

**Paulo Henrique Costa Diniz**

**Efeito do anestésico inalatório sevoflurano  
na liberação de GABA em fatias de córtex  
cerebral de ratos**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas / Faculdade de Medicina  
Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular**

**Belo Horizonte 2011**

**Paulo Henrique Costa Diniz**

**Efeito do anestésico inalatório sevoflurano  
na liberação de GABA em fatias de córtex  
cerebral de ratos**

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

**Orientador: Renato Santiago Gomez**

**Belo Horizonte 2011**

*Todo mundo sabe alguma coisa.  
Ninguém sabe tudo.  
Todo conhecimento está contido na humanidade.  
(Piere Levy)*

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado, na sua maior parte no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Alguns experimentos também foram realizados no Instituto de Neurociências da Faculdade de Medicina da UFMG e no Centro de Pesquisa da Santa Casa/BH. Houve o auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq-UFMG).

# AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, que sempre ilumina meus passos.

À minha família, pelo amor que incentiva, absorve todo cansaço e celebra tantas alegrias.

À Professora Cristina Guatimosim, que me introduziu na carreira científica e me acompanhou desde os primeiros anos, ainda como aluno de iniciação.

Ao Professor Marcus Vinícius Gomez, por inspirar meu amor pela pesquisa.

Ao Professor Renato Santiago Gómez, pela orientação e estímulo à busca pelo conhecimento com autonomia.

À Professora Janice, pela agradável convivência nos tempos de iniciação científica.

À Aninha e Nancy, sempre presentes. À professora Virgínia, com quem aprendi as primeiras técnicas. Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, especialmente Célio, Juliara e Juliana pelo companherismo e pela ajuda que tanto precisei.

Aos meus amigos, especialmente Dudu e Rafaela, que acompanharam mais de perto os esforços e alegrias desses últimos anos.

À equipe de Clínica Médica e Oncologia do HC/UFMG, com quem tenho o prazer de aprender a prática clínica.

# SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>x</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Introdução</b>	
1.1 Os anestésicos inalatórios .....	2
1.1.1 Efeitos dos anestésicos inalatórios sobre o sistema nervoso central	3
1.1.1.1 Substratos neuroanatômicos .....	3
1.1.1.2 Mecanismos moleculares .....	5
1.2 Transmissão GABAérgica .....	8
1.2.1 Metabolismo do GABA .....	11
1.2.2 Liberação e transporte de GABA .....	11
1.2.2.1 Liberação dependente de $Ca^{2+}$ .....	11
1.2.2.2 Liberação independente de $Ca^{2+}$ .....	13
1.2.3 Receptores GABAérgicos .....	15
1.3 Liberação de GABA induzida pelos anestésicos inalatórios .....	16
<b>2. Objetivos</b>	
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3. Materiais e métodos</b>	
3.1 Drogas e reagentes .....	21
3.2 Soluções .....	22
3.3 Animais .....	23
3.4 Determinação da liberação de GABA em fatias de córtex cerebral de ratos	24
3.4.1 Obtenção das fatias de córtex cerebral de ratos .....	24
3.4.2 Marcação das fatias com [3H] GABA .....	24
3.4.3 Lavagem das fatias .....	24

3.4.4 Incubação das fatias .....	24
3.4.5 Administração e mensuração da concentração do sevoflurano .....	24
3.4.6 Concentração da radioatividade e do sobrenadante .....	25
3.4.7 Análise estatística dos resultados.....	25
<b>4. Resultados</b>	
4.1 Liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos induzida por sevoflurano .....	28
4.2 Efeito do tempo de incubação do sevoflurano na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos .....	30
4.3 Envolvimento do Ca <sup>2+</sup> extracelular na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos .....	32
4.4 Envolvimento do Ca <sup>2+</sup> intracelular na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por Sevoflurano .....	34
4.5 Participação dos canais de Na <sup>+</sup> sensíveis à TTX na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	36
4.6 Liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida pelo sevoflurano em córtex cerebral de ratos em baixas temperaturas .....	38
4.7 Liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de SKF 89976A .....	40
4.8 Envolvimento dos gliócitos na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA em fatias de córtex cerebral de rato .....	42
<b>5. Discussão e conclusões .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{Ci}$  micro Curie

$\mu\text{M}$  micro Molar

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  concentração de cálcio livre no citosol

$[\text{}^3\text{H}]\text{GABA}$  Ácido  $\gamma$ -aminobutírico triciado

$[\text{Na}^+]_i$  concentração de sódio livre no citosol

AMPc Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA Análise de variância

ATP adenosina trifosfato

BAPTA-AM 1,2-bis (O-aminofenoxi) etano-N,N,N,N, ácido tetra(acetoximetil) éster

BIS índice biespectral

$\text{Ca}^{2+}$  íons cálcio

$\text{Ca}_v$ s canais para cálcio operados por voltagem

$\text{Cl}^-$  íons cloreto

$\text{Na}_v$ s canais para sódio sensíveis à voltagem

DPM desintegração por minuto

$\text{EC}_{50}$  concentração efetiva capaz de induzir 50% da liberação máxima

EGTA ácido etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino éter) N,N,N,N,-tetraacético

EEG Eletroencefalograma

EPM erro padrão da média

GABA ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GABA-T GABA transaminase

