antioxidantes endógenas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), exercendo um importante papel na manutenção de baixas concentrações de oxidantes, garantindo, assim, a homeostase REDOX (reações de redução e oxidação) no tecido. Além do sistema enzimático existem as moléculas antioxidantes, que são um componente essencial no processo de detoxificação, as principais são a glutathione, ácido ascórbico e vitamina E (Chan, 1996 e 2001).

A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical $O_2^{\cdot-}$ transformando-o em H_2O_2 . Já foram descritas várias isoformas desta enzima, mas as duas principais são encontradas no citosol na forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), e na mitocôndria com a forma SODMn (com manganês em seu sítio ativo). Vários estudos, especialmente os que descrevem a super-expressão da SOD em animais modificados geneticamente, têm provado que esta enzima está ativamente envolvida na redução das espécies reativas com neuroproteção após a isquemia cerebral (Chen e cols, 2011). A SOD trabalha em conjunto com outras enzimas, a CAT e a GPx, que removem o H_2O_2 gerado.

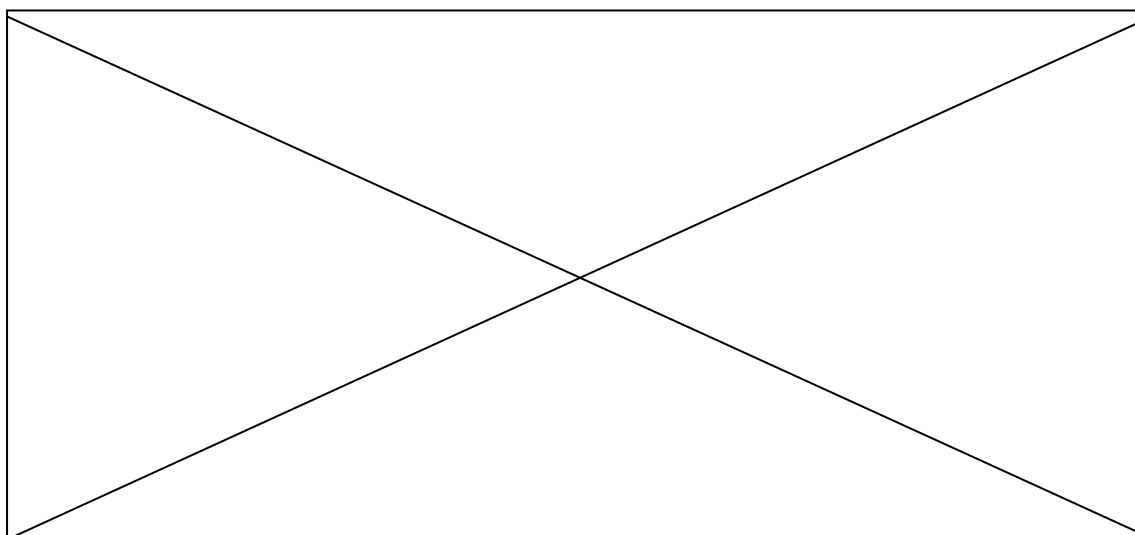
A CAT está presente na maioria dos organismos aeróbicos e tem como função proteger a célula dos danos oxidativos, localizando-se em maior abundância em peroxissomos. Esta enzima é uma proteína composta de 4 subunidades, cada uma com um grupo hemo, o qual contém ferro. É através do grupo hemo que ocorre a atividade catalítica da enzima, dismutando o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Reid e cols, 1981).

A GPx, uma seleno-proteína, é a enzima mais importante na remoção do H_2O_2 no cérebro. Sua atividade detoxificante contra peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos está relacionada à função antioxidante da GSH. Ela catalisa a reação de acoplamento de uma molécula de H_2O_2 com 2 moléculas de GSH, promovendo a redução da primeira e a oxidação da segunda (Halliwell e cols, 2007) – Figura 7. A reação está descrita abaixo:



O produto desta reação, a glutatona oxidada (GSSG), consiste em duas glutatonas reduzidas (GSH) ligadas por uma ponte de dissulfeto. A GSSG é reduzida a GSH pela ação da glutatona redutase (Halliwell e cols, 2007). A glutatona redutase é uma flavoenzima que composta por um dímero de oxiredutase ligado por uma ponte dissulfeto, que converte a GSSG em duas moléculas de GSH, usando o NAPH como cofator e um FAD como grupo prostético. A GR desempenha um papel crucial na manutenção do ambiente reduzido da célula e no combate do estresse oxidativo (Berkholz e cols, 2008). Essa enzima permite a reciclagem da glutatona, fornecendo GSH para dar continuidade ao ciclo de detoxificação – Figura 7.

A GST é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos a GSH, reduzindo sua toxicidade e permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, posteriormente metabolizados pela via do ácido mercaptúrico. São conhecidas diversas isoformas de GST, as quais podem possuir outras funções, como transporte intracelular de proteínas e modesta atividade glutatona peroxidase independente de selênio. Esta última função ocorre pela capacidade das GSTs em conjugar GSH a peróxidos orgânicos, gerando GSSG e o respectivo álcool (Halliwell e cols, 2007) - Figura 7.



Reprodução não autorizada

Figura 7: Controle do estresse oxidativo das células descrevendo o sistema glutatona. Esquema representativo de algumas das diferentes reações que ocorrem nas células para evitar o dano oxidativo gerado pelos ânions superóxidos, pelo peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. GPx (glutatona peroxidase), GR (glutatona redutase),

GST (Glutathione S-transferase), SOD (superóxido dismutase), GSSG (glutathione oxidada), GSH (glutathione reduzida).

No insulto isquêmico e durante o início da reperfusão tecidual existem alguns fatores que contribuem para a oxidação de macromoléculas, além do aumento de radicais livres citados previamente, ocorre à inativação das enzimas de detoxificação e o consumo das moléculas antioxidantes. Essas mudanças levam ao rompimento do sistema de defesa antioxidante do organismo, culminando em peroxidação lipídica, proteica, DNA, RNA (Chan, 2001). Portanto, o estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres sobrepõe à capacidade de escaneamento endógeno do sistema de defesa antioxidante (Brouns e cols, 2009).

O estresse oxidativo severo causa morte celular através de necrose, enquanto que o estresse oxidativo moderado leva à morte celular por apoptose (Evans e cols, 2004; Liu e cols, 1996; Lennon e cols, 1991).

Os radicais livres prejudicam a função mitocondrial, visto que eles oxidam proteínas que medeiam o transporte de elétrons, a extrusão de H^+ e produção de ATP, além de induzir o rompimento da membrana interna da mitocôndria, levando ao extravasamento de conteúdo apoptótico que fica armazenado entre as membranas interna e externa. Com isso, moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c são liberadas para o citoplasma desencadeando o processo apoptótico (Evans e cols, 2004; Liu e cols, 1996; Lennon e cols, 1991).

Além do dano celular cerebral, o estresse oxidativo também aumenta a permeabilidade da barreira hemato-encefálica devido à ativação de metaloproteinases (MMP-9) e dano endotelial celular.

1.6 Papel do Cálcio na Isquemia Cerebral

O íon Ca^{2+} governa múltiplos processos celulares, como o crescimento celular, diferenciação e atividade sináptica. Para realizar todas essas funções celulares e manter a homeostasia, existem vários mecanismos para manter a concentração desse íon em níveis adequados, permitindo sinais temporais e espaciais de forma localizada (Arundine e cols 2003).

Na excitotoxicidade, a liberação excessiva de glutamato leva ao rompimento da homeostasia do Ca^{2+} . O glutamato ativa receptores pós- sinápticos, incluindo receptores NMDA, AMPA e cainato. Após essa ativação, esses receptores permitem o influxo de

Ca^{2+} e Na^+ . O aumento excessivo de Ca^{2+} é produzido por essa ativação de receptores, principalmente através do receptor NMDA e, também, pela liberação de estoques internos e, portanto podem levar a perda dessa homeostasia e culminar em morte celular (Arundine e cols 2003).

A possibilidade de que alterações na homeostasia dos íons Ca^{2+} possam atuar na morte neuronal em estados patológicos, como isquemia cerebral e epilepsia, foram propostas há mais de 20 anos (Siesjo 1981). Schanne e cols, em 1979, propuseram que em condições patológicas associadas à insuficiência energética, há um aumento dos níveis de cálcio provenientes da ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e dos canais de Ca^{2+} acoplados a receptores, e também pela liberação de Ca^{2+} estocado em organelas celulares. O aumento de Ca^{2+} citosólico ativa fosfolipases, promove a degradação de membranas, formação de radicais livres, edema celular, distúrbios na síntese de ATP mitocondrial e finalmente morte celular. Essa hipótese do Ca^{2+} foi baseada em observações anteriores feitas em hepatócitos de ratos submetidos a várias toxinas. Nesses experimentos foi possível relacionar a morte celular ao aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico. A morte celular foi observada somente em células cultivadas em meio com a concentração normal de Ca^{2+} (1 mM) e não em células cultivadas em meio pobre em Ca^{2+} (20 μM). Esses experimentos mostraram que o influxo de Ca^{2+} induzido por um agente estressante engatilha processos patológicos resultando em morte celular (Schanne e cols 1979).

Essa hipótese original do cálcio vem sendo modificada ao longo dos anos e hoje vários estudos vêm mostrando que a morte neuronal não está necessariamente ligada ao aumento da atividade de Ca^{2+} citoplasmático. A hipótese do Ca^{2+} mitocondrial sugere que a captação de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria resulta na formação de espécies oxidativas, abertura do poro de transição mitocondrial e liberação de citocromo c, resultando assim em morte celular. Todos esses eventos podem acontecer sem que haja um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático (Koike e cols 1989).

A hipótese do Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) foi proposta primeiramente em 1996 por Paschen e colaboradores. Essa hipótese propõe que a depleção de Ca^{2+} dos estoques intracelulares é o engatilhador da morte celular neuronal (Paschen e cols. 1999 e Paschen 2000). O RE é um compartimento subcelular que exhibe alta atividade de Ca^{2+} . A depleção de cálcio estocado no RE é considerada uma forma severa de estresse que é potencialmente letal às células. Essa característica presente no RE em relação à homeostasia de Ca^{2+} difere este compartimento do citoplasma e da mitocôndria quanto

aos níveis de Ca^{2+} . Esses dois últimos compartimentos mantêm níveis baixos de Ca^{2+} em situações normais e aumentam consideravelmente a concentração de Ca^{2+} em que a célula é submetida a eventos estressantes. A homeostasia do Ca^{2+} do RE é realizada através dos receptores de IP3 e rianodina. Além desses receptores, há também uma bomba iônica de Ca^{2+} (SERCA) que bombeia íons Ca^{2+} do citoplasma para o interior do RE (Paschen 2003).

A isquemia tem efeito direto na homeostasia do Ca^{2+} do RE. O gradiente de Ca^{2+} entre o citoplasma e o RE é mantido pela SERCA, uma bomba iônica dependente de ATP. Esse processo é bloqueado durante a isquemia, pois a quantidade de energia não é suficiente para que esta bomba opere de forma adequada, promovendo assim o aumento de Ca^{2+} citoplasmático (Paschen 2003). Além da bomba SERCA, os receptores do RE também estão envolvidos no processo de morte celular neuronal. Foi observado em vários experimentos que o dantroleno, bloqueador dos receptores de rianodina, pode ser um agente neuroprotetor em condições que envolvem isquemia e excitotoxicidade (Frandsen cols 1992). Parece que o acoplamento entre RE e mitocôndria desenvolve papel importante na geração da morte celular neuronal uma vez que o acoplamento apoptótico envolvendo RE e mitocôndria seja estabelecido. Células neuronais em cultura foram tratadas com tunicamicina, um agente bloqueador da glicosilação das proteínas residentes do RE, promovendo assim liberação de Ca^{2+} . Esse evento foi responsável pela liberação de citocromo C da mitocôndria e consequente ativação de caspase-3, culminando em apoptose (Hacki e cols 2000).

1.7 Uso de Anestésicos como Agentes Neuroprotetores

A acentuada vulnerabilidade do cérebro à interrupção do fluxo sanguíneo tem levado a busca de novos agentes farmacológicos que possam reduzir a injúria após a isquemia cerebral. Entre esses, os anestésicos são considerados candidatos lógicos, devido à habilidade desses agentes em reduzir a taxa metabólica, antagonizar a excitotoxicidade do glutamato e, aumentar a transmissão sináptica inibitória. Consequentemente, há um considerável interesse na identificação de agentes anestésicos que possam reduzir a injúria neuronal isquêmica (Kawaguchi e cols, 2005).

A neuroproteção de agentes anestésicos foi descrita pela primeira vez há mais de 30 anos, quando os barbitúricos foram associados à redução do consumo de energia neuronal consequente à redução da atividade elétrica. Por muitos anos acreditou-se que

a neuroproteção dos anestésicos baseava-se principalmente pela diminuição da taxa metabólica cerebral decorrente da supressão elétrica (Koerner e Brambrink 2006). Atualmente, com o entendimento das várias etapas e vias envolvidas na morte celular isquêmica têm-se demonstrado que os anestésicos agem mais especificamente, podendo interferir na cascata isquêmica. Vários mecanismos em potencial têm sido descritos, incluindo a inibição das atividades excitatórias e potencialização dos circuitos inibitórios (Koerner e Brambrink 2006). Já foram relatados que muitos anestésicos agem como antagonistas do glutamato nos receptores NMDA e AMPA e agonistas de GABA nos receptores GABA-A (Grasshoff e cols 2005, Asahi e cols 2006). Além disso, estes agentes estão associados à redução da liberação de glutamato (Winegar e cols 2006, Westphalen e cols 2006) e ao aumento da recaptação de neurotransmissor na fenda sináptica, atenuando a morte dos neurônios por excitotoxicidade. Existem outros mecanismos que também podem estar envolvidos na neuroproteção pelos anestésicos, como o bloqueio do influxo de Ca^{2+} , ativação de receptores de adenosina A1 (Tas e cols 2005), ativação de cascatas de sinalização intracelular como a MAP Kinase e Akt que podem levar a alterações na expressão gênica, bem como a ação antioxidante (Lee e cols 2005). Portanto, parece que os efeitos específicos dos anestésicos na cascata isquêmica excedem os benefícios obtidos pela simples supressão da atividade metabólica cerebral (Koerner e cols 2006).

O grau de neuroproteção obtido pelos anestésicos assim como a duração do efeito ainda não está claro. Muitos estudos experimentais têm falhado em mostrar uma proteção de longa duração pelos anestésicos, a despeito da importante proteção no curto prazo (Koerner e Brambrink, 2006). Resultados recentes indicam que os agentes voláteis, os barbitúricos e o propofol reduzem a injúria neuronal depois de um evento isquêmico moderado, porém esse efeito neuroprotetor não é aparente após um longo período pós-isquêmico (Koerner e Brambrink 2006).

Considerando que a patofisiologia da isquemia cerebral é complexa e, que um grande número de processos é iniciados com o insulto isquêmico; uma simples intervenção farmacológica, provavelmente, não resultaria em uma neuroproteção sustentada. Portanto, torna-se necessário a combinação de diferentes estratégias específicas para cada estágio de evolução da injúria isquêmica (Kawaguchi e cols 2005). A relevância clínica da neuroproteção pelos agentes anestésicos seria em obter mais uma ferramenta que reduza a morte neuronal após um evento isquêmico (neuroproteção multimodal).

1.8 Etomidato

O etomidato [*R*-1-(1-etilfenil)imidazol-5-etil ester] etil carboxílico é um anestésico não barbitúrico, intravenoso, com potente efeito sedativo e hipnótico, sem ação analgésica. É comumente usado na indução da anestesia geral e sedação. A injeção intravenosa de etomidato produz hipnose com início de ação rápido, geralmente dentro de 1 minuto. A duração da hipnose é de acordo com a dose, mas relativamente breve, normalmente de 3 a 5 minutos, a uma dose média de 0,3mg/kg (FDA). As formulações clínicas utilizam o enantiômero *S*+ devido a sua maior potência hipnótica. Seu índice terapêutico é alto em comparação a outros anestésicos, sendo considerado um anestésico seguro (Forman, 2011).

Os efeitos adversos mais comuns associados à administração de etomidato são: dor na injeção, movimentos mioclônicos dose-dependente (Kay, 1976 e 1977), náuseas e vômitos (Yelavich, 1980), que são mais frequentes que a administração de propofol. Porém, o efeito colateral mais preocupante é a supressão da adrenal, que pode levar ao óbito (Preziosi e cols, 1982). O etomidato suprime o aumento de aldosterona e cortisol que ocorre normalmente no pós-operatório, além de inibir a resposta da adrenal à corticotropina. A supressão da adrenal dura de 6-8 horas em uma dose única de indução (Fragen e cols, 1984) e por mais de 24 horas após a infusão de etomidato (Wanscher e cols, 1985).

A principal vantagem do etomidato em relação a outros anestésicos consiste no fato que esse fármaco possui poucos efeitos respiratórios e cardiovasculares, o que o torna desejável em pacientes com doenças preexistentes como a hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva ou com histórico de infarto do miocárdio (Smith e cols, 1999; Yueng e cols, 2002 e Turner e cols, 2005).

No sistema nervoso central, o etomidato produz supressão do eletroencefalograma (EEG), decorrente da redução do fluxo sanguíneo cerebral diminuindo, conseqüentemente, a taxa metabólica cerebral de consumo de oxigênio (Milde e cols, 1985) e glicose (Davis e cols, 1986). Essas propriedades do etomidato têm incitado estudos desse anestésico sobre a habilidade em proteger neurônios e glia do dano isquêmico. Em um modelo de isquemia incompleta do prosencéfalo, doses de etomidato que são capazes de causar supressão do EEG reduziram a injúria neuronal no hipocampo (Watson e cols, 1992). O efeito neuroprotetor do etomidato foi confirmado

em um estudo de comparação com outros dois anestésicos: tiopental e isoflurano. Nessa investigação verificou-se que o etomidato reduziu a injúria no hipocampo, enquanto que o tiopental teve maior ação no córtex (Sano e cols, 1993). Um dos possíveis mecanismos neuroprotetor do etomidato é devido à redução da liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (Patel e cols, 1995) e a dopamina (Koor e cols, 1994). Em um modelo de isquemia e reperfusão do músculo esquelético, o etomidato demonstrou ser eficaz na redução da lesão isquêmica, e o possível mecanismo seria a redução da lipoperoxidação (Ergün e cols, 2010). Por outro lado, alguns estudos que avaliaram o efeito do etomidato sobre a isquemia focal, demonstraram aumento do dano (Drummond e cols, 1995) ou não alterou significativamente a recuperação do tecido (Amadeu e cols, 1998), .

Em comparação a outros anestésicos, existem poucos estudos avaliando o efeito neuroprotetor do etomidato na isquemia cerebral. Em virtude disso, verifica-se a necessidade de maior investigação sobre o possível efeito neuroprotetor do etomidato e mecanismos de ação envolvidos na neuroproteção.

1.9 Propofol

O propofol (2,6-diisopropilfenol) é um agente intravenoso sedativo-hipnótico comumente usado na indução e manutenção da anestesia e, na sedação em terapia intensiva. Essa droga apresenta curta duração de ação possibilitando o uso em infusão contínua e com poucos efeitos colaterais (Glen 1980; Glen e Hunter 1984).

Os efeitos sedativo, hipnótico e amnésico são atribuídos à interação do propofol com o sítio alostérico do receptor GABA_A, potencializando as correntes evocadas por baixas concentrações de GABA, aumentando assim, a eficácia do agonista. Em concentrações maiores, esse agente é capaz de abrir diretamente o canal do receptor GABA permitindo a entrada de Cl⁻ na ausência de GABA (Concas e cols 1991, Orser e cols 1994). O propofol também está relacionado à inibição da liberação de glutamato através de mecanismos pré-sinápticos (Ratnakumari e Hemmings Jr 1997).

Além das vantagens anestésicas, o propofol possui inúmeros efeitos não anestésicos relatados. Já foi descrito que a anestesia intravenosa desse agente está associada com uma menor incidência de náuseas e vômitos pós-operatórios (Dandoy e cols 1990, Jost e cols 1997, McCollum e cols 1988) e, está associada à ação modulatória do propofol em receptores GABA_A. Além disso, já foram relatadas atividades

imunomodulatória (Hockey e cols; 2005), modulação da agregação de plaquetas (Aoki e cols 1998), atividade antioxidante (Mathy-Hartert e cols 2000; Aarts e cols 1995; Murphy e cols 1992), efeito ansiolítico em doses que não causam sedação (Kurt e cols 2003) e efeito neuroprotetor (Engelhard e cols 2004, Gelb e cols 2002).

Como outros anestésicos, o propofol possui propriedades que podem proteger o cérebro contra uma isquemia cerebral. Essas propriedades incluem a redução da taxa metabólica cerebral, do fluxo sanguíneo cerebral e pressão intracraniana (Murphy e cols 1992), potencialização da inibição mediada pelo influxo de Cl^- através dos receptores gabaérgicos (Ito e cols 1998) e, inibição dos receptores de glutamato (Zhan e cols 2001). O mecanismo neuroprotetor pode também ser correlacionado à redução dos níveis de glutamato extracelular decorrente da inibição da liberação de glutamato dependente de canais de Na^+ e do aumento da recaptação desse neurotransmissor (Sitar et al. 1999), bem como a atividade antioxidante com redução da peroxidação lipídica (Sagara et al. 1999; Wilson and Gelb 2002).

Em virtude disso, o propofol tem sido testado como agente neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral. Tanto resultados positivos (Sitar e cols, 1999; Peters e cols, 2001; Daskalopoulos e cols, 2001; Velly e cols 2003) como negativos (Qi e cols, 2002; Feiner e cols, 2005) foram obtidos de estudos *in vitro*. Velly e cols em 2003 mostraram a habilidade do propofol em proteger culturas celulares corticais 24 horas após a exposição a 90 minutos de insulto isquêmico, seguido de reoxigenação. Neste mesmo estudo foi relatado que esse anestésico é capaz de atenuar o aumento da concentração extracelular de glutamato e reduzir a recaptação desse neurotransmissor. Por outro lado, em culturas de fatias de hipocampo, o propofol não demonstrou um efeito prolongado na sobrevivência das células das regiões CA1 e CA3 após 3 dias do insulto isquêmico, apesar da redução da concentração de glutamato extracelular. Entretanto, neste mesmo modelo o propofol foi capaz de prolongar a sobrevivência das células do giro dentado (Feiner e cols 2005).

Da mesma forma, resultados conflitantes foram observados em estudos *in vivo*. Na maioria dos trabalhos demonstrando efeitos benéficos do propofol na isquemia cerebral, a avaliação do efeito desse medicamento foi realizada em períodos relativamente curtos após a isquemia (até 7 dias). De fato, foi demonstrado que a infusão de propofol diminui o tamanho do infarto três dias após o insulto induzido pela endotelina em modelo de isquemia cerebral (Bayona e cols, 2004). Entretanto, quando os animais foram avaliados três semanas após a isquemia, não foram observadas

diferenças histológicas entre o grupo controle e o grupo com propofol, embora se tenha observado uma melhora funcional no último grupo (Bayona e cols, 2004). Por outro lado, utilizando-se modelo de isquemia de hemisfério cerebral combinado com hipotensão hemorrágica, observou-se que o propofol reduziu o dano neuronal e melhorou a modulação da apoptose em comparação com o óxido nítrico e fentanil por até 28 dias, sugerindo efeito neuroprotetor de longo prazo (Engelhard e cols, 2004). A severidade da isquemia neste caso é considerada relativamente leve, justificando, assim o resultado favorável. Portanto, parece que, como observado com anestésicos inalatórios, o propofol pode ser neuroprotetor em longo prazo na presença de um insulto leve, mas a neuroproteção não é sustentada em insultos moderados a severos. Entretanto, ao retardar o desenvolvimento da injúria, o propofol poderia ser utilizado em associação com outras intervenções farmacológicas que atuam, especificamente, nas várias etapas de evolução da lesão isquêmica.

Muitos estudos que relatam o efeito neuroprotetor do propofol sugerem que a proteção é promovida pela redução da morte celular por excitotoxicidade, mas o exato mecanismo de ação ainda permanece incerto (Traul e cols 2008). Não se pode descartar a habilidade do propofol modular a morte celular por apoptose. Estudos recentes têm correlacionado o efeito neuroprotetor a propriedades antioxidantes e efeito anti-apoptótico (Adembri e cols 2006).

Portanto, conclui-se que as características e os mecanismos envolvidos na neuroproteção do propofol durante a isquemia cerebral ainda não estão bem definidos justificando a necessidade de mais estudos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ação neuroprotetora dos anestésicos intravenosos etomidato e propofol na isquemia cerebral em um modelo de isquemia cerebral *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito neuroprotetor do etomidato e propofol em fatias de hipocampo de ratos submetidos a insulto isquêmico *in vitro*, utilizando-se ensaios de viabilidade celular.
- Avaliar a ação do etomidato e propofol sobre a liberação de glutamato após o insulto isquêmico.
- Avaliar a ação do etomidato e propofol sobre os canais de cálcio e sódio sensíveis à voltagem.
- Avaliar a ação do etomidato e propofol nos subtipos –P/Q e –N de canais de cálcio sensíveis à voltagem transfectados isoladamente.
- Avaliar a ação do etomidato e propofol sobre a geração de espécies reativas de oxigênio após o insulto isquêmico.
- Avaliar a ação do etomidato e propofol sobre os danos oxidativos provocado pelo insulto isquêmico.
- Avaliar a ação do etomidato e propofol sobre o sistema de defesa antioxidante.
- Avaliar a atividade antioxidante da molécula de propofol *per si*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material

3.1.1 Drogas e Reagentes

NaCl (Merck), KCl (Merck), CaCl₂ (Merck), MgSO₄ (Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Vetec), KH₂PO₄ (Merck), C₆H₁₂O₆ (Merck), HEPES (Sigma-Aldrich), diclorofluoresceína-diacetato (Sigma), Etomidato 2mg/mL (Cimed), Peróxido de Hidrogênio (Sigma-Aldrich), Pirogalol (Synth), Propofol (2,6 Diisopropilfenol) (Sigma-Aldrich), Ethidium Homodimer-1 2 mM solution in 1:4 DMSO/H₂O (Invitrogen), FM2-AM (Invitrogen), SBFI-AM (Invitrogen), diclorofluoresceína (Sigma), glutamato (Sigma), GDH (Sigma).

3.1.2 Equipamentos

Banho Ultratermostático LICIT, Balança de precisão decimal Quimis BG 440, Câmara de perfusão do tipo Brandel SF-120, Centrífuga, Espectrofotômetro, Estufa de cultivo celular Sherlab, Centrifuga refrigerada Eppendorf 5810R, Fluorímetro RF 5301 PC Shimadzu, Guilhotina, Homogeneizador de tecidos, Leitor de placas Victor X4 PerkinElmer, Microscópio Axiovert Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME, Microscópio de luz invertida CK2 Olympus, Sonicador, Tissue Chopper, Modelo PZN, USA.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Animais

Foram usados ratos wistar machos adultos (180-200g), mantidos à temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) tratados sob ciclo 14/10h luz/noite, alimentação e água livre, fornecidos pelo CEBIO-ICB/UFMG. Para cada experimento, foi utilizado 1 (um) animal para a retirada dos hipocampos. Os experimentos realizados nesse estudo foram realizados de acordo com as regras para experimentação animal e com aprovação do comitê ético local.

3.2.2 Soluções

Foi utilizada a solução de líquido cérebro-espinhal artificial (LCEA) para perfusão das fatias de hipocampo: NaCl 127mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 2 mM, NaHCO₃ 26mM, KH₂PO₄ 1,2 mM e HEPES 26mM, adicionados 10 mM de glicose e constantemente aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂).

Para a indução do insulto isquêmico foi usada a solução de LCEA com acréscimo de 4 mM de glicose, constantemente aerada com mistura de N₂ (95%) e CO₂ (5%).

Para a homogeneização dos tecidos foi utilizado a solução de tampão TRIS-HCl: Tris-HCl 10 mM, H₂O qsp.

3.2.3 Preparo das fatias do hipocampo

Os ratos foram sacrificados por decapitação utilizando guilhotina. O cérebro foi removido rapidamente, os hipocampos dissecados e, colocados em solução de LCEA previamente resfriada a 4°C e aerada com mistura de oxigênio (95%) e dióxido de carbono (5%). Cada hipocampo foi seccionado em fatias de 400 µM no fatiador de tecidos.

3.2.4 Modelo de privação de glicose e oxigênio *in vitro*

O modelo de isquemia *in vitro* utilizado neste trabalho foi baseado na

metodologia descrita por Monette e cols (1998) com algumas adaptações. As fatias obtidas foram transferidas para a câmara de perfusão (Brandel) e acondicionadas em 12 mini-câmaras, banhadas com solução de LCEA com 10 mM de glicose aerada com mistura carbogênica. A velocidade da perfusão foi mantida em 0,5 mL por minuto e a temperatura em 36,5°C.

As fatias foram submetidas a esta condição por 90 minutos com a finalidade de recuperar o tecido do trauma mecânico decorrente da dissecação.

Após esta fase, uma parte das fatias do hipocampo foi submetida a um pré-tratamento durante 30 minutos com diversas condições que serão detalhadas posteriormente. Todas as drogas utilizadas, nesta etapa, foram diluídas no meio de incubação (LCEA). A parte restante das fatias (grupo controle de viabilidade celular e grupo isquemia) foi perfundida com meio de incubação aerado com mistura carbogênica sem as condições supracitadas.

Em seguida, iniciou-se o período de isquemia, no qual as câmaras que passaram pelo tratamento com as drogas em estudo e, a câmara que representou o insulto isquêmico foram submetidas a um período de 20 minutos de redução do fornecimento de glicose associado à privação de oxigênio, através da perfusão com LCEA contendo 4 mM de glicose borbulhado com 95%N₂/5%O₂. Somente o grupo controle da viabilidade celular não foi submetido ao insulto isquêmico permanecendo nas condições ideais de oxigenação e fornecimento de glicose durante todo o experimento.

A última etapa da perfusão foi denominada de período de reperfusão. Neste momento, todas as câmaras foram perfundidas com meio de incubação aerado com mistura carbogênica durante 4 horas de reperfusão antes da avaliação da viabilidade neuronal pela microscopia. Nestas condições as fatias de hipocampo permanecem viáveis por até 12 horas.

3.2.5 Marcação com a sonda etídeo homodímero

Para analisar a viabilidade celular das fatias, as mesmas foram coradas com 4,5 µL de etídeo homodímero-1 (2 mM) diluídos em 1,5 mL de meio de incubação aerado previamente com mistura carbogênica. Cada grupo avaliado foi corado separadamente, mantendo-os protegidos da luz. As fatias foram mantidas nessa solução de marcação por 30 minutos. Após isso, elas foram lavadas com 2 mL de meio de incubação aerado por 15 minutos. Depois da lavagem, as fatias foram levadas para microscópio Axiovert

Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME.

3.2.6 Obtenção de imagens no Microscópio de Fluorescência

No microscópio foram adquiridas imagens de secções ópticas consecutivas ao longo do eixo Z, com espessura de 10 μm , com comprimento de onda de excitação de 568 nm para o Etídeo Homodímero e emissão em 598/40. As imagens foram adquiridas com saturação da fluorescência, com a objetiva de 20 vezes. Foi utilizada lâmpada de mercúrio HBO. Estes parâmetros foram mantidos em todos os experimentos.

3.2.7 Quantificação das imagens obtidas no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME

Para a realização da análise quantitativa, foi utilizado o programa de processamento de imagens ImageJ. As imagens foram submetidas a um processamento por meio de um filtro de ajuste de pixels pela mediana, com o intuito de reduzir possíveis interferências de ruído, e foram obtidos os histogramas das respectivas imagens. Com o histograma da imagem foi determinado o valor do limiar basal da fluorescência. Após esse processamento da imagem, a região CA1 foi selecionada com uma área pré-determinada e, assim, foi realizada a quantificação do número de células mortas presentes.

3.2.8 Determinação da viabilidade celular através da dosagem de lactato desidrogenase

Após o insulto isquêmico, o meio de incubação contendo fatias de hipocampo foi submetido à centrifugação (1000 g, 1 min, 4°C) e o sobrenadante foi recolhido para ensaio de LDH (lactato desidrogenase). O pellet foi armazenado a -20°C para posterior dosagem de proteínas, como descrito por Bradford (1976). Para quantificar a atividade da enzima LDH no sobrenadante, foi realizado o ensaio que catalisa a interconversão de piruvato e lactato, na presença de NADH. A redução da absorbância a 340 nm, como consequência da oxidação de NADH, é proporcional à atividade de LDH na amostra. Cada experiência consistiu em pelo menos duas réplicas por condição. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.9 Ensaio de dosagem de glutamato

O sobrenadante coletado para dosagem da lactato desidrogenase também foi utilizado para a dosagem de glutamato. Para dosar o neurotransmissor, foi realizado o ensaio enzimático, onde o glutamato que é liberado pelas fatias do hipocampo sofre oxidação pela enzima GDH. O NADP⁺ é o aceptor do elétron desprendido que ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360 nm, emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro. Dessa maneira pode-se quantificar o neurotransmissor excitatório liberado (Nicholls e cols., 1987; Romano-Silva e cols., 1993).

A adição dos reagentes para o registro de dados no espectrofluorímetro ocorreu na seguinte ordem:

Início	0 s
NADP 1 mM	90 s
GDH 1 U/ μ L	150 s
Amostra 50 μ L	300 s
Padrão de Glutamato 1 mM	800 s
Término do registro	900 s

Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.10 Preparo do sinpatossoma

Os animais foram sacrificados por decaptação com o uso de guilhotina. Os hipocampus dissecados foram transferidos para um tubo Potter -Elvehjen contendo 5 mL de solução de sacarose 0,32 M. O tecido foi, então, homogeneizado com pistilo de teflon acoplado ao homogeneizador Glass Col modelo 099C fazendo-se 14 movimentos de homogeneização. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 2.700 g a 4°C por 3 min. O sobrenadante desta primeira centrifugação foi coletado e aplicado em um tubo de centrifugação com 5 mL de solução de sacarose 0,8 M. O gradiente formado pelas soluções de sacarose em diferentes concentrações foi centrifugado a 7.740 g, 4°C por 30 min para a precipitação dos sinaptossomas. O precipitado (fração sinaptossomal

purificada) foi ressuspenso e aliqotado para realização dos ensaios de captação de Ca^{2+} ou Na^+ . Em todos os experimentos, amostras de aproximadamente 50 μL de sinaptossomas foram reservadas e congeladas a -20°C para posterior dosagem de proteínas segundo método de Bradford.

3.2.11 Ensaio para avaliar cálcio interno sinaptossomal com a sonda FURA-2-AM

Os sinaptossomas foram diluídos e aliqotados (200 μL), sendo que Fura2-AM (solução estoque a 1mM em DMSO) foi adicionado à suspensão sinaptossomal em uma concentração final de 5 μM , incubada a 37°C por 30 min e em seguida diluída para 1200 μL , seguida por mais 30 min de incubação. (Romano-Silva e cols., 1993)

Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 5.300 g durante 30 segundos para a retirada do excesso de FURA2-AM não incorporado aos sinaptossomas. O precipitado foi ressuspenso em 2mL de KRH sem Ca^{2+} e a preparação transferida para a cubeta fluorimétrica plástica descartável e levada ao espectrofluorímetro com agitação e temperatura controlada. Em seguida, foram adicionadas as seguintes substâncias nos respectivos intervalos de tempo:

Propofol ou Etomidato	0s
CaCl_2 1 mM	30s
Estímulo: KCl	360s
SDS (10%)	510s
EGTA 4 mM	570s
Término do registro	640s

A emissão de fluorescência foi detectada a 510 nm usando como faixa de excitação média 340/380 nm sob temperatura controlada a 37°C e sob constante agitação. A calibração do sinal de fluorescência era feita pela adição de SDS 10% para fluorescência máxima e EGTA 10 mM para fluorescência mínima. A concentração em nanomolar de cálcio foi calculada por meio da fórmula: $C = Kd * [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] * Sf2 / Sb2$ (Grynkiewicz e cols., 1985).

3.2.12 Ensaio para avaliar o sódio interno sinaptossomal com a sonda SBFI 10 AM

Os sinaptossomas obtidos foram ressuspensos em KRH-colina sem cálcio (para se manter o equilíbrio iônico NaCl foi substituído por cloreto de colina em concentração equimolar) e divididos em seis tubos com 200µL cada um. Estes pontos foram incubados a 35°C com 10µM SBFI-AM (sodium-binding benzofuran isophthalate) juntamente com Pluronic® (concentração final 1%) a 1:1(v/v). Após 30 minutos de incubação os sinaptossomas foram diluídos para 1,5mL de KRH-colina e continuaram em incubação por mais 30 min. Os sinaptossomas foram centrifugados a 5.300 g por 15 s e ressuspensos em 2 mL de KRH sem cálcio em cubeta fluorimétrica plástica descartável (Massensini e cols., 1998). O ponto era levado ao fluorímetro com agitação e temperatura 37°C constantes. Em cada cubeta foram adicionados as seguintes substâncias nos respectivos intervalos de tempo:

Propofol ou Etomidato	0s
CaCl ₂ 1 mM	30s
Estímulo: Veratridina 4mM	360s
Gramicidina	510s
Término do registro	630s

Para a calibração da fluorescência do sinal foi adicionado Gramicidina D, um ionóforo de sódio, com o objetivo de atingir o equilíbrio entre a concentração do sódio interno e externo e consequente saturação do SBFI-AM.

3.2.13 Transfecção com os subtipos de canais de cálcio –P/Q e –N

Células HEK293 (células embrionárias de rim humano) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro – Cell Bank. Essas células foram mantidas, até a realização dos experimentos, a -140°C em nitrogênio líquido. Após descongelamento as células foram mantidas em cultura (37°C, 5% CO₂ e 80% de umidade) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina estreptomicina até uma confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, células foram removidas mecanicamente da garrafa e plaqueadas (50-70% de confluência) em lamínulas de 22

mm quebradas ao meio, previamente tratadas com poli-lisina. Essas células foram mantidas em recuperação (37°C, 5% CO₂ e 80% de umidade) por 16 hs.

A transfecção dos plasmídeos contendo os insertos com os canais de cálcio foi realizada utilizando Lipofectamina (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. As células foram transfectadas com uma quantidade variável de DNA, dependente da construção utilizada, seguindo-se a relação 2.5 µl de Lipofectamina para cada 1 µg de DNA. As placas foram incubadas com os lipossomas por quatro horas a 37°C em meio sem soro. Após esse período, o meio de transfecção foi substituído por meio de cultura. Depois de 24 h as células foram utilizadas para experimentos.

3.2.14 Ensaio para avaliar o cálcio interno em células transfectadas com os subtipos de canais de cálcio.

As células transfectadas foram lavadas com KRH sem cálcio para a retirada do meio de cultura, e incubadas com 1 µL de Fura-2 AM em 1 mL de KRH sem cálcio, por 20 minutos, na estufa, protegida da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas com KRH sem cálcio para a retirada do excesso de sonda que não foi internalizada. A lamínula contendo as células marcadas foi acoplada a um adaptador de cubeta e levada ao fluorímetro com agitação e temperatura 37°C constantes. Em cada cubeta foram adicionados as seguintes substâncias nos respectivos intervalos de tempo:

CaCl ₂ 1 mM	0s
KCl	60s
Troca de KRH	120s
Etomidato ou Propofol	240s
KCl	360s
SDS 10%	420s
EGTA 4 mM	480s
Fim do registro	540s

Os parâmetros de captação e análise de fluorescência já foram descritos na seção 3.2.11.

3.2.15 Homogeneização das fatias de hipocampo

Após o insulto isquêmico, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas no sonicador (3ciclos de 4s cada) com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 na proporção de 1:10. O homogenato foi centrifugado a 1.000 g, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C para análises posteriores. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford.

3.2.16 Ensaio para quantificar as espécies reativas de oxigênio

Os níveis de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) foram determinados como um indicador da produção de peróxido dos componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCF-DA, e a sua oxidação subsequente por espécies reativas de oxigênio, gerando um composto altamente fluorescente (Halliwell e cols, 2007). Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante de hipocampo foi adicionada a 80 µL DCF-DA 125 µM. A placa foi incubada no escuro durante 1 h, 37°C até o momento da mensuração da fluorescência (488/525 nm) no aparelho Victor X4 (Perkin-Elmer). Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.17 Ensaio para quantificar a atividade da superóxido dismutase

O ensaio para medir a atividade da SOD (superóxido dismutase) foi realizado seguindo a metodologia proposta por Marklund e Marklund, 1974. Em soluções aquosa, o pirogalol possui uma alta taxa de autooxidação, formando um composto de cor amarela que pode ser quantificado a 420 nm. A SOD é capaz de inibir a autooxidação do pirogalol, e essa propriedade é usada para definir a atividade dessa enzima. A oxidação do pirogalol foi medida espectrofotometricamente a 420 nm durante 5 minutos, em intervalos de 30 segundos. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.18 Ensaio para quantificar a atividade da catalase

A dosagem da atividade da CAT (catalase) foi realizada de acordo com o método proposto por Aebi, 1984. A análise cinética foi iniciada após a adição do H_2O_2 , e a taxa de decomposição de H_2O_2 foi medida espectrofotometricamente a 240 nm durante 150 segundos, em intervalos de 15 segundos. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.19 Ensaio para quantificar a lipoperoxidação

O ensaio para avaliar a lipoperoxidação foi realizado de acordo com a metodologia descrita Ohkawa e cols, 1979. A lipoperoxidação foi determinada pela quantificação do conteúdo de malonaldeído presente no sobrenadante do homogenato, a por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico em altas temperaturas. O conteúdo de MDA foi medido no comprimento de onda de 532 nm. A leitura espectrofotométrica foi realizada após o esfriamento das amostras. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.20 Ensaio para quantificar o conteúdo de GSH na célula

O conteúdo de GSH foi determinado pelo kit Bioxytech GSH 200 da marca OxisResearch. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do kit.

3.2.21 Ensaio para quantificar a atividade da glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada de acordo com Pagli e Valentine (1967). A conversão do NADPH a NADP foi medida espectrofotometricamente por absorção a 340 nm por 5 minutos. A unidade enzimática foi determinada pela oxidação de 1 mol de NADPH por minuto e foi calculada baseado na absorção do NADPH em 340 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.22 Ensaio para quantificar a atividade da glutathiona redutase

A atividade da glutathiona redutase foi determinada de acordo com. A unidade enzimática foi determinada pela oxidação de 1 mol de NADPH por minuto e foi calculada baseado na absorção do NADPH em 340 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.23 Ensaio para quantificar a atividade da glutathiona S-transferase

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi medida de acordo com o método descrito por Habig e cols (1974). Iniciou-se imediatamente a leitura no espectrofotômetro a 340 nm por 2 minutos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o coeficiente de extinção do CDNB. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.2.24 Ensaio para avaliar a atividade antioxidante da molécula de propofol

A atividade antioxidante da molécula de propofol foi mensurada de acordo com o método descrito por Willians e cols (1995). Na sua forma de radical, o DPPH (roxo), possui uma banda de absorção em 517nm, que desaparece após a sua redução a um composto não radical (amarelo). Então quanto menor a absorção em 517 nm, maior a atividade escaneadora de radicais livres da molécula avaliada. A reação foi protegida do escuro e mantida à temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 517nm. Os resultados foram expressos em % do controle do DPPH.

3.2.25 Análise estatística dos dados

Os experimentos foram realizados em dias independentes e repetidos no mínimo quatro vezes. Todos os dados coletados foram analisados utilizando o programa Prism 5 for Windows (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA). A significância estatística dos dados foi avaliada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas com $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito neuroprotetor dos anestésicos Etomidato e Propofol na isquemia cerebral *in vitro*

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular através da quantificação por microscopia de fluorescência

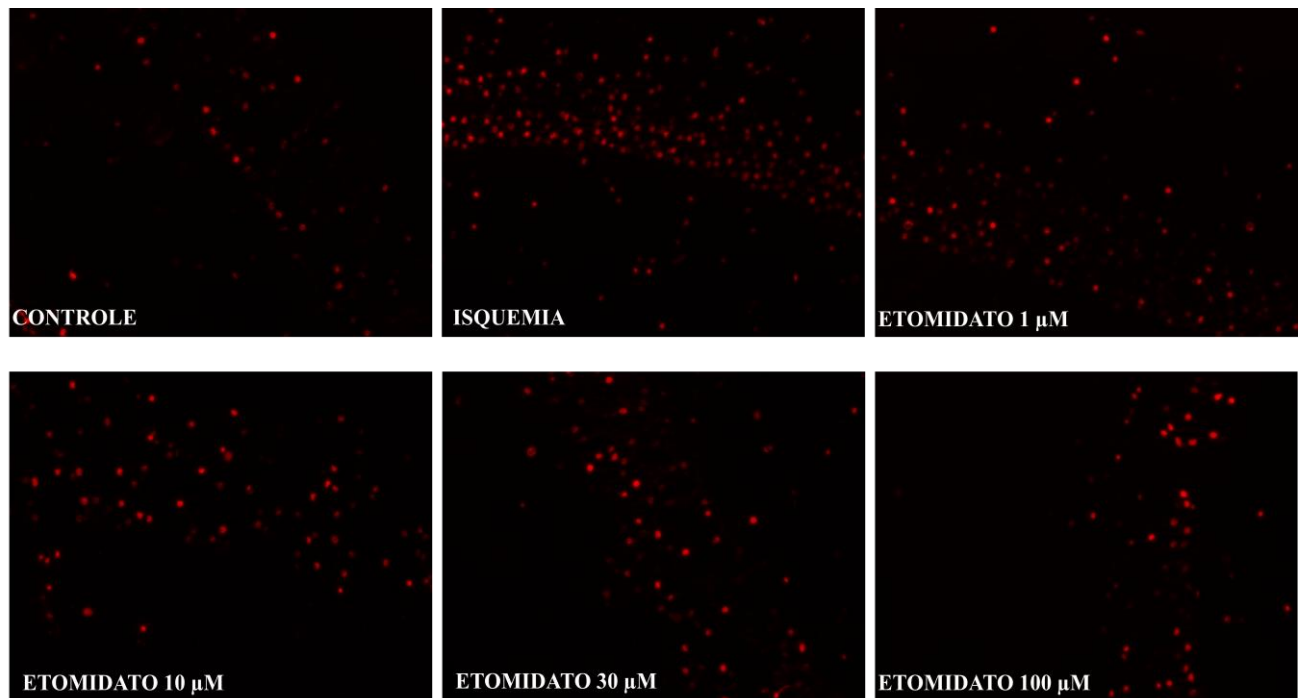
As fatias de hipocampo de ratos foram perfundidas durante 1h30min com solução de LCEA contendo 10 mM de glicose e aerada com mistura carbogênica (fase de recuperação). Logo após a recuperação, essas fatias de hipocampo foram pré-tratadas, durante 30 minutos, com etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM e propofol nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM (dado do mestrado) e submetidas a 20 minutos de insulto isquêmico (LCEA 4 mM de glicose, aerada com N_2/CO_2) seguidas de 4 horas de reperfusão (LCEA 10 mM de glicose, aerada com O_2/CO_2).

Em todas as doses testadas o etomidato apresentou neuroproteção (Figura 8). O IC_{50} (calculado da concentração efetiva capaz de reduzir em 50% a morte celular) foi de 25,22 μM . Enquanto que a inibição máxima foi de 50,44 μM do anestésico. Observa-se que o etomidato na concentração de 1 μM foi capaz de reduzir a morte de células em $24,20 \pm 1,56\%$, valor muito próximo da neuroproteção obtida com a concentração de 10 μM , $22,7 \pm 1,03\%$, não havendo diferença estatística entre os grupos. Nas concentrações de 30 μM e 100 μM houve uma redução de $31,55 \pm 1,07\%$ e $33,49 \pm 4,43\%$, respectivamente, no número de células mortas comparado ao grupo que foi submetido ao insulto isquêmico (Figura 8B), não apresentando diferença significativa entre si.

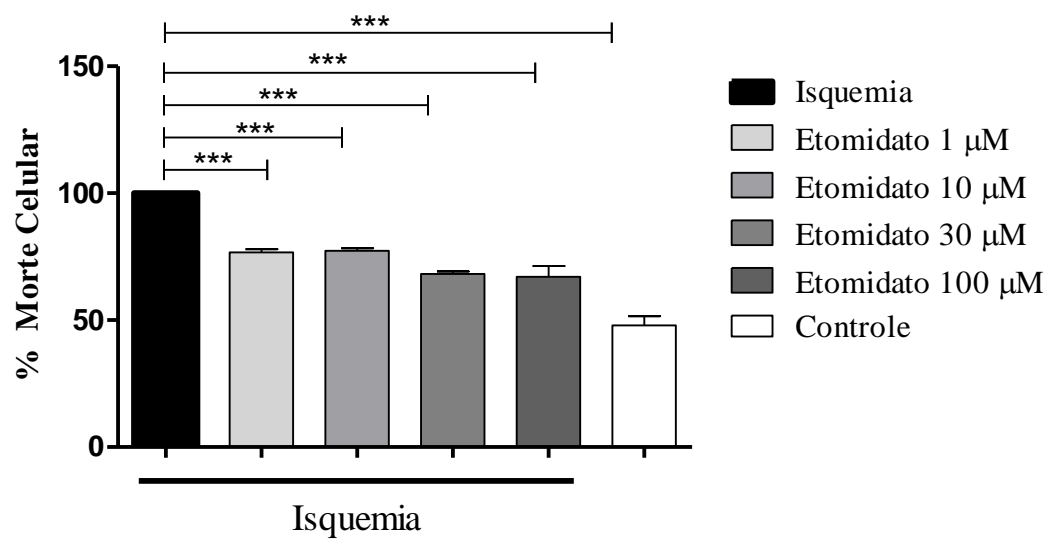
Da mesma forma, o propofol demonstrou neuroproteção nas doses avaliadas. O IC_{50} (calculado da concentração efetiva capaz de reduzir em 50% a morte celular) foi de 31,59 μM . Enquanto que a inibição máxima foi de 63,18 μM . A figura 8D representa a curva dose-resposta do propofol, onde nota-se que as concentrações de 1 e 10 μM apresentaram valores semelhantes de neuroproteção: $23,25 \pm 2,49\%$ e $23,37 \pm 3,02\%$, respectivamente. Nas concentrações de 30 μM e 100 μM houve uma redução, de $32,70 \pm 1,64\%$ e $47,02 \pm 2,41\%$, respectivamente, no número de células mortas comparado ao grupo que foi submetido ao insulto isquêmico, apresentando diferença estatística. É relevante ressaltar que a concentração de 100 μM de propofol ($52,98 \pm 2,414$) reduziu a morte celular ao mesmo nível observado no grupo controle ($56,72 \pm 2,90$).