GAT Transportador de GABA

KCl cloreto de potássio

$\text{Na}^+$  íons sódio

POPOP 1,4-bis 2 (5-feniloxazolil) benzeno

PPO 2,5-difeniloxazol

rpm rotação por minuto

SNC sistema nervoso central

SRAA sistema reticular ativador ascendente

TTX tetrodotoxina



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema representando as diferentes etapas envolvidas na neurotransmissão GABAérgica .....	10
Figura 02: Dose-resposta do sevoflurano na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos .....	30
Figura 03: Curva de tempo de incubação do sevoflurano na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos .....	32
Figura 04: Efeito do EGTA na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	34
Figura 05: Efeito do BAPTA-AM na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	36
Figura 06: Efeito da TTX na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	38
Figura 07 : Liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (17 °C) .....	40
Figura 08: Efeito do SKF 89976A, um inibidor do GAT-1, na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	42
Figura 09: Efeito da β-alanina, um inibidor do GAT-2 e GAT-3, na liberação de [ <sup>3</sup> H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	44

## RESUMO

A introdução do éter na prática anestésica por William Morton em 1846 e o posterior surgimento de outros agentes anestésicos possibilitaram o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das diferentes especialidades cirúrgicas. No entanto, apesar da importância e do amplo uso clínico, o mecanismo de ação desses agentes ainda não foi esclarecido. Há evidências de que os anestésicos potencializam a neurotransmissão inibitória, mas os aspectos moleculares envolvidos permanecem desconhecidos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do anestésico inalatório sevoflurano na liberação do GABA, principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de mamíferos. Para isso, fatias de córtex cerebral de ratos foram marcadas com [<sup>3</sup>H]GABA, e, após etapas de centrifugação e lavagens, foram estimuladas com diferentes concentrações do anestésico (0,058, 0,11, 0,23, 0,46, 0,93 mM). O sevoflurano aumentou a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação. Essa liberação foi independente do Ca<sup>2+</sup>, já que foi inalterada pelo EGTA e BAPTA. A inibição de canais para Na<sup>+</sup> pela tetrodotoxina também não interferiu na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo anestésico. Esses dados sugerem que a liberação desse neurotransmissor via exocitose não está envolvida na ação do sevoflurano. O SKF 89976A, bloqueador do GAT-1, transportador de GABA presente na membrana pré sináptica de neurônios GABAérgicos, inibiu em cerca de 57,2% a liberação deste neurotransmissor induzida pelo sevoflurano (p<0,05). Da mesma forma, observou-se inibição de 83,1% (p<0,05) da liberação induzida pelo anestésico quando as fatias foram incubadas em baixas temperaturas (17°C), condição esta em que a liberação de GABA mediada por carreadores está inibida. A β-alanina, um inibidor dos transportadores GAT-2 e GAT-3, presentes na membrana das células da glia, não interferiu na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo anestésico, demonstrando que estas células parecem não estar envolvidas nessa ação. Os resultados do presente trabalho sugerem que o sevoflurano induz a liberação não-excitotóxica de GABA em fatias de córtex cerebral de ratos, através de um mecanismo Ca<sup>2+</sup>-independente, que envolve o transportador deste neurotransmissor presente na membrana neuronal.

## ABSTRACT

The introduction of ether in anesthesia, by William Morton in 1846, and the emergence of other anesthetics made possible the development and improvement of different surgical modalities. However, despite the importance and the broad clinical use, the action mechanism of these agents is still unclear. Evidences show that anesthetics potentialize inhibitory neurotransmission, but the precise molecular targets remain unknown. The present study aimed to evaluate the effect of the inhalatory anesthetic sevoflurane on the release of GABA which is the main inhibitory neurotransmitter in mammalian central nervous system. Rat cortical brain slices were stained with [<sup>3</sup>H]GABA. Following centrifugation and washing out steps, slices were stimulated with different concentrations of anesthetic (0.058, 0.11, 0.23, 0.46, 0.93 mM). Sevoflurane increased [<sup>3</sup>H]GABA release in cortical brain slices. This effect was dose-dependent and time incubation-dependent. Such release was independent of Ca<sup>2+</sup>, since it was unaffected by EGTA and BAPTA. Inhibition of tetrodotoxin resistant Na<sup>+</sup> channels didn't interfere on anesthetic induced [<sup>3</sup>H]GABA release as well. These data suggest that exocytotic [<sup>3</sup>H]GABA release is not related to sevoflurane action. SKF 89976A, a blocker of GAT1, a GABA transporter present at the pre-synaptic plasma membrane of GABAergic neurons, inhibited by 57,2% the sevoflurane induced GABA release (P<0,05). In the same way, it was observed an inhibition of 83,1% (p<0,05) in the sevoflurane induced GABA release when slices were kept at low temperatures (17°C). In this condition, GABA release mediated by carriers is impaired. β-alanine, an inhibitor of GAT-2 and GAT-3 present at glial membranes, didn't interfere in the [<sup>3</sup>H]GABA release induced by the anesthetic, demonstrating that these cells seem not to be involved in that action. Altogether, results of the present work suggest that sevoflurane induces a non-exocytotic GABA release in rat brain cortical slices, through a calcium-independent way, that involves the transporter of this neurotransmitter, present at neuronal membrane.

# 1- Introdução

## 1.1 Os anestésicos inalatórios

A evolução da cirurgia na era moderna está diretamente ligada ao desenvolvimento dos anestésicos inalatórios (Jacob et al., 2009). A capacidade de provocar no paciente inconsciência e insensibilidade a estímulos dolorosos tornou os anestésicos indispensáveis e uma das drogas mais usadas atualmente (Franks, 2006). Desde a demonstração pública do uso do éter na anestesia cirúrgica, ocorrida em 1846 por Willian T. G. Morton, diversos outros compostos têm sido desenvolvidos, sempre buscando alternativas mais efetivas e com menores efeitos colaterais (Vandam, 1994).

Os primeiros agentes anestésicos a serem desenvolvidos eram inflamáveis, mas esse problema viria a ser resolvido a partir da década de 30, com a criação dos primeiros compostos halogenados, contendo o flúor em sua molécula. Isso trouxe outros benefícios, como o aumento da estabilidade e menor atividade contra a camada de ozônio (Jones, 1990; Merret e Jones, 1994).

Dos anestésicos inalatórios atualmente disponíveis, o halotano foi o primeiro a ser introduzido, o que ocorreu em 1956. Devido à disponibilidade para ser usado em máscara, esse agente foi, por muito tempo, o anestésico de escolha nos procedimentos cirúrgicos. (Mazze; Ebert; Kharasch, 1998). Entretanto, o halotano apresenta muitas características indesejáveis, como o aumento da sensibilização do miocárdio às catecolaminas, o que favorece a ocorrências de arritmias graves. Além disso, ocasionalmente pode levar à hepatite e insuficiência hepática. (Merret e Jones, 1994).

Em 1972, o sevoflurano foi descrito pela primeira vez, apresentando propriedades vantajosas (Wallin; Regan; Napoli, 1975). Entre elas, incluem-se os efeitos mínimos sobre o sistema cardiorrespiratório, efeitos reversíveis no SNC, maior margem de segurança entre dose tóxica e terapêutica, além da ausência de efeito tóxico cumulativo com as exposições repetidas. Entretanto, seu uso clínico só foi liberado em 1990 no Japão, em 1995 na Alemanha e em 1996 nos Estados Unidos (Behne; Wilker; Harder, 1999). Como apresenta um baixo coeficiente de partição sangue:gás, a indução e a recuperação anestésicas são mais rápidas e previsíveis. Apresenta ainda a peculiaridade do odor adocicado, sem provocar irritação de vias

aéreas, e um efeito broncodilatador potente, tornando-o um excelente candidato para indução de anestesia sob máscara tanto em adultos como em crianças (Jacob et al., 2009).

Dados norte-americanos mostraram que o sevoflurano e outros dois importantes anestésicos - o isoflurano e desflurano - são responsáveis por 97% do mercado de agentes inalatórios naquele país (Delgado-Herrera; Ostroff; Rogers, 2001).

Apesar do uso na prática cirúrgica há várias décadas, o mecanismo de ação dessas substâncias voláteis ainda não foi esclarecido e os vários estudos que têm sido publicados dão idéia do amplo espectro desse assunto (Antlkowiak, 2001).

### **1.1.1 Efeitos dos anestésicos inalatórios sobre o sistema nervoso central**

#### **1.1.1.1 Substratos neuroanatômicos**

A anestesia geral é caracterizada clinicamente pela tríade de inconsciência, amnésia e imobilidade aos estímulos nociceptivos (Antognini; Carstens, 2002). Nos últimos anos, muitos estudos têm atribuído esses efeitos clínicos às ações dos anestésicos em diferentes áreas no SNC (Kendig 1993, Eger et al., 1997).

Apesar de sofrer influências modulatórias supra espinhais, a medula espinhal é o principal local de ação dos anestésicos inalatórios no SNC para promoverem a imobilidade (Borges; Antognini, 1994; Rampil et al., 1993). Em 1994, Rampil mostrou que a transecção medular em nível torácico alto praticamente não afeta a capacidade dos anestésicos voláteis suprimir os movimentos (Rampil, 1994). Importante destacar ainda que, ao deprimir a atividade medular, ocorre bloqueio dos impulsos nociceptivos na medula espinhal, diminuindo a transmissão ascendente da informação dolorosa que estimularia o despertar (Kengig, 1993; Antognini; Wang; Carstens, 2000).

A inconsciência, definida com perda da responsividade a estímulos, é também um importante efeito dos anestésicos voláteis. Atualmente, postula-se que a consciência seria uma função integrativa de muitas áreas do cérebro, incluindo o córtex, tálamo, sistema límbico e gânglios da base (Edelman, 2003). Assim, os anestésicos podem induzir a perda da

consciência pela inibição de uma área específica ou pela depressão dessas várias áreas citadas.

Estudos utilizando técnicas de neuroimagem funcional mostram que diferentes anestésicos levam à redução global da atividade de neurônios corticais, com variações regionais significativas (Alkire et al., 1999). Também mostram redução na atividade metabólica de estruturas subcorticais, incluindo tálamo, formação reticular ativadora ascendente e possivelmente o hipotálamo (Alkire; Haier, 2001).

Há evidências apontando os núcleos intralaminares do tálamo como centro de integração da consciência através das diversas conexões com o córtex e o sistema reticular ativador ascendente (SRAA) (revisito por Perry e cols., 1999). É por meio dessas conexões com o córtex que o estímulo doloroso, ao chegar ao centro de percepção da dor, localizado no tálamo, será conscientizado e classificado.

Já foi observado que, durante a anestesia profunda, neurônios do tálamo têm metabolismo de glicose mais alterado (Campagna; Miller; Forman, 2003). Há também evidências eletroencefalográficas de que estruturas talâmicas são inibidas por concentração hipnóticas de anestésicos como o sevoflurano e propofol (Gugino, 2001).

Apesar de muitos anestésicos gerais deprimirem a atividade neuronal no sistema talamocortical em concentrações hipnóticas, esse não é necessariamente o mecanismo mais importante para causar a inconsciência, visto que alguns agentes como a cetamina produzem hipnose sem provocar alterações marcantes nesses locais (Cariani, 2000; Maschour, 2004).

Na década de 1940, Magoun e Moruzzi descobriram que muitos núcleos da SRAA estariam envolvidos na excitação, sono e vigília (Moruzzi; Magoun, 1949). Essas estruturas, então, seriam alvos possíveis para os anestésicos gerais produzirem seu efeito sedativo e hipnótico. De fato, estudos em gatos mostraram que o halotano, enflurano e isoflurano deprimem o disparo espontâneo da SRAA (Ogawa et al., 1992). Por outro lado, foi demonstrado que lesões extensas no SRAA suprimem a atividade eletroencefalográfica em resposta a estímulos, mas os animais mantêm-se completamente despertos (Feldman; Waller, 1962). Portanto não há

evidências experimentais de que o SRAA seja o único ou mesmo o principal local de ação dos anestésicos inalatórios.