Portanto, é possível afirmar que nas doses testadas, tanto o etomidato quanto o propofol, foram capazes de diminuir a morte neuronal usando o ensaio de microscopia de fluorescência para quantificar a morte celular.

A)

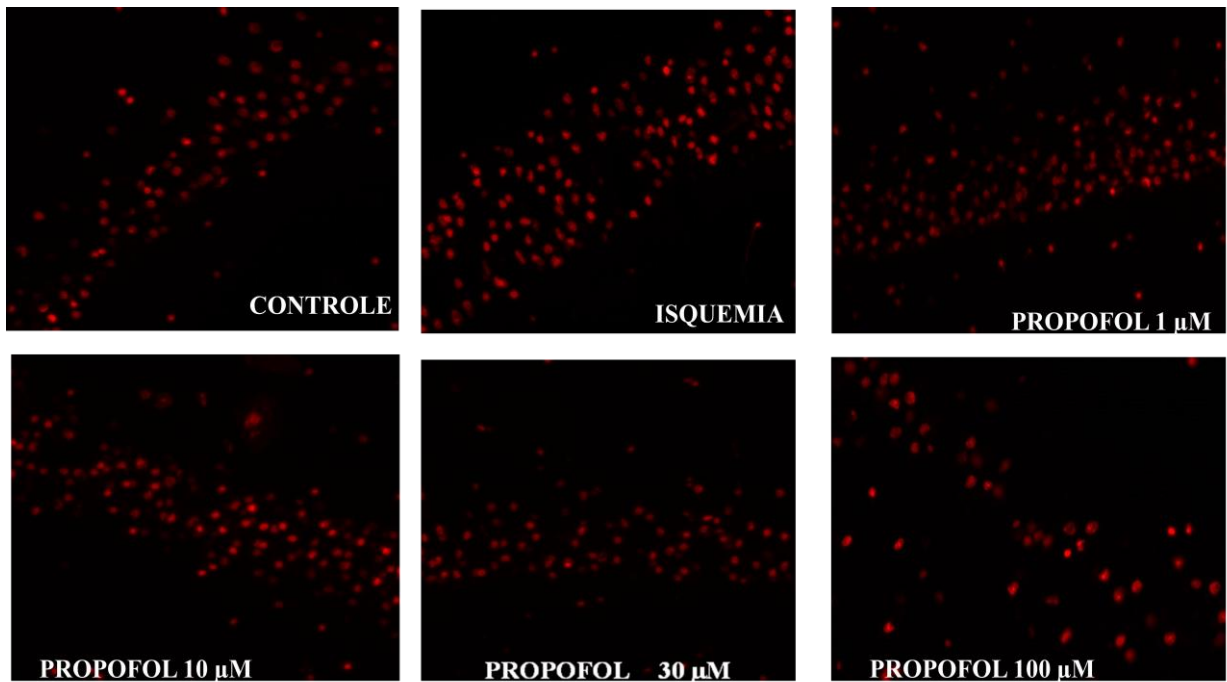


B)



*** p < 0,001

C)



D)

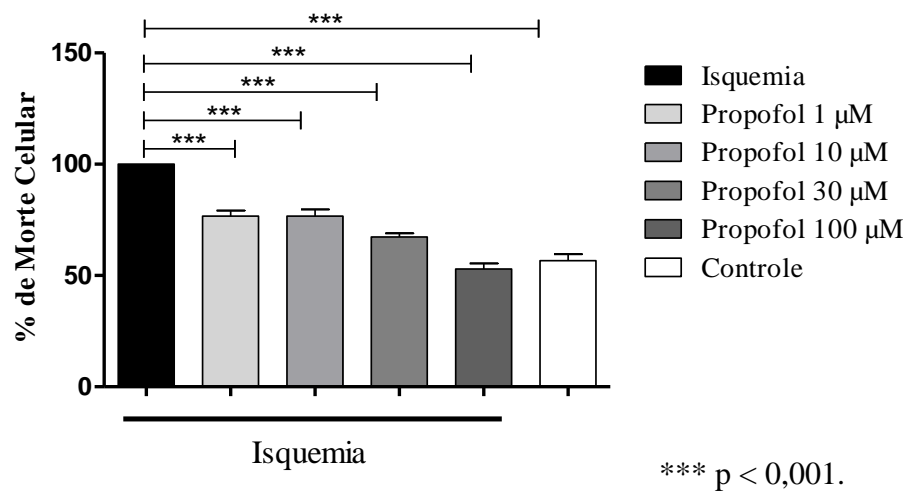


Figura 8: Efeito neuroprotetor do Etomidato e Propofol em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperfusão. Logo após, foram coradas com o marcador etídeo homodímero para a quantificação da morte celular através da análise microscópica da fluorescência da região CA1. (A) Imagens representativas das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM. (B) Curva resposta das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM (C) Imagens representativas das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM. (D) Curva resposta das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM. Dados normalizados em relação ao grupo isquemia.

4.1.2 Avaliação da viabilidade celular através da dosagem da atividade da lactato desidrogenase liberada.

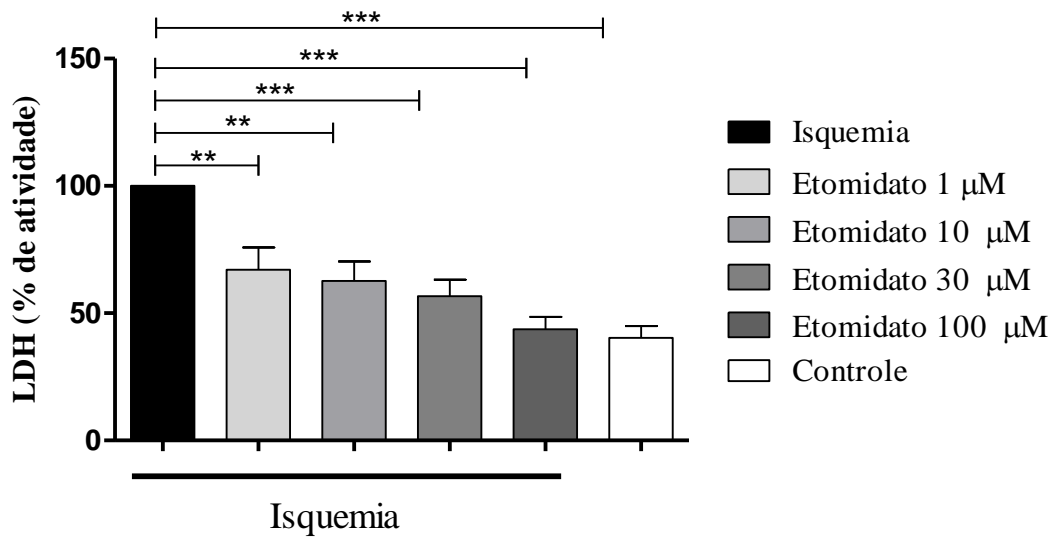
O ensaio bioquímico da dosagem de LDH liberada é amplamente usado para estudos de morte celular. A liberação dessa enzima é um marcador biológico de dano da membrana e morte necrótica (Huang e cols, 2012). Baseado nestas características, esse teste foi escolhido para confirmar a morte celular observada no ensaio de microscopia de fluorescência.

As fatias de hipocampo de ratos foram perfundidas durante 1h30min com solução de LCEA contendo 10 mM de glicose e aerada com mistura carbogênica (fase de recuperação). Logo após a recuperação, essas fatias de hipocampo foram pré-tratadas, durante 30 minutos, com etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM e propofol nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM (dado do mestrado) e submetidas a 20 minutos de insulto isquêmico (LCEA 4 mM de glicose, aerada com N_2/CO_2). Logo após o insulto isquêmico, o sobrenadante foi coletado, onde foi realizada a dosagem de LDH liberada. Essa dosagem também foi realizada 2 horas após o insulto isquêmico, apresentando o mesmo padrão de liberação (dados não mostrados).

Na figura 9 A observa-se que os tratamentos com etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM resultaram nas seguintes reduções da atividade de LDH: $32,91 \pm 8,74$; $37,31 \pm 7,64$; $43,47 \pm 6,24$ e $56,30 \pm 4,88$; com diferença significativa em relação ao grupo isquemiado (100,00). Da mesma forma, os tratamentos com o propofol nas concentrações 1, 10, 30 e 100 μM apresentaram as reduções da atividade de LDH: $30,42 \pm 3,85$; $45,17 \pm 11,61$; $53,72 \pm 9,14$ e $53,38 \pm 8,00$; com diferença significativa em relação ao grupo isquemiado (100,00) – Figura 9B.

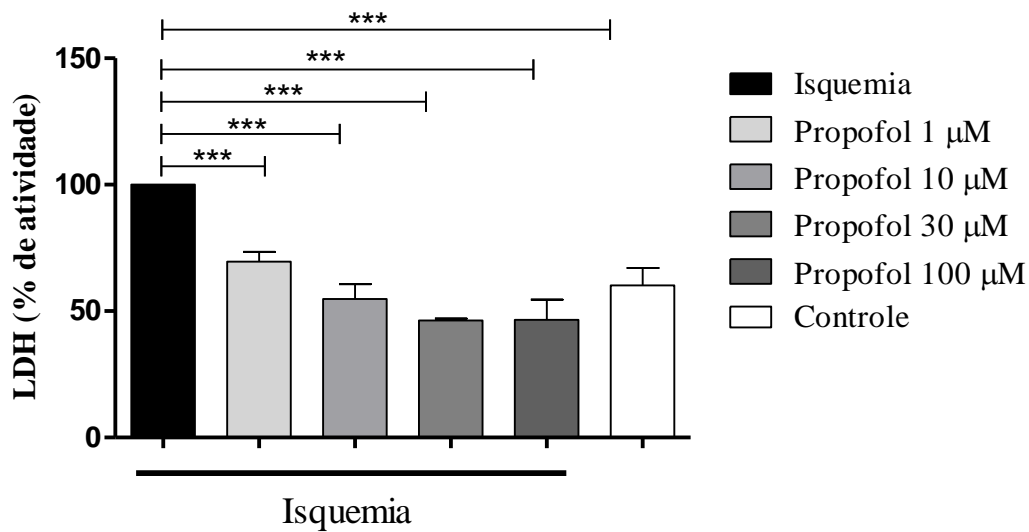
Portanto, a redução no dano celular para os grupos tratados com diferentes concentrações de etomidato e propofol, medida através da atividade de LDH liberada, foi semelhante ao resultado de morte celular obtido anteriormente, não havendo diferença significativa entre as duas técnicas de quantificação de viabilidade celular. Com isso, confirma-se que tanto o etomidato quanto o propofol são capazes de neuroproteger o tecido submetido à isquemia.

A)



** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

B)



*** $p < 0,001$

Figura 9: Efeito neuroprotetor do Propofol em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas através da dosagem de lactato desidrogenase liberada. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos. A dosagem de LDH liberada foi feita no sobrenadante coletado, logo após o insulto. **(A)** Curva dose-resposta das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM . ($p < 0,0001$) **(B)** Curva resposta das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μM ($p < 0,001$). Dados normalizados em relação ao grupo isquemia.

4.2 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol na liberação de glutamato na isquemia cerebral *in vitro*

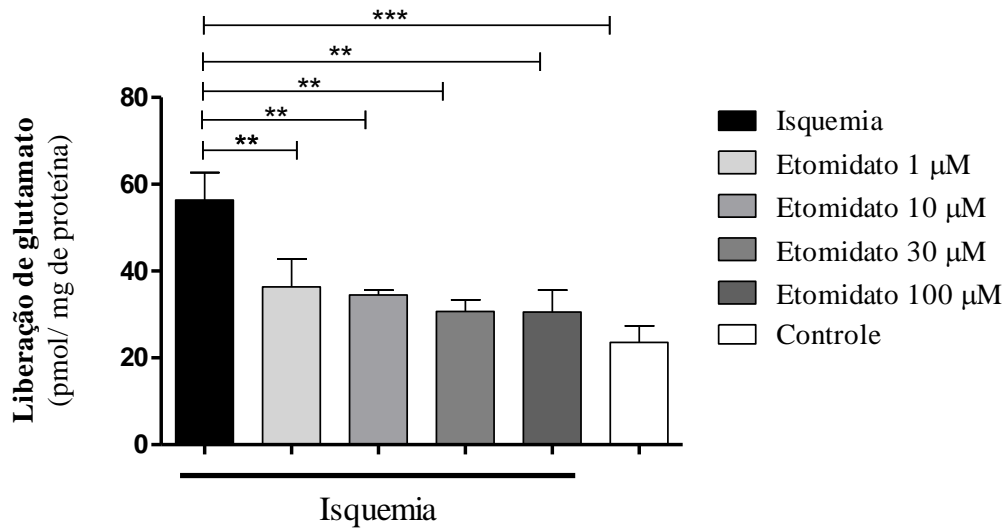
Na isquemia cerebral, a liberação excessiva de glutamato é um dos eventos patológicos que levam ao dano celular. Existem relatos, que tanto o propofol (Ratnakumari e Hemmings Jr 1997), quanto o etomidato (Patel e cols, 1995), reduzem a liberação de glutamato. Sendo assim, foi avaliado o efeito desses anestésicos na liberação de glutamato após o insulto isquêmico. O mesmo sobrenadante que foi coletado no experimento anterior, foi utilizado para ser realizada a dosagem de glutamato.

Quando se compara os grupos tratados com etomidato em relação ao grupo isquemiado, observa-se que todas as doses avaliadas foram capazes de reduzir o glutamato no sobrenadante coletado logo após o insulto isquêmico. Os resultados deste ensaio foram: isquemia $56,38 \pm 6,34$; etomidato $1 \mu\text{M}$ $36,34 \pm 6,45$; etomidato $10 \mu\text{M}$ $34,50 \pm 1,13$; etomidato $30 \mu\text{M}$ $30,67 \pm 2,70$; etomidato $100 \mu\text{M}$ $30,60 \pm 5,00$ e controle $23,58 \pm 3,78$. Não há diferença estatística entre os grupos tratados e o controle (Figura 10A).

Nos grupos tratados com propofol também houve redução do glutamato liberado. Os resultados deste ensaio foram: isquemia $258,40 \pm 43,80$; propofol $1 \mu\text{M}$ $193,60 \pm 22,36$; propofol $10 \mu\text{M}$ $178,80 \pm 22,97$; propofol $30 \mu\text{M}$ $129,90 \pm 26,99$; propofol $100 \mu\text{M}$ $105,1 \pm 18,24$ e controle $76,45 \pm 1,96$ (Figura 10B). Somente os grupos tratados com 30 e 100 μM de propofol apresentaram reduções estatisticamente significantes em relação ao grupo isquemiado.

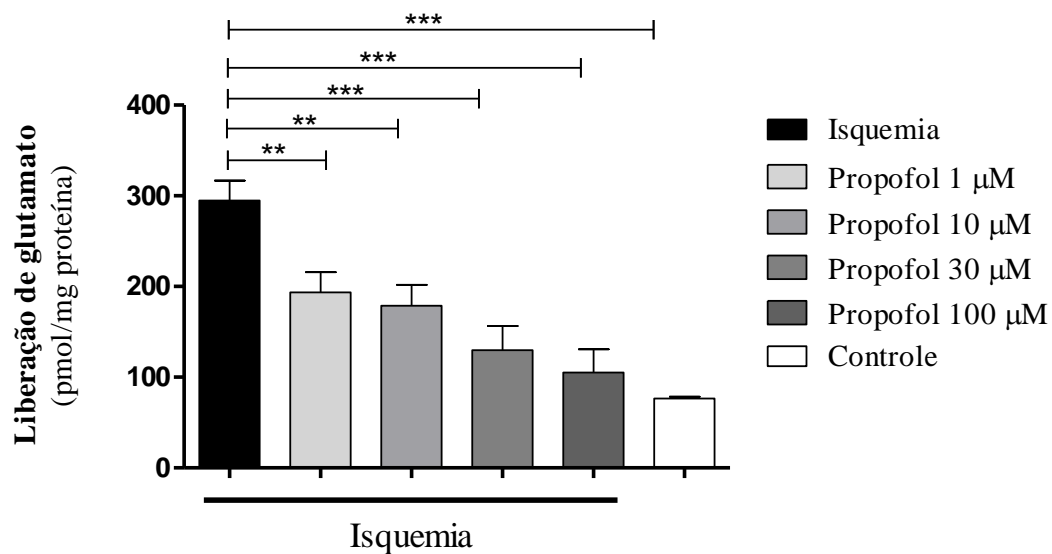
Assim, verifica-se que em todas as concentrações testadas ambos anestésicos foram capazes de diminuir a quantidade de glutamato no sobrenadante após o insulto isquêmico.

A)



** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

B)



** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Figura 10: Efeito do etomidato e propofol sobre a liberação de glutamato em fatias de hipocampo isquemiadas. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos. A dosagem de glutamato liberado foi feita no sobrenadante coletado, logo após o insulto. (A) Curva dose-resposta das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 µM. (B) Curva resposta das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 µM.

4.3 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o influxo de sódio em terminais sinápticos isolados

Os canais de sódio sensíveis à voltagem (CSSV) são responsáveis pelo início e propagação do potencial de ação (Catteral, 2010). Após a despolarização inicial promovida pelos CSSV, ocorre a abertura de canais para cálcio regulados por voltagem, com consequente liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.

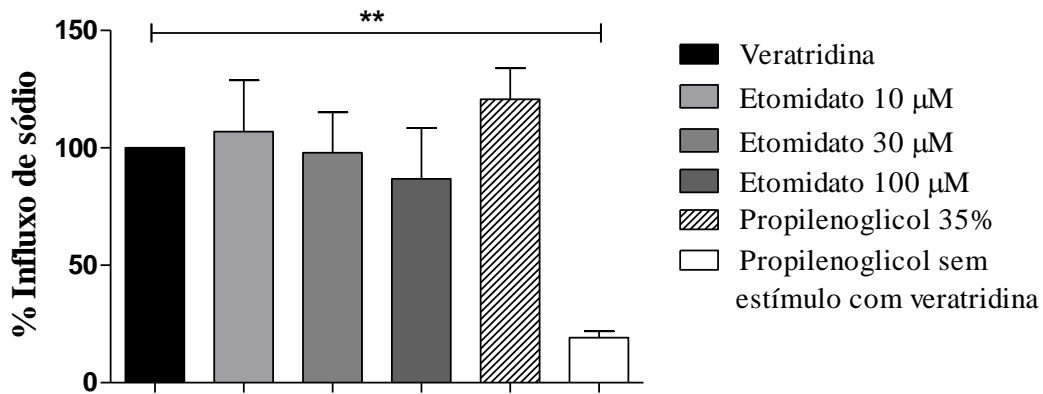
No experimento anterior observou-se que houve uma redução da liberação de glutamato tanto pelo etomidato, quanto pelo propofol. Com isso, foi avaliada a ação desses anestésicos sobre a despolarização inicial promovida pelo CSSV.

Os sinaptosomas foram incubados durante 60 min a 35°C com a sonda SBFI-AM em KRH modificado. Durante a leitura de fluorescência no espectrofluorímetro a suspensão sinaptosomal foi incubada com etomidato e propofol 10 µM, 30 µM, 100 µM e propilenoglicol.

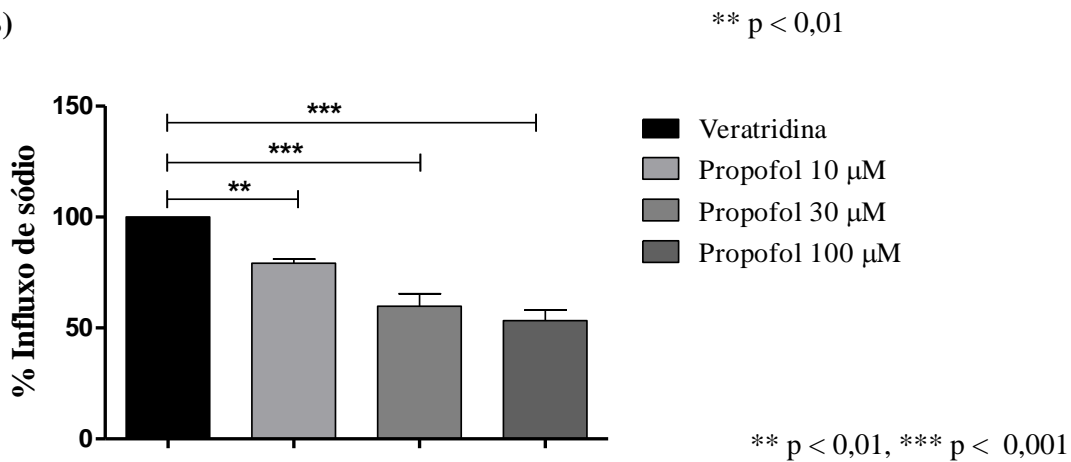
A figura 11A demonstra que o etomidato nas concentrações de 10 µM ($106,90 \pm 21,92$), 30 µM ($97,98 \pm 17,21$), 100 µM ($86,86 \pm 21,59$) não alteraram o influxo de sódio em comparação ao estímulo de veratridina. Certifica-se que o propilenoglicol, diluente do etomidato, não foi capaz de influenciar o influxo de sódio na presença ($120,7 \pm 13,26$) ou ausência do estímulo com veratridina ($19,25 \pm 2,68$). Com esse resultado verifica-se que o etomidato não influi no influxo de sódio.

Na figura 11B observa-se que o propofol nas concentrações de 10 µM ($79,20 \pm 1,90$), 30 µM ($59,76 \pm 5,67$), 100 µM ($53,37 \pm 4,74$) reduziram o influxo de sódio e quando comparados ao estímulo de veratridina (100,00). Em virtude disso, decidiu-se avaliar se propofol age CSSV sensíveis à tetrotoxina, realizando o experimento de efeito aditivo entre o anestésico e a toxina. Na figura 5C mostra que não houve diferença estatística entre o grupo tratado com propofol e TTX ($65,1 \pm 5,67$) em relação aos grupos tratados com propofol 30 µM ($59,76 \pm 5,67$) e TTX ($49,38 \pm 7,40$), isoladamente, indicando que não houve efeito de adição entre o propofol e a TTX.

A)



B)



C)

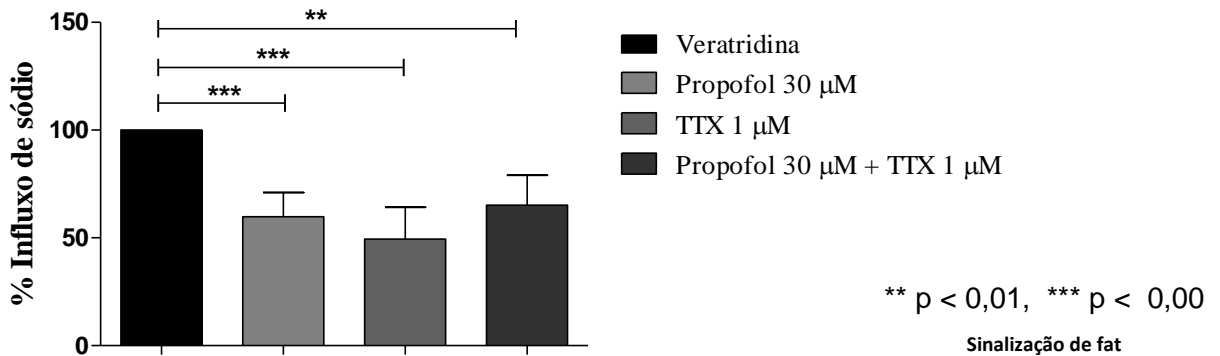


Figura 11: Efeito do etomidato e propofol sobre o influxo de sódio em terminais sinápticos isolados. Os sinaptosomas foram tratados com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, estimulados com Veratridina 4 µM. O influxo de sódio foi determinado pela porcentagem do íon que foi marcado com a sonda intracelular SBFI-AM. **(A)** Curva dose-resposta das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 10, 30, 100 µM e propilenoglicol. **(B)** Curva resposta das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 10, 30 e 100 µM. **(C)** Efeito aditivo entre o propofol e a tetrodotoxina. Dados normalizados em relação ao estímulo de Veratridina.