O sono e a anestesia geral dividem algumas características comuns, incluindo a depressão sensorial e motora, o padrão eletroencefalográfico e a fase de recuperação (Tung et al, 2004). Então, os mecanismos hipotalâmicos envolvidos na regulação do sono podem ter um papel na hipnose induzida pela anestesia. Talvez essa hipótese seja consistente com o efeito hipnótico observado durante aplicação direta de agentes GABAérgicos no núcleo tuberomamário, uma região do hipotálamo envolvida na regulação do sono e vigília. (Nelson, 2002).

A amnésia, outro efeito clínico induzido pelos anestésicos, pode também estar relacionada à ação desses agentes no hipocampo. Essa estrutura é considerada responsável por algumas formas de memória, como a espacial e a anterógrada (Redman, 1996). Já foi demonstrado que os anestésicos inalatórios suprimem a atividade de neurônios da região CA1 do hipocampo, o que ajudaria a explicar a perda da memória durante a anestesia (Eger, 1997)

Enfim, apesar do considerável progresso ocorrido nos últimos anos, ainda não está esclarecido como os anestésicos gerais afetam a função do SNC para provocar efeitos clínicos tão diversos.

#### **1.1.1.2 Mecanismos moleculares**

Desde os primeiros anos de introdução dos anestésicos na prática clínica, surgiram várias especulações sobre o mecanismo molecular de ação desses agentes. Por volta de 1900, Meyer e Overton descobriam uma correlação direta entre a potência dos anestésicos e sua solubilidade em óleo (Revisto por Rudolph; Antkowiak, 2004). Na hipótese lipídica, os anestésicos gerais atuam através de um mecanismo comum e inespecífico, dissolvendo-se na membrana das células nervosas, causando alterações estruturais na bicamada lipídica (Miller, 1961).

Entretanto, apesar da boa aceitação naquela época, a hipótese não explicava muitas observações intrigantes que começaram a ser feitas. Dentre elas, o fenômeno da interrupção,



em que ocorre perda da atividade anestésica além de um determinado limite de aumento no comprimento da cadeia de hidrocarboneto, embora a solubilidade lipídica continuasse a aumentar. Outra questão inexplicada era as diferenças entre as potências de esteroisômeros do mesmo anestésico, apesar de conservarem a mesma solubilidade lipídica (Franks; Lieb, 1991; Harris; Moody; Skolnick, 1992)

No início da década de 1980, existiam fortes razões para se questionar a validade da hipótese lipídica, mas faltavam evidências para validar uma idéia até então alternativa, conhecida como hipótese protéica. Segundo ela, os anestésicos provocariam seus efeitos por se ligarem diretamente em proteínas-alvo (Franks, 2006).

Foram os estudos de Franks & Lieb que fortaleceram essa hipótese, lançando as bases para o melhor entendimento da ação molecular desses agentes. Em um dos seus trabalhos mais importantes, esses autores mostraram que diversos anestésicos poderiam inibir a atividade de uma proteína, a enzima luciferase do inseto pirilampo. Mostraram ainda a existência de correlação entre a dose requerida para essa inibição e a dose usada para anestesia em animais (Franks & Lieb, 1984).

Assim, a partir da correlação da potência anestésica com solubilidade lipídica e da capacidade de ligação protéica dos anestésicos inalatórios, acredita-se que provavelmente ocorra uma ligação destes agentes a domínios hidrofóbicos específicos das proteínas, especialmente canais protéico (Franks & Lieb, 1994).

Nos últimos anos, os canais iônicos, que têm papel de destaque na transmissão neuronal, emergiram como importante alvos de ação dos anestésicos inalatórios. (Franks & Lieb, 1994; Antkowiak, 2001; Hemmings et al., 2005; revisto por Franks, 2006). Entretanto, ainda não está claro a associação desses alvos com os efeitos clínicos desejados na anestesia.

Os canais iônicos podem ser subdivididos em canais operados por voltagem, em que o mecanismo de abertura do canal é dependente da variação da voltagem na membrana plasmática, e em canais operados por ligante, onde uma molécula se ligaria a um receptor associado a um canal iônico.

Quando um potencial de ação se propaga até o terminal nervoso, a membrana despolariza-se, ativando os canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ). Ocorre uma potencialização da alteração da voltagem da membrana, quando então o limiar de ativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem ( $\text{Ca}_v$ s) será atingido. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através destes canais deflagra a exocitose de vesículas sinápticas com conseqüente liberação do neurotransmissor (Katz; Miledi, 1967; revisto por Neher, 1998). Em concentrações clinicamente relevantes, os anestésicos gerais alteram a transmissão do impulso entre os neurônios do SNC, parecendo não afetar a condução axonal (Rudolph; Antkowiak, 2004). Assim, é possível que os canais  $\text{Na}_v$  e  $\text{Ca}_v$  possam ser um alvo pré-sináptico dos anestésicos inalatórios, interferindo, conseqüentemente, na transmissão sináptica. De fato, foi demonstrado que os anestésicos voláteis podem deprimir as correntes dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente e, conseqüentemente, inibir a liberação de neurotransmissores (Yamakage; Hirshman; Croxton, 1995).

Os canais de sódio são proteínas transmembranas presentes nas células excitáveis, onde são responsáveis pela geração e propagação do potencial de ação (Beleboni et. al. 2004). Com base em sua seqüência de aminoácidos e sensibilidade à tetrodotoxina, os canais de sódio podem ser classificados em dois grupos: isoformas do grupo  $\text{Na}_v1$ , que são 9 homólogos sensíveis à tetrodotoxina e denominados de  $\text{Na}_v1.1$  a  $\text{Na}_v1.9$ , e o grupo  $\text{Na}_x$ , que é insensível à tetrodotoxina e difere estruturalmente do primeiro grupo em regiões críticas do canal (Goldin et. al. 2000). Os canais do grupo  $\text{Na}_v1$  encontram-se principalmente nos neurônios, coração, gânglios nervosos e músculo esquelético. Os canais do tipo  $\text{Na}_x$  são provavelmente responsáveis pelo transporte e absorção de  $\text{Na}^+$ , dependem da concentração de  $\text{Na}^+$  no meio (Watanabe et. al. 2000), e são encontrados principalmente no coração e neurônios sensoriais (Escoubas et. al. 2000).

Baseado em critérios farmacológicos e eletrofisiológicos, seis tipos de correntes de  $\text{Ca}_v$ s foram identificados: L, N, P/ Q, R e T. Atualmente eles são chamados, respectivamente, de  $\text{Ca}_v1.x$ ,  $\text{Ca}_v2.2$ ;  $\text{Ca}_v2.1$ ;  $\text{Ca}_v2.3$ ;  $\text{Ca}_v3.x$ . (Minor Jr.; Findeisen, 2010). Os  $\text{Ca}_v$ s são divididos em canais ativados por baixa voltagem e inativados rapidamente ( $\text{Ca}_v3.x$ ), e canais ativados por alta voltagem, no qual necessitam de grande voltagem para serem ativados e são

inativados lentamente ( $Ca_v1.x$ ,  $Ca_v2.2$ ;  $Ca_v2.1$ ;  $Ca_v2.3$ ) (revisão por Meir et al., 1999; Minor Jr.; Findeisen, 2010). Dados da literatura sugerem que os canais para  $Ca^{2+}$  do tipo  $Ca_v2.2$ ;  $Ca_v2.1$  estão envolvidos na regulação da excitabilidade e são essenciais na transmissão sináptica e, conseqüentemente, na liberação de neurotransmissores (Dunlap; Luebke; Turner, 1995).

Alguns autores têm investigado se esses canais são alvos dos anestésicos inalatórios no SNC, porém, resultados contraditórios foram observados. Study (1994) investigou o efeito do isoflurano nas correntes de  $Ca^{2+}$  em neurônios de hipocampo. Esse autor demonstrou que o isoflurano, em concentrações clinicamente relevantes, inibiu as correntes de  $Ca^{2+}$  ativadas por baixa e alta voltagem. No entanto, Hall, Lieb e Franks (1994) observaram que os  $Ca_v$ s do tipo  $Ca_v2.1$  são insensíveis a uma variedade de anestésicos gerais (halotano, isoflurano, tiopental, pentobarbital e propofol).

Os canais iônicos operados por ligantes também parecem desempenhar um papel importante na anestesia. Os receptores ionotrópicos como o para GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) do tipo A, para acetilcolina do tipo nicotínico e para glutamato são considerados sítios de ação dos anestésicos gerais (Campagna; Miller; Forman, 2003). Há evidências de que os anestésicos atuam nos receptores GABAérgicos por diferentes mecanismos. (Johnston, 1996a; Korpi; Grunder; Luddens, 2002). Entre eles, o aumento da ação do GABA no receptor, potencializando a corrente inibitória pós- sináptica gerada; a redução da dessensibilização desses receptores; e, em concentrações mais altas dos anestésicos, a ativação direta do GABA-A, mesmo sem participação do GABA (Orser et al., 1998).

## **1.2 Transmissão GABAérgica**

O GABA é o neurotransmissor inibitório mais abundante no SNC de mamíferos. Estima-se que ele esteja envolvido primariamente em 30-40% dos neurônios no SNC, principalmente como interneurônios (Hendry et al., 1987; Roberts, 1986a). Foi independentemente identificado em 1950 por Roberts e Frank e por Awapara e colaboradores, que também comprovaram sua presença no cérebro dos vertebrados (Awapara et al., 1950; Roberts; Frankel, 1950). Entretanto, os critérios clássicos para classificá-lo como

neurotransmissor só foram demonstrados no início dos anos 70, quando então sua função inibitória foi mais bem estudada e reconhecida (Krnjevic,1974; Roberts,1986b).

Nas últimas décadas, o interesse neste sistema de neurotransmissão tem sido crescente, o que pode ser explicado pelas evidências do envolvimento direto das sinapses GABAérgicas em graves doenças neurológicas e psiquiátricas, tais como a Coreia de Huntington, parkinsonismo, discinesia tardia, epilepsia, esquizofrenia, ansiedade, depressão maior e outros distúrbios do comportamento (Coyle, 2004; Lloyd; Morselli; Bartholini, 1987; Sanacora et al., 2000).

As vias GABAérgicas são, de fato, longas e complexas. Envolvem as conexões entre neocórtex e globo pálido, núcleo subtalâmico, substância negra reticulada. Além disso, o mesencéfalo medial e o hipocampo são também estruturas ricas em neurônios contendo GABA. Outra estrutura que se destaca é o córtex, que apresenta grande conteúdo de interneurônios com a função de inibição neuronal, responsáveis pelo melhor controle da excitabilidade cortical (Petroff, 2002).