4.4 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o influxo de cálcio em terminais sinápticos isolados

O influxo desse íon através dos canais operados por voltagem presentes na membrana estão envolvidos no processo de liberação de neurotransmissores (Katz, 1969). Como foi observada a redução da liberação do neurotransmissor glutamato, optou-se por avaliar a ação do etomidato e propofol sobre o influxo de cálcio em terminais sinápticos isolados.

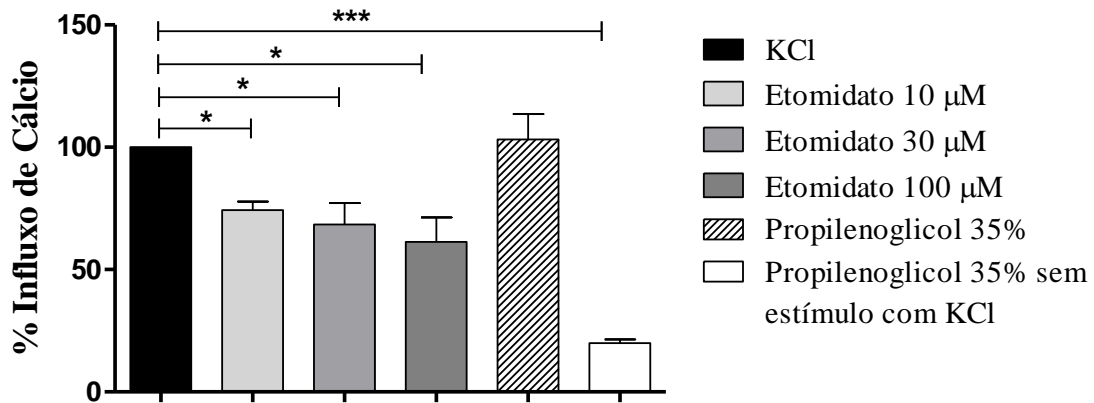
Os sinaptosomas foram incubados durante 60 min a 35°C com a sonda FURA-AM em KRH. Durante a leitura de fluorescência no espectrofluorímetro a suspensão sinaptosomal foi incubada com etomidato e propofol 10 µM, 30 µM, 100 µM e propilenoglicol.

Na figura 12A, observa-se que o etomidato foi capaz de reduzir o influxo de cálcio nas concentrações de 10 ($74,36 \pm 3,51$), 30 ($68,46 \pm 8,74$) e 100 µM ($61,31 \pm 9,98$) em relação ao estímulo com KCl (100,00). Já o propilenoglicol 35%, diluente do etomidato, não alterou o influxo de cálcio quando estimulado com KCl ($103,14 \pm 10,17$), não apresentando diferença significativa quando comparado ao controle positivo (KCl). Na ausência de estímulo, o propilenoglicol ($19,89 \pm 1,59$) não levou à alteração significativa do influxo de cálcio em relação ao basal (dado não mostrado), demonstrando que o diluente do etomidato não interfere no influxo de cálcio.

Na figura 12B, verifica-se que o propofol também foi capaz de reduzir o influxo de cálcio nas concentrações de 10 ($80,79 \pm 5,51$), 30 ($76,95 \pm 5,76$) e 100 µM ($48,59 \pm 7,23$) em relação ao estímulo com KCl (100,00), em menor proporção que o etomidato.

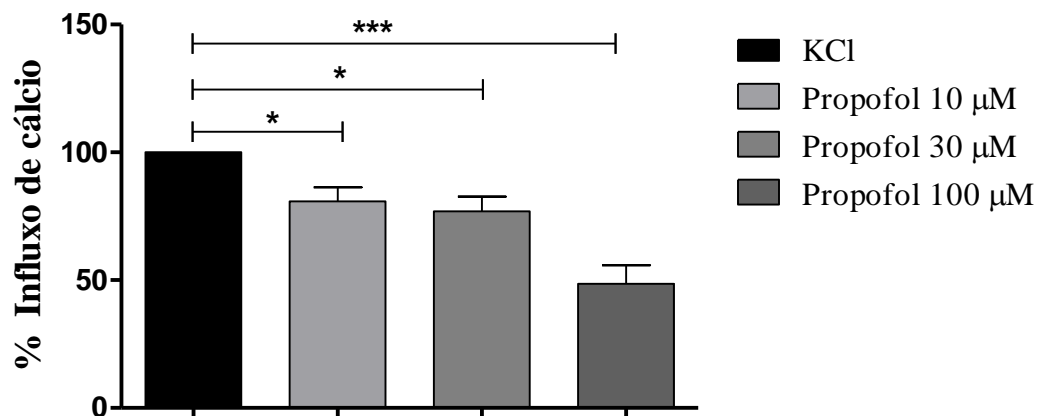
Com os resultados acima, certifica-se que tanto o etomidato quanto o propofol foram capazes de reduzir o influxo de cálcio.

A)



* ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$).

B)



* ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$).

Figura 12: Efeito do etomidato e propofol sobre o influxo de cálcio em terminais sinápticos isolados. Os sinaptosomas foram tratados com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, estimulados com KCl 33 mM. O influxo de cálcio foi determinado pela porcentagem do íon que foi marcado com a sonda intracelular FURA2-AM. **(A)** Curva dose-resposta das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 10, 30, 100 µM e propilenoglicol. **(B)** Curva resposta das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 10, 30 e 100 µM. Dados normalizados em relação ao estímulo KCl.

4.5 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre os canais de cálcio transfectados isoladamente em células HEK.

Como foi observada a redução do influxo de íons cálcio tanto pelo propofol, quanto pelo etomidato, decidiu-se verificar a ação desses anestésicos sobre os CCSV do tipo –N (Elliot e cols, 1995) e –P/Q (Igelmund e cols,1996), que são os principais subtipos desses canais envolvidos na neurotransmissão no hipocampo.

Células HEK foram plaqueadas em lamínulas e, posteriormente, transfectadas com cada canal de cálcio isoladamente com intuito de avaliar a ação de cada anestésico nos em cada subtipo específico de canal de cálcio. Após 24h, para a expressão dos canais, essas células foram marcadas com a sonda fluorescente Fura 2–AM, que é capaz de entrar na célula e se ligar ao cálcio intracelular, aumentando assim a fluorescência. A variação da fluorescência foi quantificada no espectrofluorímetro. Neste protocolo experimental, a mesma população de células foi submetida primeiramente ao estímulo despolarizante (KCl) por 60s, em seguida foram incubadas com KRH com Ca^{2+} por 120s sem a presença do estímulo, com o intuito de repolarizar o sistema. Após isso, elas foram incubadas com o anestésico por 120s e, por último foram estimuladas novamente com KCl, na presença ou ausência dos anestésicos.

Primeiramente avaliou-se se as células responderiam a dois estímulos seguidos de KCl no intervalo entre os estímulos de 360s, após a lavagem das células com KRH. Para isso, antes do segundo estímulo não houve incubação com drogas. As figuras 13A/B e 14A/B são a representação da variação e a quantificação de fluorescência, respectivamente, dos estímulos na ausência dos anestésicos. Verificamos que tanto as células transfectadas com o canal tipo –N, quanto às células transfectadas com o canal do tipo –P/Q foram capazes de responder a um segundo estímulo de KCl na mesma proporção do primeiro estímulo.

Após a validação do protocolo proposto, verificaram-se as ações do etomidato e propofol nos canais de cálcio do tipo –N. Como se observa no gráfico 13D, o etomidato na concentração avaliada de 30 μ M foi capaz de reduzir o influxo de cálcio ($0,365 \pm 0,046$) em relação ao estímulo inicial com KCl (1,000). O mesmo foi verificado no tratamento com 30 μ M propofol (figura 13F) reduzindo o influxo de cálcio para a metade ($0,54 \pm 0,10$) do observado no estímulo inicial com o KCl (1,000).

Em um segundo momento, os efeitos do etomidato e propofol foram avaliados sobre o influxo de cálcio nos canais tipo –P/Q. O influxo de cálcio após o tratamento

com o etomidato ($0,589 \pm 0,141$) mostrou-se menor do que quando estimulado com KCl (1,000) – Figura 14D. Da mesma, propofol ($0,554 \pm 0,093$) apresentou menor quantidade de cálcio em relação ao estímulo de KCl (1,000) – Figura 14F.

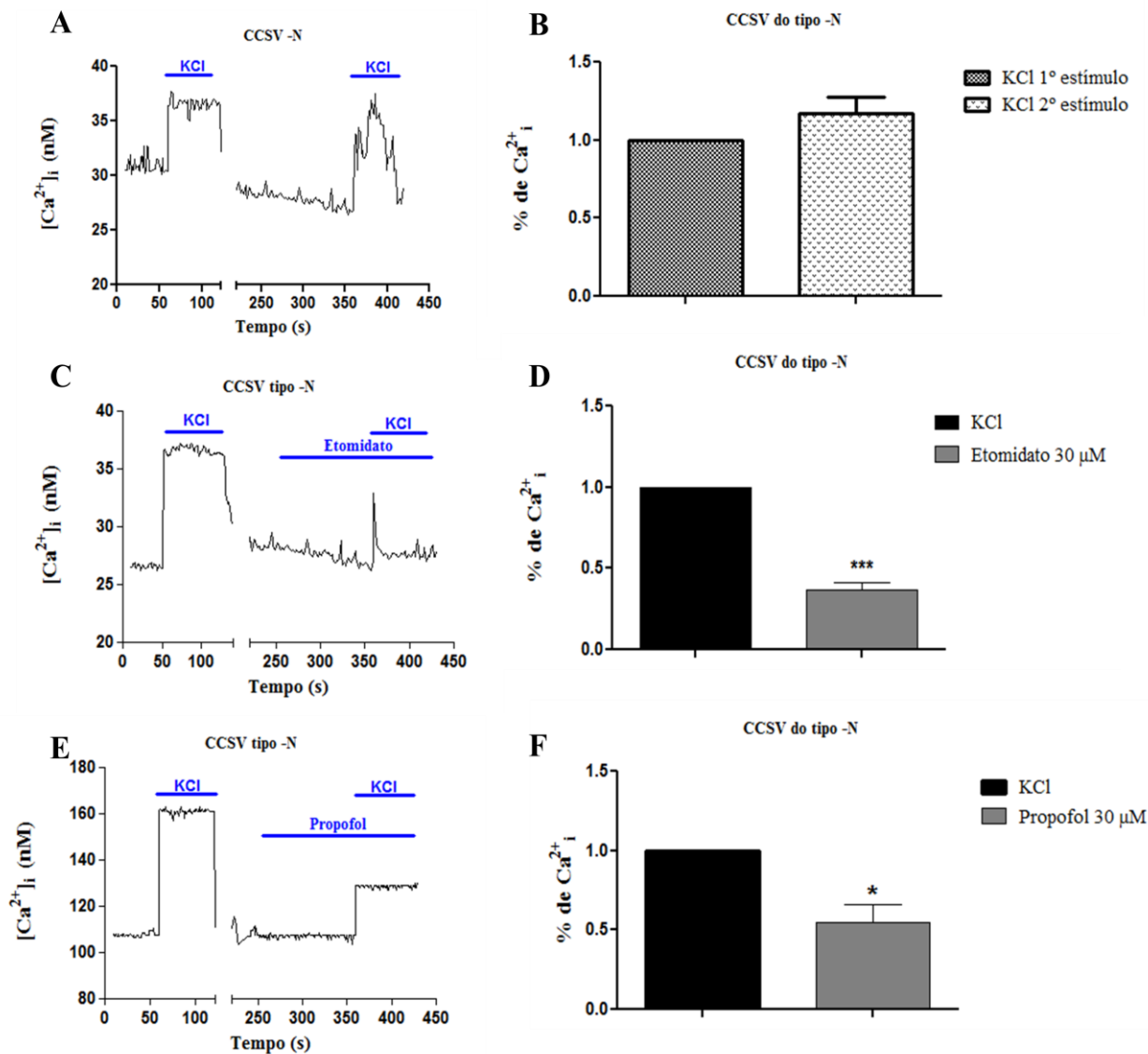


Figura 13: Influxo de cálcio em células HEK 293 transfetadas com CCSV do tipo -N. As células transfetadas com o canal -N foram marcadas, previamente, com a sonda FURA 2-AM e posteriormente estimuladas com KCl 33 mM. Após o estímulo, foram “lavadas” em uma solução com KRH, e em seguida tratadas com Etomidato e Propofol na concentração de 30 μ M. Após o tratamento, foram novamente estimuladas com KCl 33mM. **A)** Gráfico representativo da resposta ($[Ca^{2+}]_i$ x tempo) das células submetidas a dois estímulos de KCl, ambos na ausência de anestésicos. **B)** Quantificação do influxo de cálcio obtido pelo estímulo com KCl na ausência de anestésicos nos dois estímulos. **C)** Gráfico representativo da resposta ($[Ca^{2+}]_i$ x tempo) das células submetidas a dois estímulos de KCl, o primeiro na ausência de anestésico e o segundo na presença de 30 μ M de etomidato. **D)** Quantificação do influxo de cálcio obtido pelo estímulo com KCl na ausência e presença de 30 μ M de etomidato. **E)** Gráfico representativo da resposta ($[Ca^{2+}]_i$ x tempo) das células submetidas a dois estímulos de KCl, o primeiro na ausência de anestésico e o segundo na presença de 30 μ M de propofol. **F)** Quantificação do influxo de cálcio obtido pelo estímulo com KCl na ausência e presença de 30 μ M de propofol.

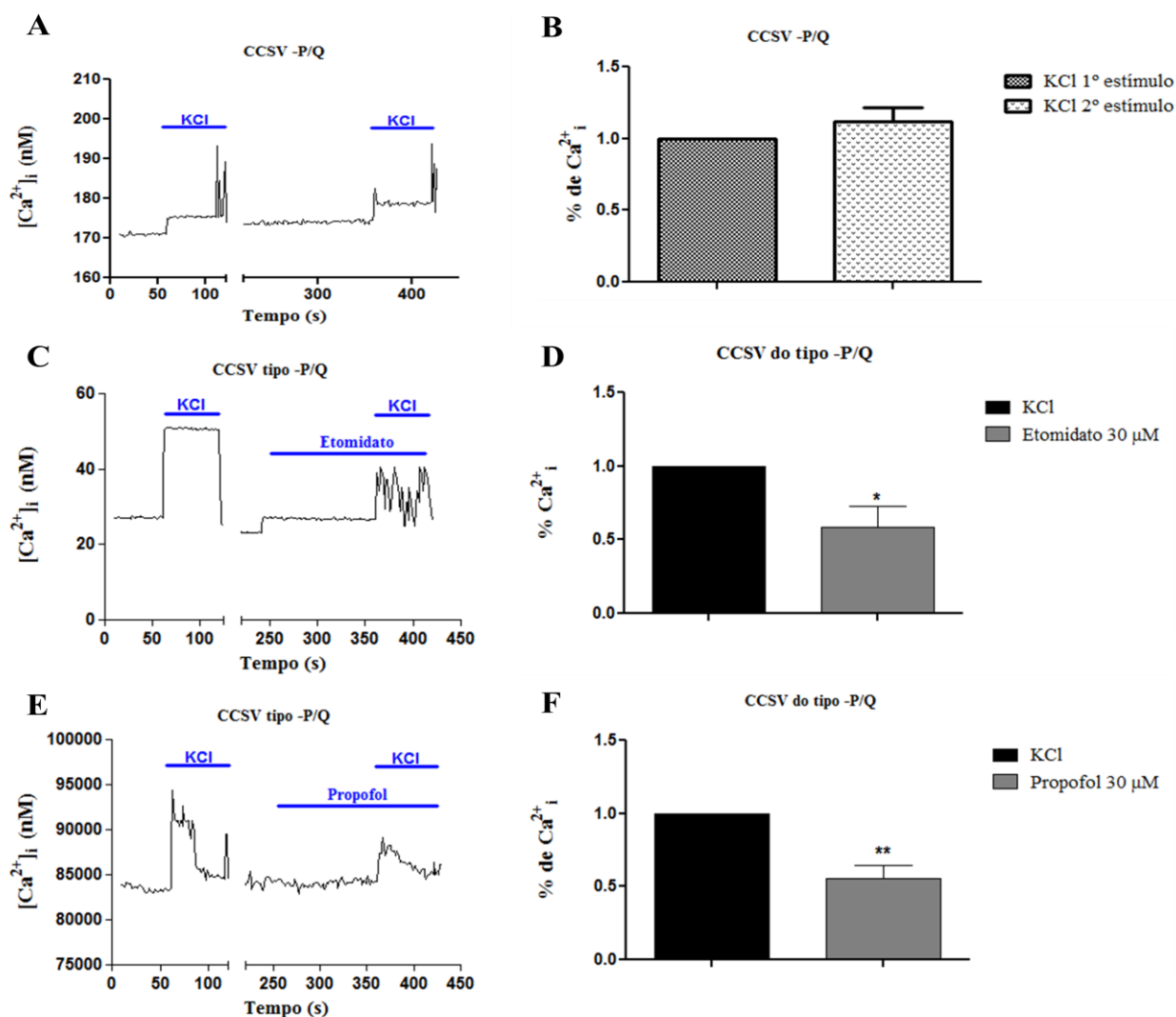


Figura 14: Influxo de cálcio em células HEK 293 transfetadas com CCSV do tipo -P/Q.

As células transfetadas com o canal -P/Q foram marcadas, previamente, com a sonda FURA 2-AM e posteriormente estimuladas com KCl 33 mM. Após o estímulo, foram “lavadas” em uma solução com KRH, e em seguida tratadas com Etomidato e Propofol na concentração de 30 μ M. Após o tratamento foram novamente estimuladas com KCl 33mM. **A)** Gráfico representativo da resposta ($[Ca^{2+}]_i$ x tempo) das células submetidas a dois estímulos de KCl, ambos na ausência de anestésicos **B)** Quantificação do influxo de cálcio obtido pelo estímulo com KCl na ausência de anestésicos nos dois estímulos. **C)** Gráfico representativo da resposta ($[Ca^{2+}]_i$ x tempo) das células submetidas a dois estímulos de KCl, o primeiro na ausência de anestésico e o segundo na presença de 30 μ M de etomidato. **D)** Quantificação do influxo de cálcio obtido pelo estímulo com KCl na ausência e presença de 30 μ M de etomidato. **E)** Gráfico representativo da resposta ($[Ca^{2+}]_i$ x tempo) das células submetidas a dois estímulos de KCl, o primeiro na ausência de anestésico e o segundo na presença de 30 μ M de propofol. **F)** Quantificação do influxo de cálcio obtido pelo estímulo com KCl na ausência e presença de 30 μ M de propofol.

4.6 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

Já está bem estabelecido que na isquemia cerebral, o tecido em hipóxia e durante a reperfusão tecidual, ocorre um aumento na produção de radicais de livres, inativação de alguns sistema de detoxificação e consumo de antioxidantes (Chen e cols, 2011). Em conjunto, todo esse processo culmina em dano e morte tecidual. Considerando que a geração de ERO é uma importante via de dano tecidual no processo isquemia cerebral e, que existem relatos do efeito antioxidante do propofol (Bayona e cols,2004) decidiu-se avaliar o efeito dos anestésicos propofol e etomidato nesta via.

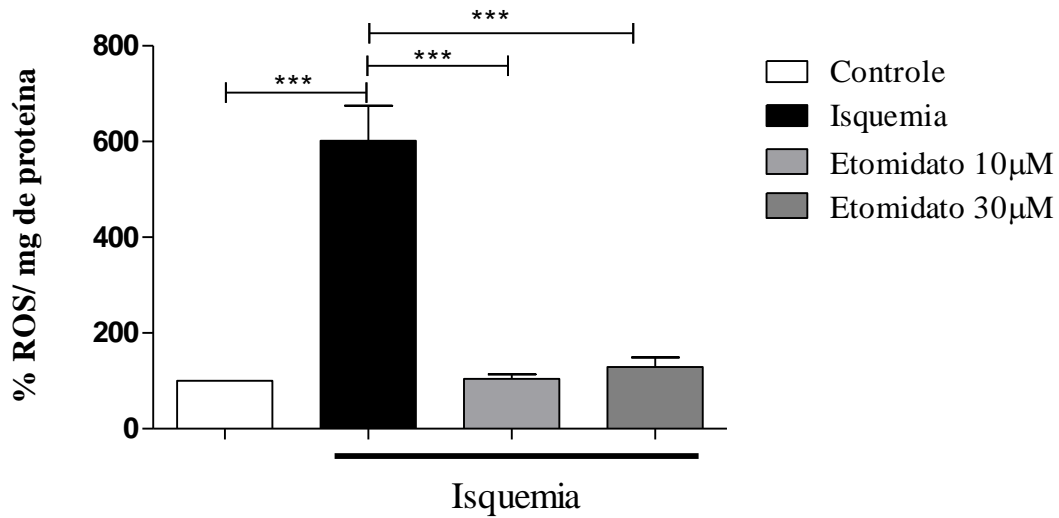
As fatias de hipocampo de ratos foram submetidas ao processo de isquemia *in vitro* descrito anteriormente. Após as 4 horas de reperfusão, as fatias foram homogeneizadas em tampão tris/HCl e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado e incubado com a sonda DCF-DA para a quantificação das EROs. Os resultados encontrados estão descritos abaixo.

Quando se compara os grupos tratados com etomidato nas concentrações de 10 μM ($104,4 \pm 9,55$) e 30 μM ($139,90 \pm 20,08$) com o grupo isquemiado ($601,80 \pm 72,90$), verifica-se que todas as doses testadas do anestésico foram capazes de reduzir a formação de EROs aos níveis observados no controle (Figura 15A).

Na figura 15B, os grupos tratados com o propofol apresentaram praticamente o mesmo perfil de redução das EROs em relação ao grupo isquemiado e controle. Propofol 10 μM ($118,00 \pm 21,84$) e 30 μM ($161,50 \pm 27,70$) com o grupo isquemiado ($601,80 \pm 72,90$).

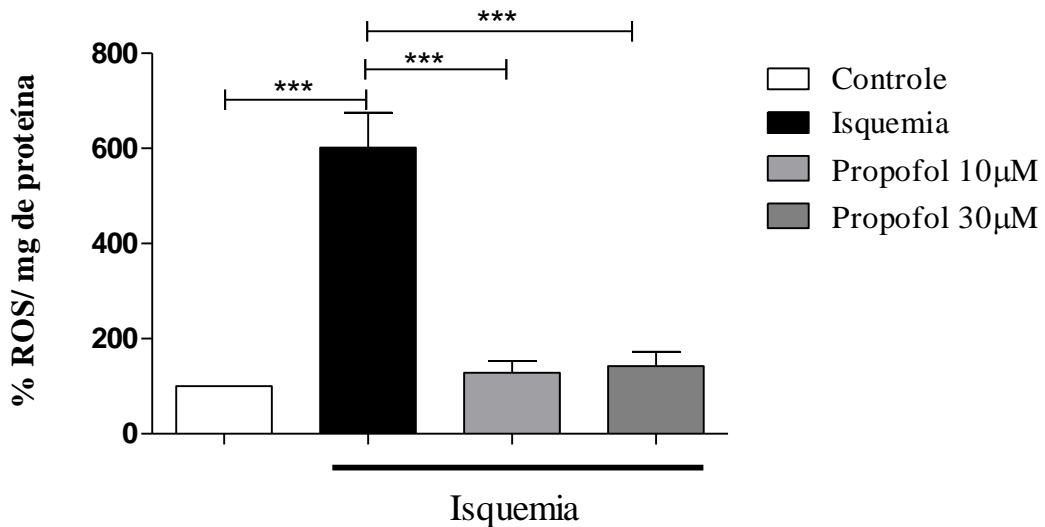
Portanto, conclui-se que ambos anestésicos são capazes de reduzir a geração de EROs decorrentes de um insulto isquêmico.

A)



*** p < 0,001.

B)



*** p < 0,001.

Figura 15: Efeito do Etomidato e Propofol na produção de EROs. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperfusão. **(A)**. Curva resposta das fatias tratadas com Etomidato nas concentrações de 10, 30 e 100 µM. **(B)** Curva resposta das fatias tratadas com Propofol nas concentrações de 10, 30 e 100 µM. Dados normalizados em relação ao grupo controle.

4.7 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre Superóxido Dismutase (SOD)

Os antioxidantes endógenos, como a SOD, desempenham um papel fundamental no controle da quantidade de EROs gerados após isquemia e reperfusão tecidual (Crack e cols, 2005). A SOD é uma enzima que está no início da cascata de detoxificação, catalisando a reação de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio.