Vários processos regulatórios estão envolvidos na transmissão do GABA. Incluem-se expressão enzimática e sua atividade, armazenamento vesicular do neurotransmissor, controle de receptores e de transportadores. Além dos neurônios GABAérgicos, as células da glia, ainda que pouco investigadas, também possuem maquinaria distinta para síntese, armazenamento, liberação, captação, e catabolismo do GABA (Angulo, et al., 2008). Todas essas etapas representam potenciais alvos que podem estar associados ao mecanismo de drogas já existentes e de doenças, além de constituir importantes estratégias farmacológicas para desenvolvimento de novas opções terapêuticas (Beleboni et al, 2004).

Classicamente, tem sido demonstrada a associação dos anestésicos inalatórios na vias GABAérgicas, já que esses agentes podem ativar a neurotransmissão inibitória ou inibir a ativação das sinapses excitatórias (Pearce, 2003). Entretanto, os mecanismos envolvidos na ação desses agentes sobre a transmissão GABAérgica ainda necessitam maior investigação.

A figura 1 traz um esquema das diferentes etapas da neurotransmissão do GABA citadas abaixo.

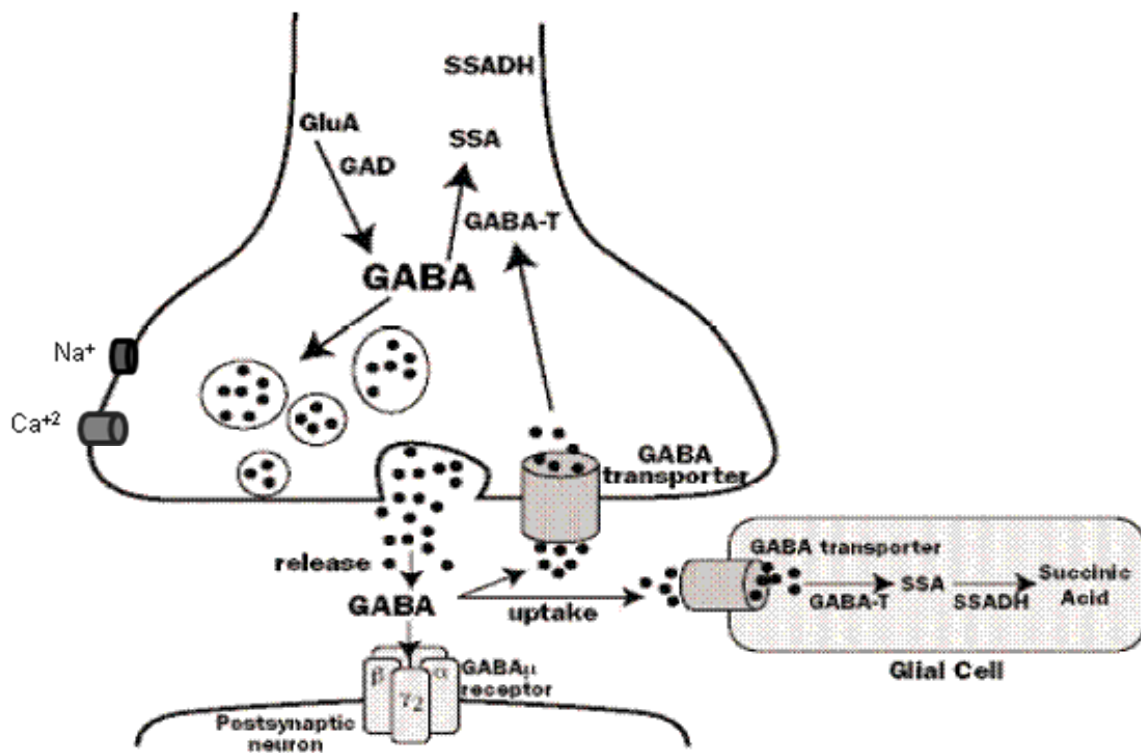


Figura 01: Esquema representando as diferentes etapas envolvidas na neurotransmissão GABAérgica

### **1.2.1 Metabolismo do GABA**

Existem duas vias diferentes para síntese do GABA. Uma delas, descrita em cérebro de peixes e camundongos, é considerada alternativa, provavelmente mais relevante durante o desenvolvimento embrionário, e envolve a degradação da poliamina putrescina (Seiler; Al-Therib; Kataoka, 1973).

Em sua via clássica, o GABA é sintetizado a partir da descarboxilação do glutamato, pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (Palmada; Centelles, 1998). São descritas duas isoformas dessa enzima, que são codificadas por diferentes genes, apresentam propriedades cinéticas próprias e distribuição celular distinta (Matins; Rinvall, 1993). A GAD 67 é predominantemente citosólica, responsável pela produção de 10% dos níveis normais de GABA. A GAD 65, por sua vez, é encontrada no terminal neuronal, aderida à membrana da vesícula sináptica, sugerindo função adicional no armazenamento ou liberação vesicular de GABA (Christgau et al., 1992).

Em neurônios, gliócitos ou, em menor proporção, na fenda sináptica, o GABA sofre ação da GABA transaminase (GABA-T). Essa enzima participa da primeira e mais importante reação de catabolização desse neurotransmissor que, em última análise, será convertido à glutamato pela reação de transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato (de Graaf et al., 2006).

A inibição da GABA-T aumenta a concentração cerebral de GABA, diminuindo a susceptibilidade à convulsões e condições epiléticas, como demonstrado por estudos observacionais. (Sherif and Ahmed, 1995; Sills, 2003). Além disso, a inibição desta enzima parece estar relacionada a outros efeitos farmacológicos, como os relacionados ao controle do apetite, ansiedade, dependência alcoólica e sedação (Sherif; Ahmed, 1994). Tendo em vista o envolvimento das sinapses GABAérgicas em doenças neurológicas, vários inibidores da GABA-T têm sido descritos (Choi; Silverman, 2002). No presente trabalho, utilizamos o ácido aminoxacético como inibidor irreversível desta enzima.