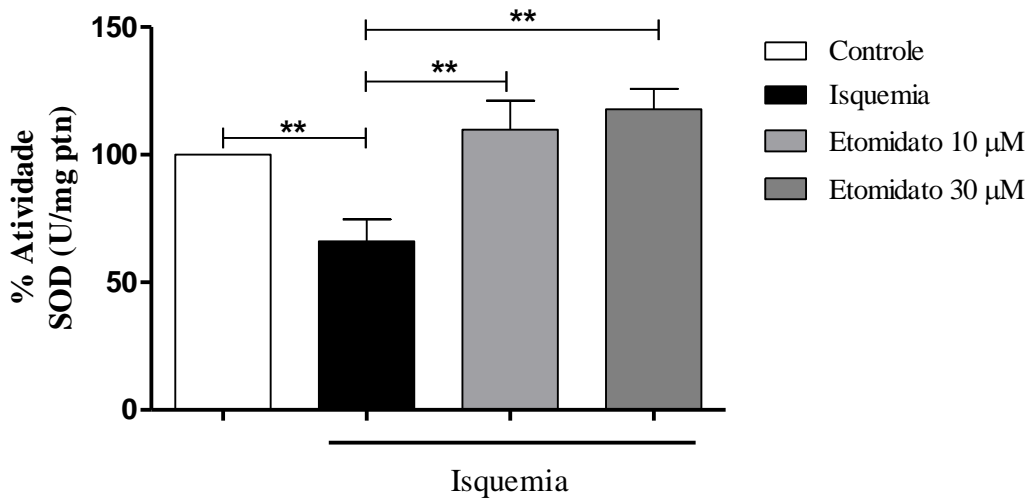
As fatias de hipocampo de ratos foram submetidas ao processo de isquemia *in vitro* descrito anteriormente. Após as 3 horas de reperfusão, essas fatias foram homogeneizadas em tampão tris/HCl e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado e incubado com o pirogalol. A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente através da alteração da autoxidação do pirogalol.

Na figura 16A, observa-se após insulto isquêmico a atividade encontra-se reduzida, $66,12 \pm 11,06$. É possível certificar que o etomidato nas concentrações de 10 ($109,90 \pm 11,06$) e 30 μM ($117,80 \pm 8,04$) foi capaz de reestabelecer a atividade da SOD ao nível do controle (100,00).

O mesmo efeito não foi reproduzido pelos grupos tratados com propofol. Os grupos tratados com as concentrações de 10 μM ($60,13 \pm 14,99$) e 30 μM ($66,26 \pm 15,72$) não alteraram a atividade da SOD comparando ao grupo que sofreu isquemia ($55,99 \pm 13,03$) – Figura 16B.

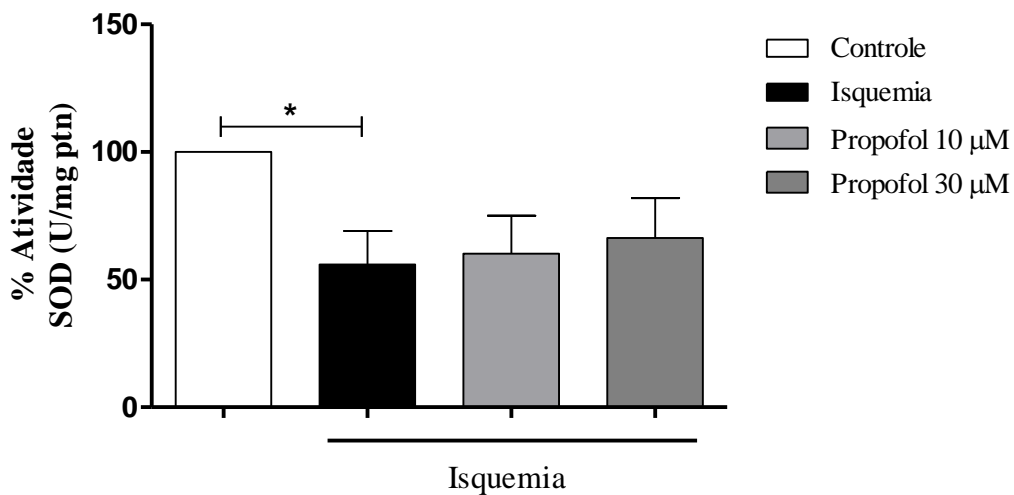
Com isso, o etomidato foi capaz de aumentar a atividade da primeira enzima da via de detoxificação da célula. O propofol, no entanto, não interferiu na atividade enzima da SOD.

A)



** p < 0,01

B)



* p < 0,05

Figura 16: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da superóxido dismutase. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperfusão. **(A).** Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30 µM. **(B)** Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 µM. Dados normalizados em relação ao grupo controle.

4.8 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre Catalase.

O peróxido de hidrogênio gerado pela SOD e por outras vias, a partir dos radicais superóxidos, é posteriormente detoxificado pela catalase e diferentes peroxidases, como a GPx (Mathias e cols, 2008). A catalase, como a SOD, faz parte do sistema antioxidante da célula, com isso o aumento na atividade dessa enzima contribui para a redução da quantidade de EROs na célula.

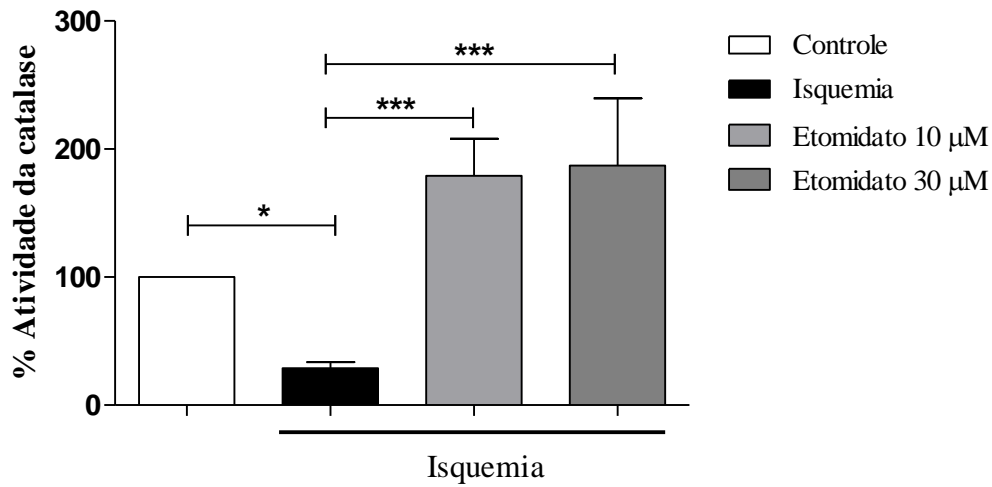
Com o intuito de avaliar a atividade da catalase, fatias de hipocampo de ratos foram submetidas ao processo de isquemia *in vitro* descrito anteriormente. Após as 4 horas de reperfusão, essas fatias foram homogeneizadas em tampão tris/HCl e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado e incubado com H₂O₂. A atividade da catalase foi determinada espectrofotometricamente por meio da alteração da decomposição do H₂O₂.

Quando se compara os grupos tratados com etomidato com o grupo controle, constata-se que as concentrações de 10 µM (164,10 ± 29,20) e 30 µM (163,00 ± 49,20) foram capazes de aumentar a atividade dessa enzima em 1,6 vezes. Enquanto que no grupo isquemiado (28,78 ± 4,80) houve redução da atividade da catalase - Figura 17A.

Já os grupos na presença de propofol nas concentrações 10 µM (46,29 ± 6,06) e 30 µM (56,51 ± 12,91) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo isquemiado (46,74 ± 9,91) – Figura 17B.

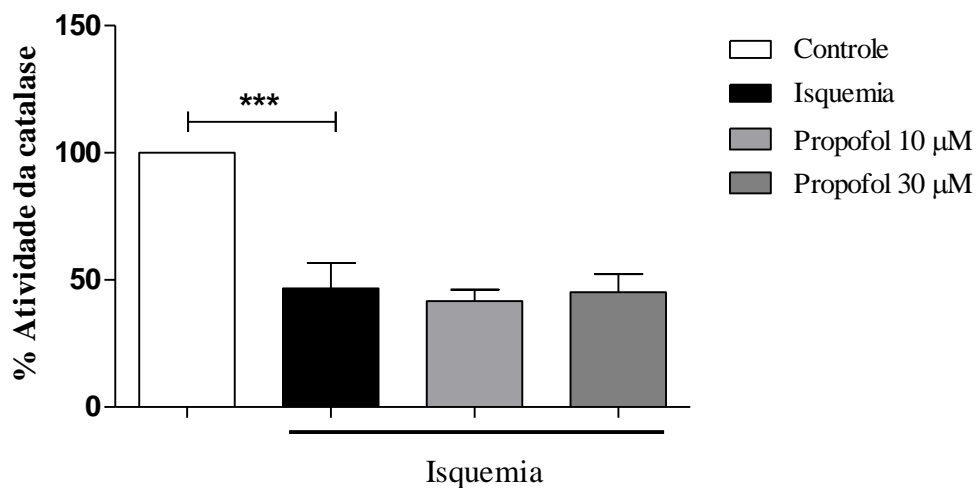
Portanto, mais uma vez o etomidato foi capaz de aumentar o status de atividade antioxidante da célula, com o aumento da enzima catalase. O mesmo não foi observado nos grupos tratados com propofol.

A)



* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

B)



*** $p < 0,001$.

Figura 17: Efeito do Etomidato e Propofol a atividade da catalase. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperfusão. (A) Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30µM . (B) Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 µM . Dados normalizados em relação ao grupo controle.

4.9 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o sistema Glutaciona.

A glutaciona e suas enzimas fazem parte de um importante sistema antioxidante das células com o intuito de dismutar as espécies reativas de oxigênio e, assim, evitar o dano celular. O tripeptídeo glutaciona é o composto tiol presente em maior abundância na célula de todos os órgãos. A GSH reage diretamente com os radicais em reações não enzimáticas e também é um doador de elétrons na redução de peróxidos catalisados pela Gpx (revisado por Drenagem e cols, 1999).

Algumas isorformas da GST possui a capacidade em conjugar GSH a peróxidos orgânicos, gerando GSSG e o respectivo álcool (Halliweel e cols, 2007). A atividade de peroxidase da GST auxilia a GPx dismutar o peróxido de hidrogênio, reduzido os danos gerados pelo estresse oxidativo.

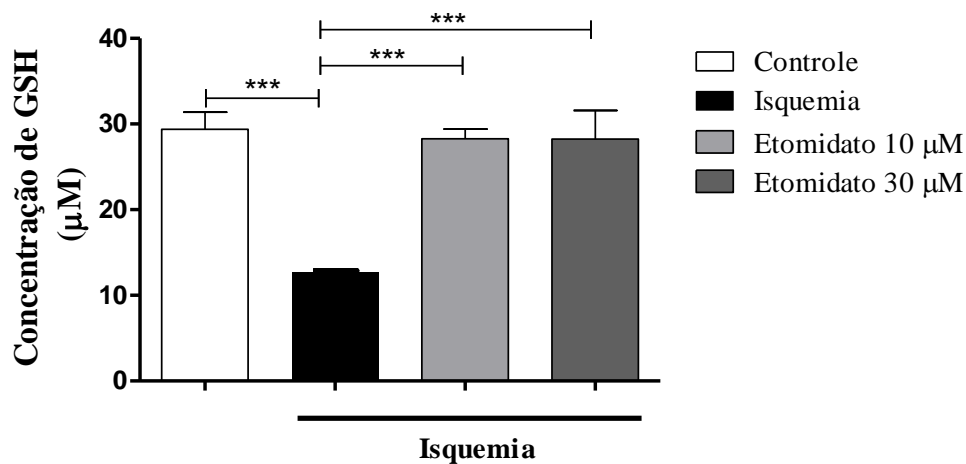
4.9.1 Efeito dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o conteúdo de GSH na célula

Como o tripeptídeo GSH é um importante componente antioxidante, o conteúdo desta molécula foi determinado. Para isso, as fatias de hipocampo submetidas à isquemia *in vitro* foram homogeneizadas em ácido metafosfórico e centrifugadas. O sobrenadante foi incubado com o kit de dosagem de GSH.

No primeiro momento foi avaliado se esses anestésicos seriam capazes de alterar o conteúdo de GSH na célula. Como se observa na figura 18, tanto o propofol quanto o etomidato foram capazes de modificar o conteúdo de GSH nas células, restaurando-o para o nível encontrado no grupo controle ($29,39 \pm 1,99$) μM . Nos grupos tratados com etomidato nas concentrações de 10 μM e 30 μM ocorreu o aumento da concentração de GSH para ($28,27 \pm 1,14$) μM e ($28,26 \pm 3,32$) μM , respectivamente, quando se compara com o grupo isquemiado ($12,68 \pm 0,19$) μM . O mesmo foi observado nos grupos tratados com o propofol, 10 μM ($23,99 \pm 1,99$) e 30 μM ($27,35 \pm 1,90$). No grupo isquemiado houve a redução do conteúdo de GSH, fenômeno já descrito na literatura.

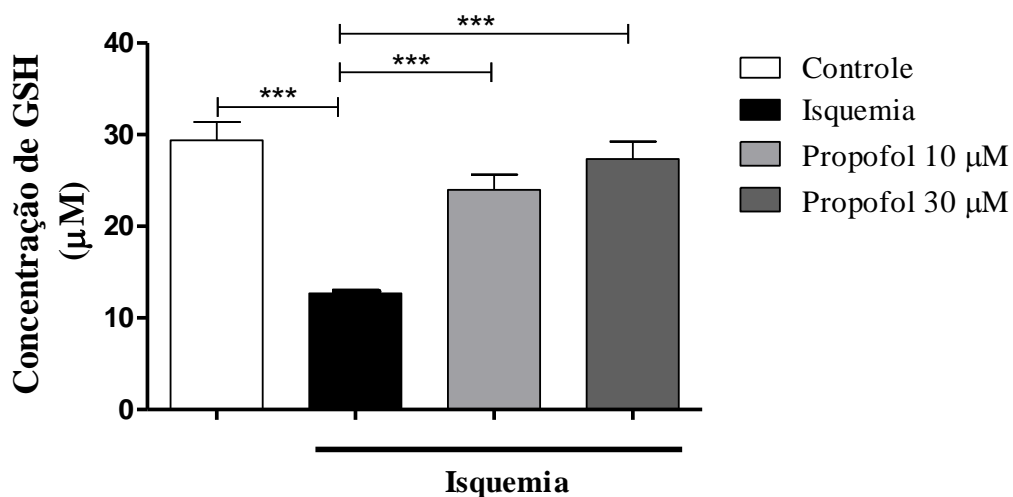
Com isso, verifica-se que o etomidato e o propofol foram capazes de dobrar o conteúdo de GSH em relação ao grupo que não recebeu o tratamento com essas drogas (isquemia).

A)



*** $p < 0,001$.

B)



*** $p < 0,001$

Figura 18: Efeito do Etomidato e Propofol o conteúdo de GSH. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperusão. **(A)** Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30µM. **(B)** Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 µM.

4.9.2 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre a Glutathione Peroxidase

A Gpx é uma das enzimas mais importantes na remoção do peróxido de hidrogênio no cérebro. Em virtude disso, a sua atividade foi quantificada.

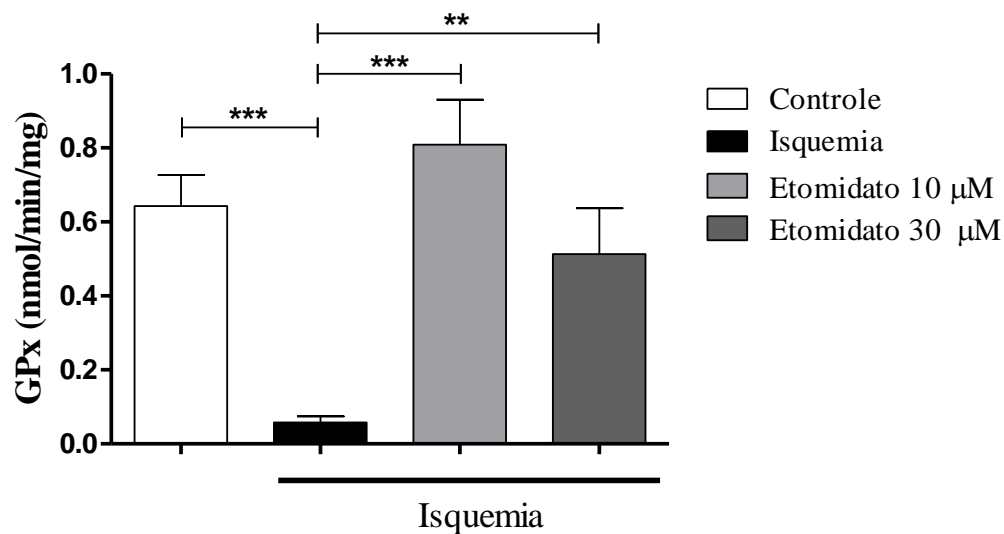
A avaliação espectrofotométrica da atividade da GPx foi realizada no sobrenadante do homogenato das fatias submetidas à isquemia *in vitro*.

Quando se compara os grupos tratados com etomidato nas concentrações de 10 μM ($0,8086 \pm 0,12$) e 30 μM e ($0,551 \pm 0,12$) com o grupo isquemiado que não recebeu tratamento ($0,058 \pm 0,016$), certifica-se que esse anestésico foi capaz de aumentar a cinética enzimática aproximadamente em 10 vezes, contribuindo, assim, para a redução da quantidade de EROs no tecido. Como esperado, no grupo isquemiado houve a redução da atividade desta enzima em relação ao grupo controle ($0,6433 \pm 0,083$).

Os grupos tratados com o propofol seguiram o mesmo padrão observado com o etomidato. O tratamento tanto na concentração de 10 μM ($0,553 \pm 0,14$), como na de 30 μM e ($0,841 \pm 0,25$) elevaram a atividade da GPx em 7,6 vezes e 11,7 vez, respectivamente, em relação ao grupo isquemiado sem tratamento ($0,072 \pm 0,018$). O tratamento com o propofol restaurou a atividade enzimática para os níveis observados no controle ($0,657 \pm 0,088$).

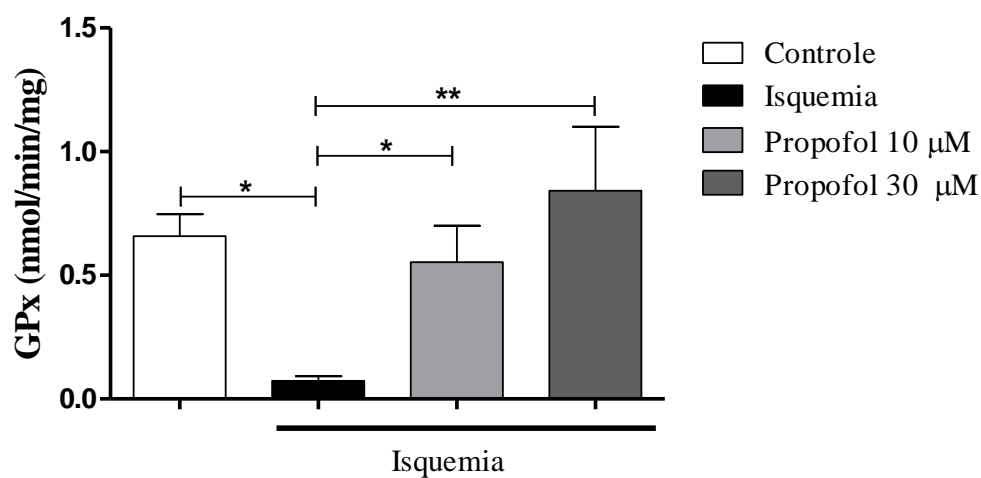
Assim, verifica-se que as drogas testadas foram capazes de modular a atividade da GPx, reestabelecendo a padrão enzimático encontrado no grupo controle.

A)



** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

B)



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Figura 19: Efeito do Etomidato e Propofol a glutathiona peroxidase. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperusão. **(A)** Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30 μ M . **(B)** Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 μ M .

4.9.3 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre a Glutathione Redutase

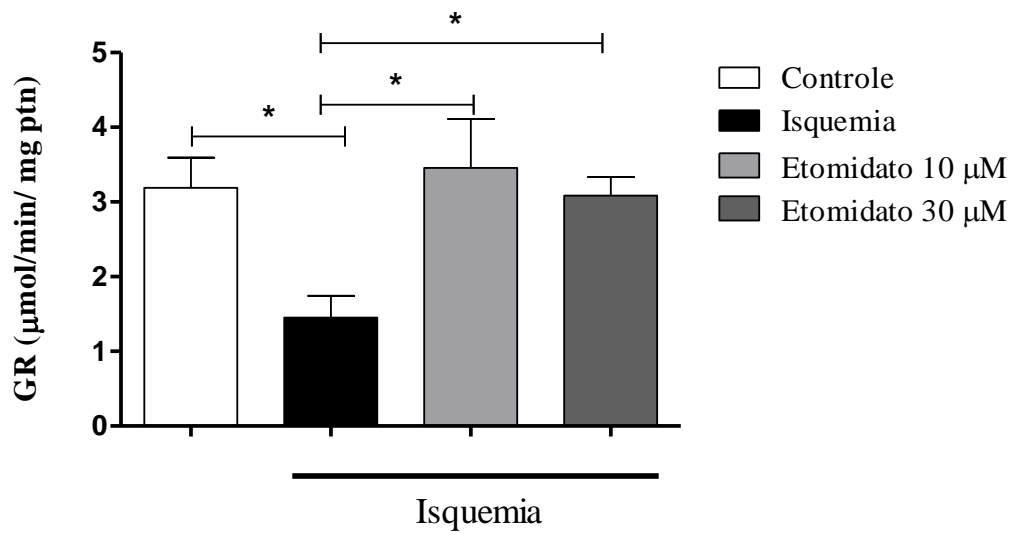
O aumento da atividade da GR, em conjunto com algumas das outras enzimas do sistema glutathione, permite uma maior reciclagem da GSSG, renovando o estoque de GSH e com isso, reestabelecendo estado REDOX fisiológico da célula.

A atividade da GR foi medida no sobrenadante do homogenato das fatias submetidas à isquemia *in vitro*, através da quantificação do consumo de NADPH.

De acordo com a literatura, observa-se que após o insulto isquêmico a atividade encontra-se reduzida ($1,45 \pm 0,29$) em relação ao grupo controle ($3,58 \pm 0,42$). É possível certificar que o etomidato nas concentrações de $10 \mu\text{M}$ ($3,45 \pm 0,65$) e $30 \mu\text{M}$ ($3,08 \pm 0,24$) foi capaz de reestabelecer a atividade da GR ao nível encontrado no controle. O propofol seguiu a mesma tendência na concentração de $10 \mu\text{M}$ ($4,69 \pm 0,65$), porém a concentração de $30 \mu\text{M}$ ($2,47 \pm 0,44$) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo isquemiado.

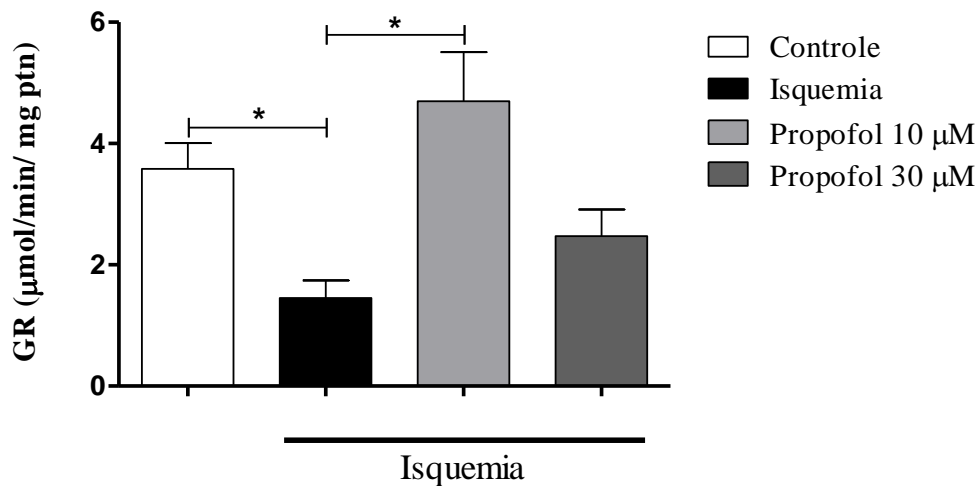
Na avaliação da atividade da GR observa-se que os tratamentos com etomidato e propofol mais uma vez mantiveram os níveis de enzima encontrados no grupo controle.

(A)



* p < 0,05

(B)



* p < 0,05

Figura 20: Efeito do Etomidato e Propofol a glutationa redutase. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperusão. (A) Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30µM. (B) Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 µM.