### **1.2.2 Liberação e transporte de GABA**

#### **1.2.2.1 Liberação dependente de $Ca^{2+}$**

Após sua síntese endógena, o GABA pode ser armazenado em vesículas sinápticas, carregado pelo transportador vesicular. Esse evento é direcionado por um gradiente próton-eletroquímico independente de Na<sup>+</sup>, gerado por uma bomba Na<sup>+</sup> H<sup>+</sup>-ATPase diferente daquela presente na membrana celular (Christensen; Fykse; Fonnum, 1991).

Apesar de a bomba ser similar em virtualmente todos os tipos de vesículas sinápticas, é o transportador que especifica o neurotransmissor a ser armazenado, assegurando, dessa forma, a especificidade do neurônio para um transmissor específico. Entretanto, evidências recentes apontam que o GABA pode ser liberado junto com a glicina em neurônios específicos, presentes tanto no cérebro quanto na medula espinhal. Nesses neurônios, o armazenamento vesicular dos neurotransmissores é mediado pelo mesmo transportador, permitindo a coexistência de ambos na mesma população de vesículas (Jonas; Bischofberger; Sandkuhler; Nicoll; Malenka, 1998; Takamori; Riedel; Jahn, 2000).

O GABA armazenado nas vesículas é liberado pelo clássico mecanismo de exocitose, Ca<sup>2+</sup>-dependente, que envolve a fusão da membrana vesicular com a membrana do terminal pré-sináptico em áreas especializadas, conhecidas como zonas ativas (Katz; Miledi, 1967; McIntire et al., 1997). Para isso, as vesículas sinápticas migram para a zona ativa, onde passam por um estágio conhecido como amadurecimento ou *priming*, quando se tornam competentes para formar um poro de fusão em resposta ao Ca<sup>2+</sup> intracelular. A ancoragem das vesículas é mediada por pequenas GTPases que são membros da família Rab, as quais agem em conjunto com várias proteínas efetoras Rab ou com fatores de ancoragem (Zerial; McBride, 2001). Isso é seguido pelo alinhamento específico de três proteínas conhecidas como SNAREs: a sinaptobrevina/VAMP, ancoradas nas membranas da vesícula sináptica, e a SNAP-25 e sintaxina, ancoradas nas membranas do terminal nervoso (Söllner; Bennet; Whiteheart, 1993). O entrelaçamento das proteínas do complexo SNARE promoverá a fusão das membranas da vesícula à membrana plasmática em resposta ao aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Weber e cols., 1998, Jahn e Sudhof, 1999; Söllner; Bennet; Whiteheart, 1993)

A deflagração do potencial de ação leva a uma onda de despolarização da membrana neuronal, ativando os canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à voltagem. O conseqüente influxo de Ca<sup>2+</sup>

ativa a sinaptotagmina, considerada uma proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$ , iniciando assim essa cascata (Perin et al., 1991; Chapman e Davis, 1998; revisado por Chapman, 2008).

Já foi demonstrado que os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem, presentes na membrana plasmática, podem ser possíveis alvos de drogas com efeito neuronal. Em 2000, Nicolato e colaboradores, ao investigar o mecanismo de ação da tityustoxina, uma neurotoxina do escorpião *Tityus serrulatus*, observaram o envolvimento dos subtipos P/Q destes canais na liberação induzida de GABA pela toxina.

É importante destacar também que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de estoques intracelulares pode também desencadear a excitose (Tse et al., 1997; Berridge, 1998). Dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os anestésicos sevoflurano, halotano e isoflurano aumentam a liberação excitotóxica de [ $^3\text{H}$ ]-acetilcolina em fatias de córtex cerebral de ratos, a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente desses estoques (Gomez et al., 1999; Gomez; Gomez; Prado, 2000; Silva et al., 2005).

### **1.2.2.2 Liberação independente de $\text{Ca}^{2+}$**

Além da excitose, pode haver liberação de GABA de origem citosólica por um mecanismo independente de  $\text{Ca}^{2+}$ , envolvendo a reversão do seu transportador, de forma análoga ao que já foi descrito com outros neurotransmissores (Bernath; Zigmond, 1988; Hanania; Johnson, 1998).

Os estudos pioneiros do transporte reverso do GABA foram conduzidos usando estímulos não fisiológicos, por se acreditar que esse mecanismo estaria presente apenas em condições patológicas, como na epilepsia e na isquemia (Levi; Raiteri, 1993; Moscovitz; Cutler, 1980; Nicholls; Attwell, 1990; Pin; Bockaert, 1989). Entretanto, publicações recentes demonstraram sua ocorrência em condições fisiológicas, como, por exemplo, na despolarização neuronal normal, no aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular ou em pequenos aumentos na concentração extracelular de potássio (Bernath; Zigmond, 1988; Gaspary; Wang; Richerson, 1998)

Localizado na membrana pré-sináptica e nas células da glia, esse transportador é conhecido há anos pela sua função primária de captar o GABA liberado na fenda sináptica,



finalizando, assim, a ação do neurotransmissor (Dodd et al., 1989). São proteínas da família dos transportadores dependentes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , da qual também fazem parte diversas subfamílias, como os transportadores de colina, monoaminas, taurina, glicina. Constituído por resíduos de 600 aminoácidos e apresentando peso molecular próximo de 80 KDa, o transportador de GABA possui doze domínios transmembrana. Apresenta uma larga alça entre os domínios 2 e 4, que atua como um sítio de glicosilação, importante para sua inserção na membrana plasmática (Jursky et al., 1994). Ao longo de toda sua estrutura, parece conter três sítios de fosforilação pela proteína quinase C e um sítio pela proteína quinase A, que possivelmente atuam na regulação funcional do transportador (Worrall; Williams, 1994).