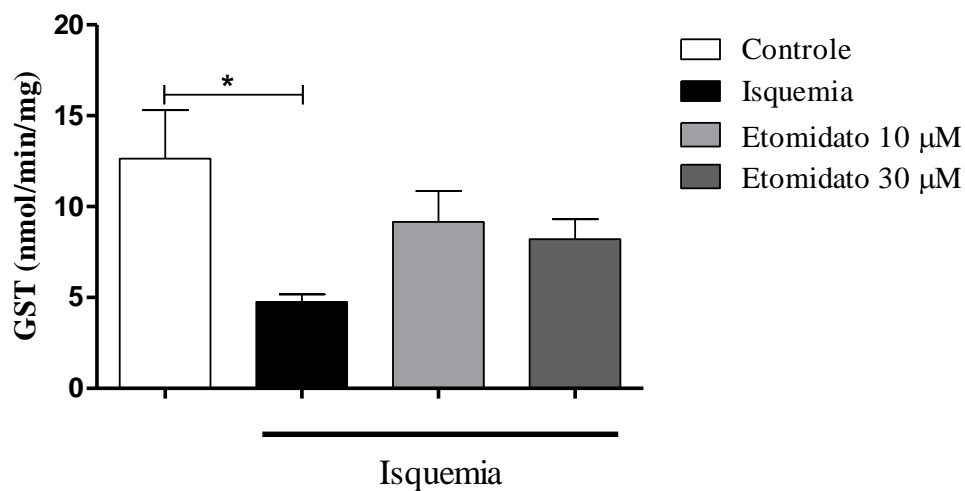
4.9.4 Efeito dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre a Glutathione S Transferase

Algumas famílias da GST atuam como peroxidases auxiliando a GPx a dismutar a molécula de H_2O_2 em H_2O e O_2 , reduzindo assim a quantidade de EROs no tecido.

Ao avaliar a atividade da GST verificou-se que não ocorre a modulação desta enzima pelo etomidato nas concentrações testadas ($10 \mu M - 9,15 \pm 1,71$ e $30 \mu M - 8,21 \pm 1,09$). O propofol foi capaz de aumentar a atividade da GST nas concentrações de $10 \mu M (8,70 \pm 1,25)$ e $30 \mu M (10,76 \pm 0,51)$, em relação do grupo isquemiado não tratado ($4,76 \pm 0,41$).

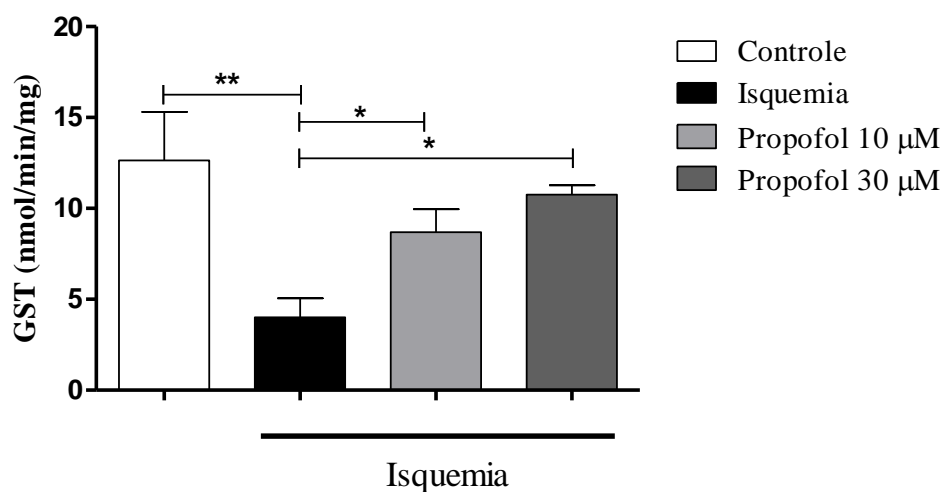
O propofol foi capaz de dobrar a atividade da GST, enquanto que o etomidato não alterou a atividade da GST.

A)



* $p < 0,05$

B)



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Figura 21: Efeito do Etomidato e Propofol a glutathiona S transferase. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperusão. (A) Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30µM . (B) Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 µM.

4.10 Avaliação da atividade antioxidante da molécula de Propofol *per si*

O potencial antioxidante do propofol foi notado devido à sua semelhança com a molécula de α -tocoferol (Aarts e cols, 1995). O propofol escaneia diretamente os radicais livres e reduz a lipoperoxidação (Bayona e cols, 2004).

Com base nestas evidências, decidiu-se avaliar se a molécula do propofol é capaz de se ligar diretamente ao radical livre e neutralizá-lo.

A figura 22 mostra a capacidade de uma molécula se ligar ao radical livre estável DPPH promovendo, assim, a alteração de cor deste composto. Foi utilizada o ácido ascórbico como controle positivo, visto que a atividade antioxidante desta molécula já está bem consolidada. De acordo com a figura, fica clara semelhança entre as curvas de oxidação do DPPH pelo propofol e ácido ascórbico, demonstrando que a molécula de propofol possa se ligar diretamente ao radical livre, neutralizando-o. Foram realizados 5 experimentos em diferentes dias.

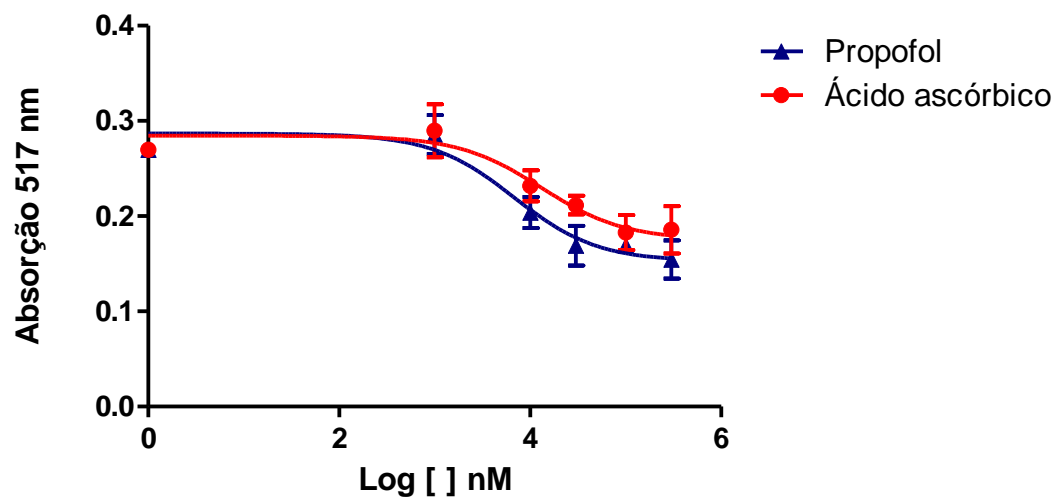


Figura 22: Curva dose resposta do Propofol e do ácido ascórbico na oxidação do radical livre DPPH.

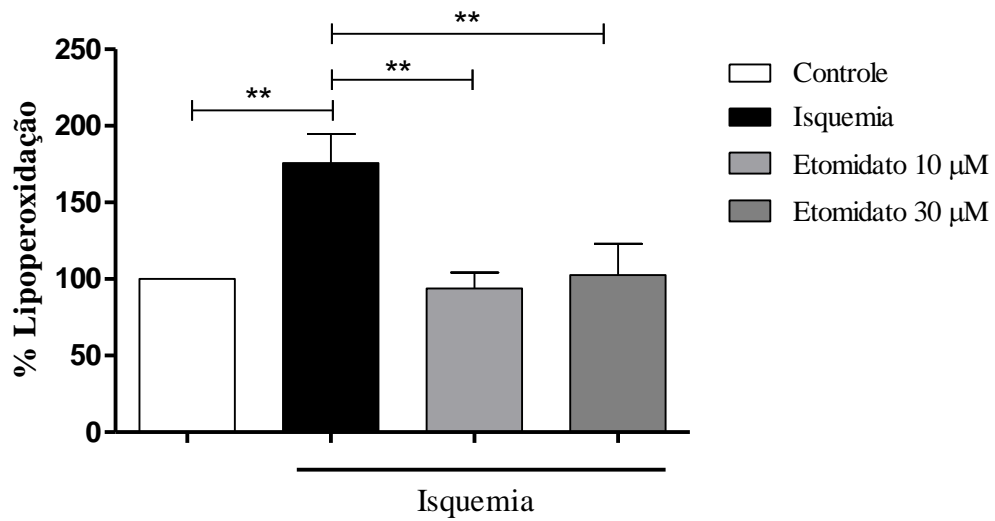
4.11 Efeitos dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre Lipoperoxidação

A etapa crítica da produção excessiva de radicais livres é a interação desses compostos com as macromoléculas biológicas como: lipídeos (principalmente dos de membrana), proteínas e DNA. A lipoperoxidação é a degradação oxidativa de um lipídeo, que se inicia quando um radical livre doa um elétron para um ácido graxo de membrana, principalmente insaturado, iniciando uma reação em cadeia que culmina em dano celular (Mylonas e col, 1999). Um dos produtos gerados da peroxidação lipídica mais conhecido é o malondialdeído (MDA) (Alexandrova e col, 2005). Portanto, a quantificação de MDA é amplamente utilizada como indicadora da lipoperoxidação.

Para mensurar o conteúdo de MDA das amostras, o sobrenadante coletado para realizar os testes da SOD e catalase foi incubado com ácido tiobarbitúrico em altas temperaturas. A reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA é colorimétrica.

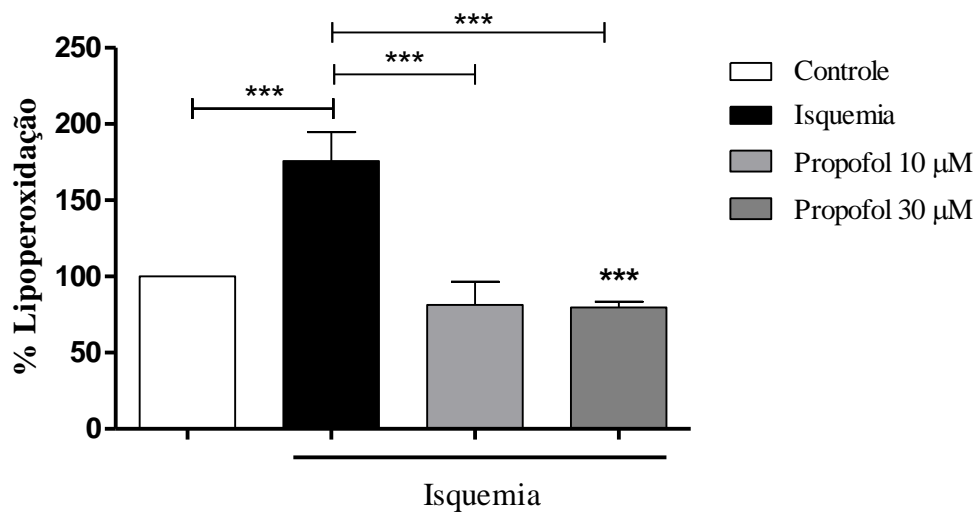
Observa-se que tanto o propofol quanto o etomidato foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica aos níveis encontrados no controle (100,00). O conteúdo de MDA dos grupos tratados com etomidato 10 μ M ($93,90 \pm 10,29$) e 30 μ M ($102,60 \pm 20,48$), foi aproximadamente 46% menor do que o observado no grupo isquemiado sem tratamento ($175,70 \pm 19,20$). Os grupos tratados com propofol 10 μ M ($81,40 \pm 15,11$) e 30 μ M ($79,74 \pm 3,69$) apresentaram resultados semelhantes ao etomidato, diminuindo em torno de 53% o conteúdo de MDA. Como o esperado, o grupo isquemiado apresentou maior quantidade de MDA em relação ao grupo controle.

A)



** p < 0,01.

B)



*** p < 0,001.

Figura 23: Efeito do Etomidato e Propofol a lipoperoxidação. As fatias de hipocampo foram tratadas com Etomidato e Propofol em diferentes concentrações por 30 minutos e, posteriormente, isquemiadas por 20 minutos, seguidas de 4 horas de reperfusão. (A) Representação gráfica dos grupos tratados com Etomidato nas concentrações de 10 e 30µM. (B) Representação gráfica dos grupos tratados com Propofol nas concentrações de 10 e 30 µM. Dados normalizados em relação ao grupo controle.

5. DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1: Avaliação da viabilidade celular através da quantificação por microscopia de fluorescência e dosagem da atividade de lactato desidrogenase liberada

O hipocampo possui uma das maiores taxas de consumo de oxigênio do cérebro (Nishizaki e cols 1988), o que o torna, particularmente, susceptível à privação de glicose e oxigênio produzida pelo modelo de isquemia cerebral *in vitro* (Pinheiro e cols 2009). Vários trabalhos já demonstraram tanto em ratos (Kirino 1982 e Pulsinelli e cols 1982), quanto em humanos (Petito e cols 1987, Horn e Scholte 1992); que a isquemia transitória de curta duração resulta em uma perda seletiva de neurônios da região CA1. Com isso, o modelo de fatias de hipocampo tem sido muito usado para estudar os mecanismos de neurotoxicidade induzido pela isquemia e, para avaliar a eficácia de potenciais agentes terapêuticos neuroprotetores (Monette 1997).

Esse modelo experimental possui algumas vantagens em comparação ao modelo *in vivo* na avaliação da eficácia de novos agentes terapêuticos. O custo e o tempo de execução dos experimentos são bem menores, além de ser menos complexo e permitir um melhor controle das variáveis envolvidas (Goldberg e cols, 1997).

O ensaio de viabilidade celular utilizado em modelos *in vitro* geralmente compreende análise dos aspectos funcionais e morfológicos (Schwartz e cols 1995). A marcação com etídeo homodímero é um método relativamente simples e rápido para avaliar a viabilidade neuronal em fatias de hipocampo com 400 μ M de espessura sem a necessidade de agentes fixadores, como utilizado em outros métodos bioquímicos (Monette e cols 1997). Com isso, o uso da marcação com o etídeo homodímero foi dos testes escolhido para a realização de análises quantitativas das células mortas.

Outros métodos podem ser utilizados para avaliar a viabilidade celular em fatias cerebrais, como análises microscópicas convencionais, medidas bioquímicas e eletrofisiológicas (Ligenhöhl e cols 1997, Small e cols 1997 e 1995). As análises morfológicas utilizando microscopia convencional baseiam-se nas características de visualização morfológica de células necróticas ou apoptóticas como núcleo picnótico, rupturas na membrana e condensação nuclear. Esse método oferece dados morfológicos precisos, mas requerem várias preparações do tecido como fixação, desidratação, marcação, inclusão em materiais específicos para realizar os cortes e o seccionamento. Após todo esse preparo do tecido, este é analisado para a contagem extremamente laboriosa de células mortas, por isso não foi escolhida.

Outros métodos bioquímicos de viabilidade celular são utilizados, entre eles podemos citar o uso de marcadores da atividade mitocondrial, como o cloreto de trifeniltretazolio (TTC) (Glennner e cols 1969, Straus e cols 1948), que forma um depósito nas células com mitocôndria ativa, a liberação de lactato desidrogenase (Bickler e cols 1996, Gross e cols 1996, Koh e cols 1987), o consumo de glicose e O₂ (Nishizaki e cols 1988, Vanderkooi e cols 1991) ou medida dos níveis de ATP (Nabetani e cols 1995, Tanimoto e cols 1987). Esses métodos são utilizados em modelos de cultura celular e em modelos *in vivo* de doenças neurodegenerativas. Para confirmar a morte celular observada no ensaio de microscopia de fluorescência foi avaliado o conteúdo de lactato desidrogenase liberada. O ensaio bioquímico da dosagem de LDH liberada é amplamente usado para estudos de morte celular. A liberação dessa enzima é um marcador biológico de dano da membrana e morte necrótica. Portanto, foram utilizadas duas técnicas para avaliar se o etomidato e o propofol possuem efeito neuroprotetor.

O etomidato preveniu a morte de células neuronais e gliais do hipocampo de maneira dose-dependente, a partir da dose de 1 µM, quando submetidas ao insulto de isquemia/reperfusão *in vitro* (Figuras 8). Na curva dose-resposta, observou-se que a neuroproteção máxima foi encontrada com a dose de 50,44 µM. Esse resultado foi confirmado pelo ensaio de quantificação de LDH liberada (Figura 10A).

O propofol também foi capaz de reduzir a morte celular nas duas técnicas utilizadas para avaliar a viabilidade celular (Figura 9 e 10B), quando submetidas ao insulto de isquemia/reperfusão *in vitro*. Essa redução também foi dose-dependente, a partir de 1 µM, com neuroproteção máxima na dose de 63,18 µM.

O mecanismo de ação da maioria dos anestésicos envolve a redução da neurotransmissão excitatória e aumento da transmissão inibitória, resultando em redução da atividade metabólica cerebral (consumo de O₂) e redução do EEG (Traul e cols, 2008). Por conseguinte, acredita-se que grande parte dos agentes anestésicos apresentem propriedades neuroprotetoras, no entanto a sua potência neuroprotetora não está correlacionada com a sua eficácia anestésica (Yamaguchi e cols, 2000; Kawaguchi e cols, 2004 e Sanders e cols, 2005). Com o intuito de confirmar a ação neuroprotetora dos anestésicos, vários estudos têm sido conduzidos para certificar esse efeito, bem como descrever os mecanismos de ação envolvidos.

Trabalhos realizados por Patel e cols (1995) e Lesser e cols (1999) demonstraram que o etomidato possui efeito neuroprotetor em modelos com 10 minutos

de isquemia cerebral. Os mecanismos envolvidos na neuroproteção do cérebro pelo etomidato, descritos nos trabalhos acima, foram a redução da liberação no espaço extracelular de glutamato e dopamina, respectivamente. Outro estudo mais recente demonstrou que o etomidato foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica decorrente de isquemia cerebral (Harman e cols, 2012). Contudo, a proteção do etomidato na isquemia cerebral não é um consenso. Em um estudo de eletrofisiologia em fatias de hipocampo, o etomidato (nas concentrações de 2 a 60 μM) não foi capaz de recuperar as células da região CA1 (Amadeu e cols, 1998). Existem, relativamente, poucos trabalhos relacionando etomidato à neuroproteção cerebral, quando se compara ao número de publicações da neuroproteção desse anestésico na medula espinhal. Neste tecido, a neuroproteção do etomidato já foi mais bem descrita, os mecanismos de atuação envolvem tanto a redução da excitotoxicidade glutamatérgica, bem como atividade antioxidante (Cayli e cols, 2006; Yagmurdur e cols, 2004; Ergün e cols, 2010 e YU e cols, 2010).

Confirmando os dados entrados neste trabalho, Adembri e cols (2007) relataram que o propofol (10–100 μM) foi capaz de diminuir, logo após o insulto isquêmico e 24 h depois, a injúria na região CA1 em fatias de hipocampo submetidas à deprivação de glicose e oxigênio (DGO). Velly e cols (2003) também verificaram que o propofol nas concentrações de 0,05–10 μM apresentou efeito neuroprotetor em um modelo de DGO, por meio da atenuação do aumento da concentração de glutamato extracelular. Existem vários outros trabalhos confirmando a ação neuroprotetora do propofol e atribuindo diversos mecanismos que medeiam essa ação, como: redução da apoptose (Liu e cols, 2008; Engelhard, 2004), ação sobre os receptores GABA_A (Albertson e cols, 1996), inibição do edema mitocondrial (Adembri e cols, 2006), ação antioxidante (Acquavia e cols, 2004), entre outros mecanismos já descritos.

5.2 Etapa 2: Avaliação do efeito dos anestésico Etomidato e Propofol na liberação de glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e, além disso, está envolvido em diversos processos patológicos. Na isquemia cerebral ocorre um evento denominado excitotoxicidade glutamatérgica, que se refere a um dano secundário causado pela liberação excessiva de glutamato, com consequente ativação patológica dos receptores glutamatérgicos, culminando em um influxo

exacerbado de cálcio e, conseqüentemente morte celular (Brouns e cols, 2009).

Como o glutamato é um importante mediador da cascata isquêmica, seus níveis foram quantificados na presença e ausência dos anestésicos estudados. Nesse experimento verificou-se que tanto o etomidato, quanto o propofol foram capazes de reduzir a liberação de glutamato de maneira dose-dependente. Esse resultado sinaliza que a neuroproteção desses anestésicos ocorrem parcialmente via atenuação da excitotoxicidade glutamatérgica. Resultado semelhante foi demonstrado por Patel e cols (1995), onde demonstraram que o etomidato reduziu a morte neuronal por meio da redução da liberação de glutamato. Engelhard e cols (2003) verificaram que o propofol e o sevoflurano foram capazes de suprimir o aumento de glutamato e noradrenalina, reduzindo, assim, a lesão isquêmica.

O glutamato pode ser liberado por meio de dois mecanismos: via exocitose de vesículas sinápticas (Ca^{2+} dependente), prevalente, ou através de liberação não vesicular (Ca^{2+} independente) (Nicholls e cols., 1987).

Nos terminais pré-sinápticos nervosos, os neurotransmissores são empacotados em pequenas vesículas. Essas vesículas são liberadas pelo mecanismo de exocitose, que é disparado pela entrada de íons Ca^{2+} , através da abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem que, por sua vez, é promovida pela despolarização inicial causada pela abertura dos canais de sódio sensíveis à voltagem (Pang e cols, 2010). Os canais para sódio não são responsáveis apenas pelo influxo inicial deste íon durante a fase de despolarização, mas também pela condução e propagação do sinal através da membrana. A cada potencial de ação ocorre o influxo de Na^+ através dos canais para sódio levando à despolarização da membrana plasmática (Stämpfli, 1981). Inibidores dos CSSV e CCSV reduzem a liberação de neurotransmissores do terminal nervoso pelas reduções da despolarização, da entrada de cálcio e da exocitose dependente de cálcio (Wu and Saggau 1997).

O etomidato e o propofol podem reduzir a quantidade de glutamato do meio extracelular por meio de dois mecanismos: i) a redução da liberação de glutamato, alterando o processo de exocitose ou ii) aumento da recaptação do glutamato da fenda sináptica usando os transportadores específicos presentes nos astrócitos e neurônios.

O sinaptossoma foi o modelo experimental escolhido para avaliar a ação dos anestésicos etomidato e propofol sobre o influxo dos íons sódio e cálcio do terminal pré-sináptico, visto que a preparação sinaptossomal contém terminais nervosos capazes de estocar e liberar neurotransmissores. É largamente usada como modelo para análise

pré-sináptica dos efeitos de várias drogas. Sendo um excelente modelo para o estudo de mecanismos moleculares pré-sinápticos (Dunkley, 1986) e, que tem sido utilizado desde a década de 60 para investigação da função pré-sináptica (De Robertis e cols., 1962; Gray e Whittaker, 1962). Trata-se de terminais nervosos isolados, que apresentam diâmetro entre 0.5-1 μm , contendo uma ou mais mitocôndrias pequenas, vesículas sinápticas elétron-lúcido de 50 nm de diâmetro e, em alguns casos, membrana pós-sináptica aderida. O sinaptossoma do SNC de mamíferos pode ser extraído de regiões cerebrais como córtex e hipocampo por apresentarem divisões anatômicas em camadas de forma clara.

A neurotransmissão ocorre após a propagação do potencial de ação ao longo dos axônios e o canal para o sódio é fundamental para que a mesma ocorra. Inicialmente, foram investigado os níveis de Na^+ interno sinaptossomal na presença etomidato nas concentrações de 10, 30 e 100 μM . Estas concentrações de etomidato não alteraram os níveis intracelulares de Na^+ . O propilenoglicol, diluente do etomidato, não foi capaz de influenciar os níveis de Na^+ interno. De fato, Lingamanemi e Hemminings (2003), em um experimento de “binding”, demonstraram que em concentrações clinicamente relevantes, somente o propofol apresentou efeito significativo sobre os CSSV. O etomidato e o pentobarbital foram significativamente menos potentes. Em um estudo promovido por Frenkel e cols (1998), o etomidato foi capaz em bloquear em 38 % a condutância dos canais de sódio, porém a dose utilizada excede em 100 vezes a dose clínica do anestésico.

Resultados contrários foram observados com outro anestésico estudado, o propofol. Este anestésico reduziu concentração interna de sódio em todas as concentrações avaliadas (10, 30 e 100 μM). Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores. O propofol inibiu o aumento da concentração interna de Na^+ sinaptossomal evocado por veratridina com CI_{50} de 13 μM (Ratnakumari e Hemmings, 1997). Em estudo eletrofisiológico, propofol e isoflurano inibiram canais para sódio dependente de voltagem em terminais nervosos de ratos isolados (Ouyang e cols., 2003). Os canais de sódio sensíveis à voltagem são classificados em dois grupos: os canais sensíveis à tetrodotoxina (Nav1.1, 1.2, 1.3, 1.6, 1.7) e os resistentes à tetrodotoxina Nav1.4, 1.5, 1.8, 1.9) (Goldin 2001; Lai et al.2004). Os CSSV mais expressos no hipocampo são Nav 1.2 e 1.6 (TTX-s). O propofol parece atuar sobre os canais TTX-s, visto que não houve efeito de adição entre a toxina e o anestésico.

Durante o potencial de ação, a abertura dos canais para sódio leva à

despolarização da membrana que por sua vez induz à abertura de canais para cálcio voltagem dependente com consequente aumento da concentração intracelular deste íon. Uma vez que os dados obtidos mostraram que o influxo de Na^+ foi alterado pelo anestésico propofol, optou-se por avaliar a possível interferência tanto do propofol, quanto do etomidato na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Os grupos tratados com etomidato nas concentrações de 10, 30 e 100 μM apresentaram uma redução, dose-dependente, dos níveis de cálcio intracelular. Estudos de binding, com um ligante para canais de cálcio do tipo $-L$, revelam que o etomidato atua nesses canais em concentrações clinicamente relevantes (Lingamanemi e Hemminings, 2003 e Hirota e Lambert, 1996). O propilenoglicol não influenciou o influxo de íons de Ca^{2+} , apesar de haverem relatos que esse composto seja capaz de aumentar o influxo de cálcio via CCSV tipo $-N$ e $-L$ (Hattori e cols, 1999).

Da mesma forma, o propofol foi capaz de reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de maneira dose-dependente. O propofol, em culturas de neurônios corticais, reduz seletivamente as correntes de Ca^{2+} tipo $-L$, que representa 25% da condutância total do Ca^{2+} (Martella e cols, 2005). Foram encontrados vários estudos que descrevem a inibição do propofol nos canais do tipo $-L$ (Liu e cols 2008, Martella e cols, 2005; Shigemura e cols, 1999).

Assim, com os resultados obtidos sobre o influxo de sódio e cálcio, sugere-se que a redução da concentração de glutamato do meio extracelular após o insulto isquêmico seja mediada pela ação do etomidato e propofol sobre os mecanismos envolvidos na excitose de neurotransmissores.

Existem vários subtipos de CCSV que permitem o influxo de Ca^{2+} , são eles: $L-$, $T-$, $N-$, $R-$, $P-$, $Q-$ (Gadian e cols, 1987). Há um consenso que na transmissão sináptica, os principais subtipos envolvidos são os canais do tipo $-N$ e $-P/Q$. Já que, tanto o etomidato, quanto o propofol foram capazes de alterar o influxo de cálcio, avaliou-se a ação desses anestésicos nos subtipos de CCSV com maior expressão no hipocampo.

O etomidato na concentração de 30 μM foi capaz de reduzir os níveis de cálcio tanto nas células expressando isoladamente canais do tipo $-N$, quanto $-P/Q$, mas com uma maior eficácia sobre os canais do tipo $-N$. Talvez esse possa ser o motivo da maior neuroproteção observada do etomidato sobre a medula espinhal usando o mesmo modelo de isquemia *in vitro* (dados ainda não publicados, Mário Lavor). O único estudo que correlaciona o etomidato com os canais do subtipo $-N$, diz que este anestésico não atua sobre o sítio de ligação da toxina MVIIA, que é um ligante de canais do tipo $-N$ (Hirota e cols, 2000). Na base de pesquisa da Pubmed, não foram encontrados artigos que correlacionem o etomidato com canais do tipo $-P/Q$. O fato do etomidato não

deslocar o ligante MVIIA não pode excluir a ação do etomidato sobre os canais do tipo $-N$, já que esse anestésico possa se ligar em outra região do canal.

O propofol na concentração de 30 μM também diminuiu os níveis de cálcio nos canais avaliados acima. Mas diferentemente do etomidato, ele apresentou praticamente a mesma inibição tanto no canal $-N$, quanto no canal $-P/Q$. Há uma grande quantidade de artigos que descrevem o efeito do propofol inibindo os canais do tipo $-L$ nos tecidos cardíaco (Ruijter e cols, 2002; Liu e cols, 2008), principalmente, e cerebral (Martella e cols, 2005; Lingamanemi e cols, 2003), em detrimento aos canais avaliados neste estudo.

A ação do propofol sobre os canais do tipo $-P/Q$ foram descritas em três estudos. Confirmando os achados do presente trabalho, em um estudo de “binding”, utilizando-se os ligantes Aga IVA e MVIIC, verificou-se que o propofol em uma concentração clinicamente aceitável (concentração plasmática de 28 μM) foi capaz de reduzir a liberação de dopamina e norepinefrina mediada pelos canais $-P/Q$ (Hirota e cols, 2000). Por outro lado, os outros estudos falharam em correlacionar a redução do influxo de cálcio com os canais $-P/Q$. Martella e cols (2005) mostraram, através de eletrofisiologia, que os canais de cálcio do tipo $-L$ são alvos preferenciais do propofol, com ação relativamente pequena sobre os canais $-P/Q$ e $-N$. Em outro estudo, também utilizado a técnica de eletrofisiologia, o propofol não foi capaz de inibir a corrente de cálcio mediada pelos canais do tipo $-P$ (Hall e cols, 1994). Apesar de não ter estabelecido uma ação do propofol sobre os canais do tipo $-P/Q$, o estudo conduzido por Martella e cols também não excluiu a ação do propofol sobre esses canais. Já o estudo realizado por Hall e cols, a concentração de propofol avaliada (2 μM) foi bem menor do que a avaliada pelo estudo proposto (30 μM).

Da mesma forma, a ação do propofol sobre os canais do tipo $-N$ não está bem caracterizada. Corroborando os achados, em um estudo utilizando ratos knockout dos canais do tipo $-N$, a sensibilidade dos animais à anestesia de propofol encontra-se significativamente reduzida em relação aos animais selvagens, sugerindo uma neutralização da anestesia nos animais manipulados geneticamente (Takei e cols, 2003). O outro trabalho foi realizado por Martella e cols (2005) que descreve uma pequena ação do propofol sobre os canais do tipo $-N$.

5.3 Etapa 3: Efeito dos anestésicos Etomidato e Propofol sobre o estresse oxidativo

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos são conhecidos desde o final do século XIX (Lorrain-Smith, 1899). Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como lipídeos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, nucleotídeos e tióis, mediada por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, conhecidas genericamente como radicais livres (Giller, Sigler, 1995; Romero *et al.*, 1998).

O estresse oxidativo é considerado um fator-chave deletério na isquemia e reperfusão cerebral. O mau funcionamento da cadeia respiratória oxidativa nas mitocôndrias, combinada à ativação de oxidases citoplasmáticas geram uma explosão de espécies reativas de oxigênio. Os sistemas de detoxificação das células, formados pelas enzimas e moléculas antioxidantes, não conseguem neutralizar todo o conteúdo de EROs gerado pelo processo isquêmico. Como resultado, o estresse oxidativo contribui diretamente para a necrose e apoptose através da ativação de inúmeras vias no tecido isquêmico (Manzanero e cols, 2012).

A lipoperoxidação é um dos eventos finais do estresse oxidativo, que já está bem estabelecido na lesão isquemia/reperfusão. Esse processo leva a modificações na membrana plasmática como: alteração da fluidez, aumento da permeabilidade e redução da atividade ATPase, levando à injúria celular (Chen e cols, 2011).

Nos grupos tratados com etomidato e propofol foi observada a redução da geração de EROs e na peroxidação lipídica em relação ao grupo isquemia/reperfusão. O atenuamento da produção de EROs está diretamente relacionado com o decréscimo da peroxidação lipídica. A ação do etomidato sobre o dano gerado pelo estresse oxidativo já foi descrita em outros tecidos, como na medula, onde foi encontrada uma possível atividade antioxidante com redução da produção de radicais livres e peroxidação lipídica (Cayli e cols, 2006; Yagmurdur e cols, 2004 e Ergün e cols, 2010). No caso do propofol, Ozkan e cols (2012) demonstraram que este anestésico aumentou a capacidade antioxidante contra a lesão isquêmica no músculo da tíbia, promovida pelo torniquete da artéria femoral. Em outro trabalho, o propofol conseguiu atenuar os danos promovidos pelo peróxido de hidrogênio em cultura de células endoteliais umbilicais humanas (Chen e cols, 2010). Yamaguchi e cols (2000) verificaram que o propofol diminuiu a morte neuronal de células da região CA1 do hipocampo, pela prevenção da lipoperoxidação. Portanto, os dados obtidos na avaliação sobre a geração de EROs e

lipoperoxidação vão ao encontro dos resultados encontrados na literatura. Com base nesses resultados, sugere-se que ambos anestésicos foram capazes de reduzir a lesão gerada pelo estresse oxidativo.

A célula possui mecanismos para combater o estresse oxidativo em três níveis: regulando a geração EROs (Groeger et al, 2009;.. Li et al, 2011), eliminando os EROs, com a ajuda de enzimas e moléculas de neutralização (Watson et al., 2012), e por mecanismos de reparação de proteínas, lipídios ou de DNA que foram afetados pelo estresse oxidativo (Liu et al, 2011; Gao et al, 2012).

Uma vez que o etomidato e propofol foram capazes de alterar o status de oxidação da célula, decidiu-se verificar se esses anestésicos medeiam seus efeitos eliminando os EROs através do sistema antioxidante endógeno.

O sistema antioxidante endógeno é composto, principalmente, pelas enzimas SOD, catalase e glutathione peroxidase. Essas enzimas exercem um importante papel mantendo oxidantes em baixas concentrações, garantindo, assim, a homeostase redox no tecido (Chen e cols, 2011). Além das enzimas antioxidantes, existem moléculas presentes no tecido, como glutathione, ácido ascórbico e vitamina E que são capazes de escanear os radicais livres do sistema (Chan, 2001 e 1996).

A SOD é a primeira enzima da cascata de detoxificação, transformando o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Já foram identificadas três tipos de SOD: a citoplasmática (SOD1), mitocondrial (SOD2) e extracelular (SOD3) (M. Schäfer e cols, 2008). A SOD1 é encontrada no citoplasma e utiliza os íons cobre e zinco como cofatores, já a SOD2 é expressa na mitocôndria e necessita do íon magnésio para exercer a sua atividade catalítica. A SOD3 possui uma localização menos específica, sendo encontrada no espaço extracelular e no fluido e vasos cerebrais, os cofatores usados são o cobre e o zinco.

Durante o período isquemia/reperfusão alguns processos deletérios ocorrem como: a superprodução de oxidantes, a inativação dos sistemas de detoxificação, bem o consumo de oxidantes (Chen e cols, 2011). No teste realizado para medir a atividade da SOD, como era esperado, o grupo isquemia/reperfusão apresentou menor atividade enzimática; enquanto o etomidato foi capaz de reestabelecer os níveis desta enzima ao nível encontrado no grupo controle. Há poucos trabalhos avaliando a atividade antioxidante do etomidato. Em um estudo em preparações de músculo esquelético, doses sub-anestésicas de etomidato reduziu o conteúdo de MDA, aumentou a atividade da GPx, mas não alterou a atividade da SOD (Ergün e cols, 2010). A diferença do

resultado encontrado sobre a atividade da SOD pode ser decorrente das diferentes concentrações de etomidato utilizada em cada trabalho. Muitos trabalhos, especialmente estudos que avaliaram a superexpressão da SOD em animais knockout para essa enzima, têm provado que a SOD está ativamente envolvida na neuroproteção após a isquemia cerebral (Chen e cols, 2011). A administração da SOD tem sido usada extensivamente para reduzir a lesão isquemia/reperfusão, mas, infelizmente, os investigadores têm obtido tanto resultados positivos, como negativos (Chan e cols, 1993). Os maiores problemas relacionados à terapia com a SOD é a curta meia-vida na circulação sanguínea, em torno de 6 minutos, e a dificuldade dessa enzima atravessar a barreira hemato-encefálica (Chan, 1996). Entretanto, modificações na enzima que aumentam a sua meia vida, como a conjugação ao propilenoglicol têm sido usadas com sucesso para reduzir o volume infarto em ratos que foram submetidos à isquemia cerebral focal (He e cols, 1993). O etomidato torna-se uma boa alternativa para aumentar a atividade antioxidante desta enzima, pois ele é capaz de aumentar a atividade da SOD endógena e ao mesmo tempo não encontra as dificuldades farmacocinéticas da administração desta enzima.

O propofol, nas duas concentrações avaliadas, não foi capaz de alterar a atividade da SOD. De fato, o propofol reduziu o conteúdo de MDA, mas não apresentou diferença significativa desta enzima entre o grupo que sofreu isquemia e tratado com o propofol (Dogan e cols, 2010). Em um estudo promovido por Ergun e cols (2010), o propofol reduziu a atividade da SOD no músculo esquelético. Sendo assim, a redução do conteúdo de EROs observado no tratamento com propofol não está associado à atividade antioxidante da SOD.

A catalase, juntamente com a GPx, catalisa a reação da transformação do peróxido de hidrogênio em água. Essa enzima, como a SOD, faz parte do sistema antioxidante da célula, com isso o aumento na atividade dessa enzima contribui para a redução da quantidade de EROs na célula.

O etomidato foi capaz de aumentar de forma expressiva a atividade da catalase. Resultado semelhante foi encontrado no estudo conduzido por Dogan e cols (2010), onde certificaram que o etomidato produziu o maior nível de atividade da CAT, quando comparado a grupos tratados com propofol, tiopental e cetamina. O propofol não alterou a atividade da CAT, mantendo-a no nível do grupo isquemiado. Ergun e cols (2010) já haviam observado que o propofol reduz a quantidade de MDA, mas não é capaz de modular a atividade da catalase no músculo esquelético. Esse resultado do

propofol sobre a catalase também foi descrito por Şekeroğlu e cols (2012) em amostras de sangue.

A glutathione possui várias funções fisiológicas, incluindo o envolvimento no sistema de defesa contra espécies reativas, devido à manutenção do potencial REDOX, garantindo que os grupos sulfidril das proteínas permaneçam na sua forma reduzida. Existem várias evidências que a glutathione possui um importante papel na detoxificação do cérebro (Dringen e cols, 2000). Em um estudo promovido por Mizui e cols em 1992 foi demonstrado que a redução do conteúdo de glutathione no cérebro, torna-o mais vulnerável ao aumento das EROs decorrente do processo de isquemia. A função antioxidante da glutathione é mediada pelo grupamento tiol, que se torna oxidado quando a GSH reduz moléculas alvo. A importância do GSH como um tampão redox celular é sustentado pelo fato que esta molécula possui um baixo potencial REDOX e é encontrada em todas as células em altas concentrações (10-15 mM) (revisado por Marí e cols, 2009).

Na quantificação do conteúdo GSH das amostras deste trabalho ocorreu uma redução deste tripeptídeo no grupo isquemiado sem tratamento em relação ao grupo controle. Esse resultado já era esperado devido ao consumo das moléculas antioxidantes no processo de estresse oxidativo (Chen e cols, 2011). O etomidato e o propofol conseguiram preservar o conteúdo de GSH da célula, mantendo a homeostasia do sistema REDOX da célula. O resultado encontrado no tratamento com o propofol foi descrito em outros modelos experimentais, corroborando o achado deste estudo. Em um trabalho promovido por Şekeroğlu e cols (2012), o propofol foi capaz de preservar os níveis de glutathione e da GPx em amostras de sangue, mas não afetou a atividade da SOD e catalase. O propofol aumentou significativamente os níveis de GSH no fígado e a atividade das enzimas do sistema glutathione (Adaramoye e cols, 2013).

O peróxido de hidrogênio é extremamente tóxico para o tecido cerebral, levando à morte por apoptose. Várias evidências demonstraram que a defesa neuronal contra essa molécula é mediada pelo sistema glutathione, principalmente pela enzima GPx e com o auxílio da classe de GST com atividade de peroxidase (Dringen e cols, 2000). A GPx também atua sobre moléculas orgânicas oxidadas, conjugando-as com o GSH. Da mesma forma, algumas GSTs possuem a capacidade de conjugar GSH a peróxidos orgânicos, gerando GSSG e o respectivo álcool (Halliwell e cols, 2007). Como produto da reação de redução da GPx e GST tem a formação da GSSG. A redução desta molécula a GSH é realizada pela GR, permitindo assim a reciclagem da

glutathione, sempre fornecendo a glutathione na sua forma reduzida para dar continuidade ao ciclo de detoxificação. Sendo assim, a GR desempenha um papel crucial na manutenção do ambiente reduzido da célula e no combate do estresse oxidativo (Berkholz e cols, 2008).

Tanto o propofol, quanto o etomidato conseguiram modular positivamente a atividade da GPx em relação ao grupo isquemiado. Esses anestésicos foram capazes de reestabelecer essas enzimas ao nível do controle. Como citado anteriormente Ergun (2010) descreveu a ação desses anestésicos sobre aumento da atividade da GPx em dois estudos realizados na isquemia de músculo esquelético. Şekeroğlu (2012) e Adaramoye (2013) também observaram o aumento da GPx em grupos tratados com o propofol. Portanto, os dados encontrados foram confirmados em outros estudos.

O etomidato reestabeleceu a atividade da GR ao nível do controle, mas não foi capaz de alterar a atividade da GST. Já o propofol aumentou os níveis de GST, mas somente na concentração de 10 µM foi capaz de elevar a atividade da GR aos níveis do controle.

Como foi observado, o propofol não atua sobre a CAT e nem a SOD, mas ele possui a mesma capacidade em reduzir o conteúdo EROs do tecido que o etomidato. Tendo em vista que propofol possui estrutura química semelhante ao núcleo ativo de substâncias antioxidantes, como a vitamina E (DeLa Cruz e cols, 1998), cogitou-se a possibilidade desta molécula possuir atividade antioxidante intrínseca. Essa hipótese foi confirmada por este estudo. O propofol possui um perfil de escaneamento de EROs muito próximo ao do ácido ascórbico (controle positivo), que uma molécula antioxidante já bem estudada. Com isso, conclui-se que um dos mecanismos adotados pelo propofol para reduzir a quantidade de EROs é a ligação de sua molécula com os radicais livres, neutralizando-os.

Associando os resultados encontrados na avaliação desses anestésicos no estresse oxidativo, observa-se que ambos os anestésicos foram capazes de reduzir o dano oxidativo causado pela isquemia/reperfusão. Porém, os resultados indicam que existam algumas diferenças nos mecanismos de ação que envolve a atenuação do estresse oxidativo para cada anestésico. O etomidato parece agir aumentando o sistema antioxidante da célula, através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase, glutathione peroxidase e redutase. Já o propofol, reduz a geração de EROs através da modulação positiva do sistema glutathione e através da sua atividade antioxidante intrínseca.

6.CONCLUSÕES

Baseado nas evidências experimentais apresentadas é possível concluir que:

1. O etomidato e o propofol apresentaram efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo submetidas ao insulto isquêmico de 20 minutos e 4 horas de reperfusão.
2. O etomidato e o propofol reduziram a liberação de glutamato e enzimas citosólicas (LDH), no conteúdo extracelular. A menor quantidade de glutamato extracelular pode ser um dos mecanismos responsáveis pela neuroproteção desses anestésicos.
3. O propofol reduziu o influxo de sódio e cálcio em sinaptossomas de maneira dose dependente.
4. O propofol atuou de maneira semelhante ao bloqueador de canal de sódio, tetrodotoxina, pois não observado efeito aditivo no influxo de sódio. Indicando que o propofol atue nos canais de sódio sensíveis à tetrodoxina.
5. O etomidato reduziu apenas o influxo de cálcio, não alterou o influxo de sódio, não atuando, assim sobre os canais de sódio sensíveis à voltagem.
6. O etomidato diminui o influxo de cálcio em células transfectadas isoladamente com os subtipos de canais de cálcio sensíveis à voltagem – N e – P/Q. Atuando como bloqueador desses canais, em maior extensão no subtipo – N.
7. O propofol diminui o influxo de cálcio em células transfectadas isoladamente com os subtipos de canais de cálcio sensíveis à voltagem – N e – P/Q. Atuando como bloqueador desses canais, na mesma extensão nos subtipos – N e – P/Q.
8. As reduções dos influxos dos íons sódio e cálcio através do bloqueio pelo propofol e etomidato podem estar relacionadas à menor quantidade de glutamato no meio extracelular.
9. O etomidato e propofol foram capazes de diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas após lesão isquemia/reperfusão.
10. O etomidato e propofol foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica, atenuando a lesão de estresse oxidativo. Essa redução está diretamente ligada com a menor quantidade de espécies reativas de oxigênio.
11. O etomidato foi capaz de modular positivamente a atividade/expressão das enzimas superóxido dismutase e catalase. Tornando o sistema de detoxificação celular mais eficiente e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de EROs.

12. O propofol não altera a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Sendo assim, a redução das EROs promovida por esse anestésico não está relacionada a maior atividade dessas enzimas.
13. O propofol foi capaz de modular positivamente a atividade/expressão das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase (concentração de 10 μ M) e glutathione-S-transferase. Reduzindo a quantidade de espécies reativas de oxigênio no tecido.
14. O etomidato foi capaz de modular positivamente a atividade/expressão das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase. Porém, o etomidato não modificou a atividade/expressão da glutathione-S-transferase. Os aumentos da GPx, GR em conjunto com o aumento da SOD e catalase parecem ser os responsáveis pela redução da espécies reativas de oxigênio no tecido.
15. O propofol possui atividade antioxidante *per se*, ligando-se diretamente aos radicais livres e neutralizando-os. O grupo fenólico presente na molécula pode ser o responsável por essa característica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acquaviva R., Campisi A., Murabito P., Raciti G., Avola R., Mangiameli S., Musumeci I., Barcellona ML., Vanella A., Volti G. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes. *Anesthesiology* 2004; 101:1363-71.
2. Adembri C., Venturi L., Tani A., Chiarugi A., Gramigni E., Cozzi A., Pancani T., Gudino RA., Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia. *Anesthesiology* 2007; 104:80-9.
3. Albertson TE, Walby WF, Stark LG, Joy RM. 1996. The effect of propofol on CA1 pyramidal cell excitability and GABAA-mediated inhibition in the rat hippocampal slice. *Life Sci.* 1996 May 24;58(26):2397-407.
4. Alekseenko AV, Lemeshchenko VV, Pekun TG, Waseem TV, Fedorovich SV. 2012. Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. *Neurosci Lett*, Apr 4;513(2):238-42.
5. Alexandrova, M.L.; Bochev, P.G. 2005. Oxidative stress during the chronic phase of stroke. *Free Rad. Biol. Med*, 39: 297-316.
6. Amadeu ME, Abramowicz AE, Chambers G, Cottrell JE, Kass IS. 1998. Etomidate does not alter recovery after anoxia of evoked population spikes recorded from the CA1 region of rat hippocampal slices. *Anesthesiology*. 1998 May;88(5):1274-80.
7. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 1;90(17):7915-22. Review.
8. Adaramoye OA, Akinwonmi O, Akanni O. 2013. Effects of propofol, a sedative-hypnotic drug, on the lipid profile, antioxidant indices, and cardiovascular marker enzymes in wistar rats. *ISRN Pharmacol*. Jun 6;2013:230261.
9. Asahi T, Hirota K, Sasaki R, et al. Intravenous anesthetics are more effective

than volatile anesthetics on inhibitory pathways en rat hippocampal CA1. *Anesth Analg* 2006; 102:772-778.

10. Bayona N.A., gelb A., Jiang Z., Wilson J., Urquhart BL., Cechetto D. 2004. Propofol neuroprotection in cerebral ischemia and its effects on low-molecular-weight antioxidants and skilles motor tasks. *Anesthesiology*; 100:151-9.

11. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1620– 1624, 1990.

12. Berkholz DS, Faber HR, Savvides SN, Karplus PA. 2008. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *J Mol Biol.* 3;382(2):371-84.

13. Bondy, S.C., and LeBel, CP. 1993. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radie. Biol. Med.* 14, 633-642.

14. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

15. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25–30

16. Brouns, R., Deyn, P.P. De. 2009. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 11: 483-495.

17. Burnashev N, Zhou Z, Neher E et al (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485(Pt 2):403–418.

18. Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI. 2009. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders. *Neurotherapeutics*;

6(1):94-107. Review.

19. Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388:182–186.

20. Cayli SR, Ates O, Karadag N, Altinoz E, Yucel N, Yologlu S, Kocak A, Cakir CO. 2006. Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci.* Jun;24(4):233-9.

21. Chan PH, Kinouchi H, Epstein CJ, Carlson E, Chen SF, Imaizumi S, Yang GY. 1993. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: reduction of edema and infarction in transgenic mice following focal cerebral ischemia. *Prog Brain Res.* 1993;96:97-104.

22. Chan PH. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*, Jun; 27(6): 1124-9. Review.

23. Chan PH. 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 2–14.

24. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*; 415: 793–798.

25. Chen H., Yoshioka H., Kim G., Jung J. E., Okami N., Sakata H., Maier C. M., Narasimhan P., Goeders C. E., and Chan P. H. 2011. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 8.

26. Chen J, Gu Y, Shao Z, Luo J, Tan Z. 2010. Propofol protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2010 Jun;339(1-2):43-54.

27. Chen, Z.L. and Strickland, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. (1997) *Cell* 91, 917–925.
28. Cheng, Y., and Sun, A.Y. 1994. Oxidative mechanisms involved in kainate-induced cytotoxicity in cortical neurons. *Neurochem. Res.* 19, 1557-1564.
29. Chittajallu R, Vignes M, Dev KK et al (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379:78–81.
30. Circu,ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.*, Mar 15;48(6):749-62. Review.
31. Conti, F. & Weinber, R. J. Shaping. 1999. Excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci*, v. 22(10), p. 451-8
32. Crack, P.J., Taylor, J.M. 2005. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 38: 1433–1444.,
33. Danbolt, N.C. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65:1-105.
34. Davis DW, Mans AM, Biebuyck JF, Hawkins RA. 1986. Regional brain glucose utilization in rats during etomidate anesthesia. *Anesthesiology*. 1986 Jun;64(6):751-7
35. Dingledine, R., Borges, K., \Bowie, D., Traynelis, SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51: 7-61.
36. De Flora A, Franco L, Guida L, Bruzzone S, Zocchi E. Extracellular CD-38-catalyzed synthesis and intracellular (Ca²⁺)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem. Biophys.*, v.28(1), p.45-62, 1998.
37. De La Cruz JP, Villalobos MA, Sedeño G, Sánchez De La Cuesta F. 1998. Effect of propofol on oxidative stress in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. *Brain Res.* 1998 Jul 27;800(1):136-44.

38. De Robertis E, Rodriguez de Lores Arnaiz G, Pellegrino de Iraldi A.1962. Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. *Nature*. 1962 May 26;194:794-5.
39. Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, A. 1999. Pathobiology of ischemic stroke: na integrated view. *Trens in neurosciense*, 22, 9: 391-396.
40. Donnan GA, Fisher M, Macleod M,Davis SM. 2008. *Stroke*. *Lancet*; 371: 1612–23.
41. Dogan Z, Yuzbasioglu MF, Kurutas EB, Yildiz H, Coskuner I, Senoglu N, Oksuz H, Bülbüloglu E. 2010. Thiopental improves renal ischemia-reperfusion injury. *Ren Fail*. Jan;32(3):391-5.
42. Dringen, R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. Dec;62(6):649-71. Review
43. Dringen, R. 2000. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. Aug;267(16):4903.
44. Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82:47-95.
45. Drummond JC, Cole DJ, Patel PM, Reynolds LW. 1995. Focal cerebral ischemia during anesthesia with etomidate, isoflurane, or thiopental: a comparison of the extent of cerebral injury. *Neurosurgery*. 1995 Oct;37(4):742-8
46. Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., et al. 1995. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci*. 15, 6377-6388.
47. Dunkley PR, Jarvie PE, Heath JW, Kidd GJ, Rostas JA. (1986) A rapid method

for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res. Apr* 30;372(1):115-29.

48. Elliot, E.M, Malouf, A.T. and Catterall, W.A. 1995. Role of calcium channel subtypes in calcium transients in hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.*, 15.

49. Engelhard K., C. Werner, Hoffman WE et al. The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg* 2003; 97:1155-61.6433–6444.

50. Engelhard K., C. Werner, E. Eberspa

cher, M. Pape, U. Stegemann, K. Kellermann, R. Hollweck, P. Hutzler and E. Kochs, Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation, *Anesthesiology* 101 (2004), pp. 912–917.

52. Ergün Y, Darendeli S, Imrek S, Kiliç M, Oksüz H. 2010. The comparison of the effects of anesthetic doses of ketamine, propofol, and etomidate on ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010 Apr;24(2):215-22.

53. Evans MD, Cooke MS. 2004 . Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays.* May;26(5):533-42. Review

54. Faden AI, O'Leary DM, Fan L, Bao W, Mullins PG, Movsesyan VA. 2001. Selective blockade of the mGluR1 receptor reduces traumatic neuronal injury in vitro and improves Outcome after brain trauma. *Exp Neurol*, Feb;167(2):435-44.

55. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*; 375(6532):599-603.

56. Feuerstein, G. Z. and X. Wang. 2000. "Animal models of stroke." *Mol.Med.Today* 6, 3: 133-135.

57. Forman, SA. 2011. *Clinical and Molecular Pharmacology of Etomidate.*

Anesthesiology; 114: 695–707.

58. Frandsen, A., Schousboe, A. Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3- (3-hydroxy-5 methylisoxazols-4-propionate) and kainate in cultured cerebral cortical neurons. PNAS, v. 89(7), p.2590-2594, 1992.

59. Fragen RJ, Shanks CA, Molteni A, Avram MJ. 1984. Effects of etomidate on hormonal responses to surgical stress. ANESTHESIOLOGY; 61:652– 6.

60. Frenkel C, Weckbecker K, Wartenberg HC, Duch DS, Urban BW. 1998. Blocking effects of the anaesthetic etomidate on human brain sodium channels. Neurosci Lett. 1998 Jun 19;249(2-3):131-4.

61. Furukawa, K. et al. : The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. (1997) J. Neurosci. 17, 8178–8186.

62. Gadian DG, Frackowiak RS, Crockard HA, Proctor E, Allen K, Williams SR, Russell RW. 1987. Acute cerebral ischaemia: concurrent changes in cerebral blood flow, energy metabolites, pH, and lactate measured with hydrogen clearance and ³¹P and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. I. Methodology. J Cereb Blood Flow Metab. 1987 Apr;7(2):199-206.

63. Gao, H., Yang, W., Qi, Z., Lu, L., Duan, C., Zhao, C., Yang, H., 2012. DJ-1 Protects dopaminergic neurons against rotenone-induced apoptosis by enhancing ERK-dependent mitophagy. J. Mol. Biol. 423, 232–248.

64. Gert, TH., Hautvast, R. W. M., DE Jongstone, M. J., e Korf, J. 1997. Neuroanatomy of cardiac activity regulating circuitry; a transneuronal viral tracing study in the rat., Eur. J. Neuroscience, 8: 101-113.

65. Goldberg M.P., U. Strasser, L.L. Dugan, Techniques for assessing

neuroprotective drugs in vitro, in: A.R. Green, A.J. Cross Eds. 1997. Neuroprotective Agents and Cerebral Ischemia, Academic Press, San Diego, CA, pp. 69–93.

66. Giller, G., Singler, K. 1995. Oxidative stress and living cells. *Folia. Microbiol.*, v.40, n.2, p.131-152.

67. Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and systemic mechanisms of general anesthesia: “the multiple mechanisms concept. *Curr Opin Anaesthesiol* 2005, 18:386-391.

68. Gray EG, Whittaker VP. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat.* Jan;96:79-88.

69. Groeger, G., Mackey, A.M., Pettigrew, C.A., Bhatt, L., Cotter, T.G., 2009. Stress-induced activation of Nox contributes to cell survival signalling via production of hydrogen peroxide. *J. Neurochem.* 109, 1544–1554.

70. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.

71. Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I, Borner C. 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene.* 2000 May 4;19(19):2286-95

72. Hall AC, Lieb WR, Franks NP. 1994. Insensitivity of P-type calcium channels to inhalational and intravenous general anesthetics. *Anesthesiology.* 1994 Jul;81(1):117-23.

73. Hallenbeck, JM., Dutka, A.J. 1990. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch. Neurol,* 47, 11: 1245-54.

74. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York. 4th edn, 2007 Aebi H, Catalase in vitro. *Methods*

Enzymol, 105:121–126.

75. Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J Neurochem.* Jun;97(6):1634-58. Review

76. Harman F, Hasturk AE, Yaman M, Arca T, Kilinc K, Sargon MF, Kaptanoglu E. 2012. Neuroprotective effects of propofol, thiopental, etomidate, and midazolam in fetal rat brain in ischemia-reperfusion model. *Childs Nerv Syst.*, Jul;28(7):1055-62. doi: 10.1007/s00381-012-1782-0.

77. Hattori T, Maehashi H. 1999. Facilitation of calcium influx by propylene glycol through the voltage-dependent calcium channels in PC12 cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1999;105(3):179-84.

78. He, YY, Hsu CY, Ezrin AM, Miller MS.1993. Polyethylene glycol-conjugatedsuperoxide dismutase in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.*1993Jul;265(1 Pt 2):H252-6.

79. Hirota K, Lambert DG.. 1996. I.v. anaesthetic agents inhibit dihydropyridine binding to L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels in rat cerebrocortical membranes. *Br J Anaesth.* 1996 Aug;77(2):248-53.

80. Hirota K, Lambert DG. 2000. Effects of intravenous and local anesthetic agents on omega-conotoxin MVII(A) binding to rat cerebrocortex. *Can J Anaesth.* 2000 May;47(5):467-70.

81. Hirota K, Kudo M, Kudo T, Matsuki A, Lambert DG. 2000. Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K⁺-evoked norepinephrine and dopamine release from rat striatal slices: possible involvement of P/Q-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Br J Anaesth.* 2000 Dec;85(6):874-80.

82. Hollmann, M., Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci,* 17: 31-108.

83. Huang, Chun-Fa, Liu, Shing-Hwa, Lin-Shiau, Shoei-Yn. (2012) Pyrrolidine dithiocarbamate augments Hg²⁺-mediated induction of macrophage cell death via oxidative stress-induced apoptosis and necrosis signaling pathways. *Toxicology Letters*, Article in Press.
84. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:33–50.
85. Igelmund, P., Zhao, Y.Q. and Heinemann, U. 1996. Effects of T-type, L-type, N-type, P-type and Q-type calcium channel blockers on stimulus-induced pre- and postsynaptic calcium influxes in rat hippocampal slices, *Exp. Brain. Res.*, 109: 22–32.
86. Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M. 1992. Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett.*; 313: 34–38.
87. Karim F, Wang CC, Gereau RW 4th. 2001. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *J Neurosci*; 21(11):3771-9.
88. Katz B. (1969). The release of neural transmitter substances . C.C Thomas, Springfield. pp 1-55.
89. Kawaguchi M., Furuya H., Patel P.M. Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J Anesth* (2005) 19:150-156.
90. Kay B: Some experience of the use of etomidate in children. 1976. *Acta Anaesthesiol Belg*; 27(suppl):86 –92
91. Kay B, Rolly G: Total intravenous anesthesia with etomidate. Some observations in adults. 1977. *Acta Anaesthesiol Belg*; 28:157– 64.
92. Koerner IP, Brambrink AM. Brain protection by anesthetic agents. 2006. *Curr Opin Anaesthesiol*. Oct;19(5):481-6. Review.

93. Koike, T., Martin, D.P., Johnson, F.M. JR. Role of Ca²⁺-channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic factor deprivation: evidence that levels of internal Ca²⁺ determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *PNAS*, v.86(16), p. 6421-6425, 1989.
94. Komuro, H., Rakic, P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260: 95-97.
95. Kontos, H.A. 2001. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke*, 32: 2712-6.
96. Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, et al. 1992. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*; 358: 36-41.
97. Lai J., Porreca F., Hunter J. C. and Gold M. S. (2004) Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 371-397.
98. Lau, A., Tymianski, M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Arch- Eur J Physiol* 460(2):525-42.
99. Lee H, Jang YH, Lee SR. Protective effect of propofol against kainic acid-induced lipid peroxidation in mouse brain homogenates: comparison with trolox and melatonin. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2005 Jul;17(3):144-8.
100. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.*, Mar;24(2):203-14.
101. Lerma J. 2003. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 4:481-495.
102. Levy LM, Warr O, Attwell D. 1998. Stoichiometry of the glial glutamate

transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci*; 18(23):9620-8.

103. Li, Z., Ji, G., Neugebauer, V., 2011. Mitochondrial reactive oxygen species are activated by mGluR5 through IP3 and activate ERK and PKA to increase excitability of amygdala neurons and pain behavior. *J. Neurosci.* 31, 1114–1127. 535.

104. Lingamaneni R, Hemmings HC Jr. 2003. Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA(A) receptors. *Br J Anaesth.* 2003 Feb;90(2):199-211.

105. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1431-568.

106. Liu, D., Croteau, D.L., Souza-Pinto, N., Pitta, M., Tian, J., Wu, C., Jiang, H., Mustafa, K., Keijzers, G., Bohr, V.A., Mattson, M.P., 2011. Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 680–692.

107. Liu PK, Hsu CY, Dizdaroglu M, Floyd RA, Kow YW, Karakaya A, Rabow LE, Cui JK. 1996. Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurosci.* Nov 1;16(21):6795-806.

108. Liu Y., T.P. Wong, M. Aarts, A. Rooyackers, L. Liu, T.W. Laiet *al.* 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27: 2846–2857.

109. Liu YC, Wang YJ, Wu SN. 2008. The mechanisms of propofol-induced block on ion currents in differentiated H9c2 cardiac cells. *Eur J Pharmacol.* 2008 Aug 20;590(1-3):93-8.

110. Lorrain-Smith, J. 1899. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J. Physiol.*, v.24, p.19-25.

111. Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. 2012. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int.* 2012 Nov 29, pii: S0197-0186 (12) 00370-1.
112. Massensini AR, Moraes-Santos T, Gomez MV, Romano-Silva MA. 1998. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. *Neuropharmacology*; 37, 3:289-97
113. Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47: 469-474.
114. Martella G, De Persis C, Bonsi P, Natoli S, Cuomo D, Bernardi G, Calabresi P, Pisani A . 2005. Inhibition of persistent sodium current fraction and voltage-gated L-type calcium current by propofol in cortical neurons: implications for its antiepileptic activity. *Epilepsia.* 2005 May;46(5):624-35.
115. Martin, RL. Lloyd, H.G. and Cowan, A. I. 1994. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 251-257.
116. Masters, BS. 1994. Nitric oxide synthases: why so complex? *Annu Rev Nutr*, 14:131-45.
117. Matthias Schäfer, Sabine Werner. 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research* 58, 165–171.
118. McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-d-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev.* 1994; 74: 723–760.
119. McCullough L.D. and P.D. Hurn. 2003. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view, *Trends Endocrinol. Metab.* 14: 228–235.
120. McDonald, J.W., Johnston, M.V. 1990. Physiological and pathophysiological

roles of excitatory amino acid during central nervous development. *Brain Res Rev*, 15: 41-70.

121. Meldrum BS. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*. 2000 Apr;130(4S Suppl):1007S-15S. Review.

122. Milde LN, Milde JH, Michenfelder JD. 1985. Cerebral functional, metabolic, and hemodynamic effects of etomidate in dogs. *Anesthesiology*. 1985 Oct;63(4):371-7.

123. Mizui, T., Kinouchi, H., Chan, P.H., 1992. Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am. J. Physiol.* 262, H313±H317.

124. Monette R, Small DL, Mealing G, Morley P. 1998. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res. Brain Res Protoc* 2:99–108.

125. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 1992; 256: 1217–1221.

126. Mylonas C, Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 1999 May-Jun;13(3):295-309.

127. Murray CJ, Lopez AD. 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349:1269–76.

128. Nakanishi, S., Masu, M. 1994. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23: 319-48.

129. Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. 1987. Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 49:50–57.

130. Nicholls DG. (1993) The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem*. 1993

Mar 15;212(3):613-31.

131. Niels C. Danbolt. 2001. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1–105.
132. Novelli A., Reilly J.A., Lysko P.G., Henneberry R.C.1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res*, 451: 205–212
133. Obrenovitch, T.P., Urenjak, J. 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progr Neurobiol*, 51: 39-87.
134. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 2:351-8.
135. Olney, J. W. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164, 880: 719-721.
136. Ottersen OP, Laake JH, Reichelt W et al. 1996. Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *J Chem Neuroanat*. 12:1-14.
137. Ouyang W, Wang G, Hemmings HC Jr . 2003. Isoflurane and propofol inhibit voltage-gated sodium channels in isolated rat neurohypophysial nerve terminals. *Mol Pharmacol*. 2003 Aug;64(2):373-81.
138. Ozkan F, Senayli Y, Ozyurt H, Erkorkmaz U, Bostan B. 2012. Antioxidant effects of propofol on tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *J Surg Res*. 2012 Aug;176(2):601-7.
139. Ozawa, S., Kamiya, H., Tzuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progr Neurobiol*, 55: 581-618.
140. Pang ZP, Südhof TC. 2010. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr*

Opin Cell Biol. 2010 Aug;22(4):496-505. Epub 2010 Jun 3.

141. Paschen W. 1996. Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic-cell damage. *Med Hypotheses*. 1996 Oct;47(4):283-8.
142. Paschen, W. Calcium neurotoxicity. *Journal Neurochemistry*, v. 72(6), p.2625-2626, 1999.
143. Paschen, W. Role of calcium in neuronal cell injury with subcellular compartment involved. *Brain Research Bulletin*, v. 53(4), p.409-413, 2000.
144. Paschen, W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium*, v. 34(4-5), p. 369-383, 2003.
145. Patel PM, Goskowitz RL, Drummond JC, Cole DJ. 1995. Etomidate reduces ischemia-induced glutamate release in the hippocampus in rats subjected to incomplete forebrain ischemia. *Anesth Analg*. May;80(5):933-9.
146. Preziosi P, Vacca M. 1982. Etomidate and corticotrophic axis. *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 256:308 –10
147. Picaud S, Larsson HP, Wellis DP, Lecar H, Werblin F. 1995. Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander. *Proc Natl Acad Sci*; 92(20):9417-21.
148. Piyush M. Patel, Randall L. Goskowitz, John C. Drummond, Daniel J. Cole. 1995. Etomidate Reduces Ischemia-Induced Glutamate Release in the Hippocampus in Rats Subjected to Incomplete Forebrain Ischemia. *Anesth Analg*;80:933-9.
149. Pulsinelli W. 1995. The ischemic penumbra in stroke. *Sci Am Sci Med*, 2: 16-25.
150. Ratnakumari L, Hemmings HC Jr. 1986. Effects of propofol on sodium channel-

dependent sodium influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. *Anesthesiology*. 1997 Feb (2):428-39.

151. Reid TJ 3rd, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossmann MG. 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug;78(8):4767-71.

152. Ricci, S., Celani, M. G., La Rosa, F., Vitali, R., Duca, E., Ferragzu, R., Paolotti, M., Seppolini, D., Caputo O., e Chiurulla, C. 1991. A community based study of incidence and risk factors and outcome of transient ischaemic attacks in Umbria, Italy, *J. Neurol.*, 238: 87-90.

153. Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Brammer MJ. 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 296 (Pt 2):313-319.

154. Romero, F.J., Bosch-Morell, F., Romero, M.J. Romero, B. Marin, N., Roma, J. 1998. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health. Perspect.*, v.106, p.1229-1234.

155. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. Oct;29(10):2189-95.

156. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, Mar;16(3):675-86.

157. Ruijter W, Stienen GJ, van Klarenbosch J, de Lange JJ. 2002. Negative and positive inotropic effects of propofol via L-type calcium channels and the sodium-calcium exchanger in rat cardiac trabeculae. *Anesthesiology*. 2002 Nov;97(5):1146-55.

158. Sanders, R.D.; Ma, D.; Maze M. 2005. Xenon: elemental anaesthesia in clinical practice. *Br Med Bull.* V.71: 115-135.
159. Sano T, Drummond JC, Patel PM, Grafe MR, Watson JC, Cole DJ.1992. A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology.* 1992 Feb;76(2):221-8.
160. Sattler R, Z. Xiong, W.Y. Lu, M. Hafner, J.F. MacDonald, M. 1999. Tymianski. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284:1845–1848.
161. Schanne, F. A., Kane, A. B., Young, E. E., & Farner, J. L. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, v.206, p. 700-702,1979.
162. Şekeroğlu MR, Huyut Z, Him A. 2012. The susceptibility of erythrocytes to oxidation during storage of blood: effects of melatonin and propofol. *Clin Biochem.* Mar;45(4-5):315-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.021. Epub 2012 Jan 9
163. Sengpiel, B., Preis, E., Kriegstein, J., and Prehn, J.H. 1998. NMDA-induced Superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1903-1910.
164. Shigemura, T., Hatakeyama, N., Shibuya, N., Yamazaki, M., Masuda, A., Chen, F.S., Momose, Y., Ito, Y., 1999. Effects of propofol on contractile response and electrophysiological properties in single guinea-pig ventricular myocyte. *Pharmacol. Toxicol.* 85, 111–114.
165. SmithDC, BergenJM, SmithlineH, Kirschner.2000.Atrial of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *J Emerg Med*, Jan;18(1):13-6.
166. Siesjö BK. 1981. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1(2):155-85. Review.

167. Stämpfli R. 1981. Overview of studies on the physiology of conduction in myelinated nerve fibres. In *Demyelinating disease: basic and clinical electrophysiology* pp11-23. New York: Raven Press.
168. Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*. 1990 Nov 29;348(6300):443-6.
169. Takei T, Saegusa H, Zong S, Murakoshi T, Makita K, Tanabe T. 2003. Increased sensitivity to halothane but decreased sensitivity to propofol in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *Neurosci Lett*. 2003 Oct 16;350(1):41-5.
170. Tas PW, Roewer N. Halothane inhibits spontaneous calcium oscillations via adenosine A1 receptors. *Neuroreport*. 2005 Dec 19;16(18):2047-50.
171. Traul DE, Zuo Z, Pajewski TN. Anesthetic-induced neuroprotection: a review. *Advances in anesthesia* 2008, 26:201-212.
172. Turner BK, Wakim JH, Secrest J, Zachary R. 2005. Neuroprotective effects of thiopental, propofol, and etomidate. *AANA J*. 2005 Aug;73(4):297-302.
173. Velly L.J., Guillet B.A., Masméjan F.M., Niouillon A.L., Bruder N.J., Pisano P.M. Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures. *Anesthesiology* 2003;99:368-75.
174. Verkhratsky A., Orkand, R. K., & Kettenmann, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.*, v.78, p. 99-141, 1998.
175. Veruki ML, Morkve SH, Hartveit E. 2006. Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. *Nature Neuroscience*;9:1388–1396.
176. Wadiche JI, Amara SG, Kavanaugh MP. 1995. Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron*. 1995 Sep; 15(3):721-8.
177. Wanscher M, Tønnesen E, Hu'ttel M, Larsen K. 1985. Etomidate infusion and adrenocortical function. A study in elective surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*; 29:483–

5.

178. Watson JC, Drummond JC, Patel PM, Sano T, Akrawi W, U HS. 1992. An assessment of the cerebral protective effects of etomidate in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat. *Neurosurgery*. 1992 Apr;30(4):540-4.

179. Westphalen RI, Hemmings HC Jr. Volatile anesthetic effects on glutamate versus GABA release from isolated rat cortical nerve terminals: basal release. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jan;316(1):208-15.

180. Winegar BD, MacIver MB. Isoflurane depresses hippocampal CA1 glutamate nerve terminals without inhibiting fiber volleys. *BMC Neurosci*. 2006 Jan 12;7:5.

181. Wise PM, Dubal DB, Rau SW, Brown CM, Suzuki S. 2005. Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative. *Endocr Rev*. May; 26, 3:308-12.

182. Wu L.-G. and Saggau P. 1997. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*. 20, 204–212.

183. Yamaguchi, S.; Hamaguchi, S.; Mishio, M. et al. 2000. Propofol prevents lipid peroxidation following transient forebrain ischemia in gerbils. *Canadian Journal of Anaesthesia*, v.47, n.10: 1025-1030.

184. Yagmurdur H, Cakan T, Bayrak A, Arslan M, Baltaci B, Inan N, Kilinc K. 2004. The effects of etomidate, thiopental, and propofol in induction on hypoperfusion-reperfusion phenomenon during laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2004 Jul;48(6):772-7

185. Yelavich PM, Holmes CM. 1980. Etomidate: A foreshortened clinical trial. *Anaesthesia Intensive Care*; 8:479 – 83.

186. Yeung JK, Zed PJ. 2002. A review of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *CJEM*. 2002 May;4(3):194-8.

187. Yu Q, Zhou Q, Huang H, Wang Y, Tian S, Duan D. 2010. Protective effect of etomidate on spinal cord ischemia-reperfusion injury induced by aortic occlusion in rabbits. *Ann Vasc Surg.* 2010 Feb;24(2):225-32.
188. Zádori D, Klivényi P, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. *J Neurol Sci.* 2012. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci.*, Nov 15;322(1-2):187
189. Zerangue N, Kavanaugh MP. 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*; 383(6601):634-7.
190. Zhong J, Gerber G, Kojic L, Randic M. 2000. Dual modulation of excitatory synaptic transmission by agonists at group I metabotropic glutamate receptors in the rat spinal dorsal horn. *Brain Res*;887:359–377.
191. Zivin JA. Factors determining the therapeutic window for stroke. *Neurology* 1998;50:599–603.