Estudos com técnicas imunocitoquímicas localizaram os transportadores de GABA em várias regiões, como cerebelo, hipocampo, substância negra e córtex cerebral. Também mostraram que esses transportadores estão concentrados no terminal axonal ou em processos gliais, mas estão ausentes nos dendritos (Gadea; Lopez-Colomé, 2001; Radian et al., 1990).

Atualmente, postula-se a existência de quatro subtipos de GAT. A nomenclatura é bem confusa e variável, dependendo da espécie a partir da qual a proteína foi clonada. Em ratos e humanos, recebem a nomenclatura GAT-1, BGT-1, GAT-2 e GAT-3. O GAT-1 é considerado neurônio- específico. (Nelson,1998). É inibido por SKF 89976A e insensível à inibição pela  $\beta$ -alanina. (Krause; Schwarz, 2005). O BGT-1 é expresso também em células não neuronais de tecidos periféricos e também pode carrear a betaína (Gadea; Lopez-Colomé, 2001). Já o GAT-2 e GAT-3 são localizados predominantemente nas células da glia e são inibidos pela  $\beta$ -alanina (Borden et al.,1995).

O mecanismo de ação desses transportadores dependentes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  é complexo e envolve um gradiente eletroquímico direcionado pelo co-transporte iônico. A estequiometria desse sistema são 2 íons  $\text{Na}^+$  e 1 íon  $\text{Cl}^-$  para cada molécula de substrato transportada (Schousboe et al. 1981). Isso resulta em um transporte eletrogênico, capaz de gerar uma diferença de concentração na ordem de  $10^5$  entre o GABA intra e extracelular (Kavanaugh et al., 1992). O  $\text{Na}^+$  parece estar associado a alterações conformacionais do transportador, que aumentaria sua afinidade ao GABA. Por outro lado, o  $\text{Cl}^-$  parece facilitar a ligação do  $\text{Na}^+$  a alguns subtipos de transportadores GABAérgicos (Marger et al, 1996). O retorno do

transportador à sua conformação original ocorre pela modificação do potencial transmembrana (Cao; Pagar; Lister, 1997; Nelson, 1998).

Ao ser liberado na fenda sináptica, a maior concentração extracelular de GABA e as alterações iônicas que acompanham esse evento direcionam o transportador no sentido da captação do seu substrato. Essa captação vai ocorrer até que o transportador volte a sua condição de equilíbrio, o que geralmente ocorre antes mesmo que todo o GABA seja recaptado (Wu, Wang, Richerson, 2006).

Além dessa importante função no transporte do transmissor, alguns estudos detectaram correntes iônicas não acopladas à translocação de substrato, sugerindo que o transportador de GABA pode também funcionar como canal iônico. Assim, parece estar envolvido na regulação da osmolaridade da célula e do potencial transmembrana. Entretanto, a relevância desse mecanismo ainda permanece desconhecida (Cammack; Schwartz, 1996; Sonders; Amara, 1996).

### **1.2.3 Receptores GABAérgicos**

Após sua liberação, o GABA pode atuar através de seus receptores específicos, localizados na membrana pré e pós-sináptica. O envolvimento dos anestésicos inalatórios sobre esses receptores também tem sido estudado nos últimos anos (revisto por Orser; Canning; MacDonald et al., 2002 e Son, 2010).

Os receptores inotrópicos GABA-A e GABA-C mostram similaridades em sua composição e apresentam uma ação mais rápida. Constituem proteínas pentaméricas transmembrana com diferentes montagens entre seus monômeros. Suas subunidades apresentam alças citoplasmáticas que exibem sítios de fosforilação de proteínas quinases. (Bormann, 2000; Cutting et al., 1991; Garret et al., 1997). A composição dessas subunidades pode alterar as propriedades biofísicas desses receptores e a sensibilidade a drogas (Barnard et al., 1998). Quando ativados, esses receptores abrem um canal permeável ao  $Cl^-$ , levando ao influxo desse íon, com conseqüente hiperpolarização da célula (Son, 2010). Em relação ao receptor GABA-A, o GABA-C é menos abundante e sofre dessensibilização mais fraca na presença de altas concentrações de agonista (Lu; Huang, 1998).

O melhor entendimento da farmacologia do GABA-A tem levado a diversas estratégias para tratamento de doenças neurológicas como epilepsia e insônia. Os benzodiazepínicos atuam como moduladores desses receptores, aumentando a probabilidade de abertura dos canais. Os barbitúricos, por sua vez, aumentam o período em que esses canais permanecem abertos (Son, 2010).

O receptor GABA-B é metabotrópico e, assim, modula canais de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  por meio da ativação da proteína G, tendo então uma ação mais lenta em relação aos receptores ionotrópicos. Tem uma ampla distribuição no SNC e periférico, estando envolvido em uma variedade de processos fisiológicos, como secreção de ácido gástrico, regulação do sono REM (Rapid Eyes Movement), susceptibilidade à convulsões, resposta nociceptiva, atividade motora e memória (Jones et al., 2000; Piqueras; Martinez, 2004; Schuler; Luscher; Blanchet, 2001; Ulloor et al., 2004). Esse receptor pode funcionar como auto-receptor, quando localizado na membrana pré-sináptica, inibindo a liberação de vesículas sinápticas através da supressão de subtipos de canais de cálcio (Harayama et al., 1998). Além disso, também foi demonstrada sua ação inibitória pós-sináptica, pelo aumento da condutância de canais de  $K^+$  (Gahwiler; Brown, 1985).

### **1.3 Liberação de GABA induzida pelos anestésicos inalatórios**

Alterações no balanço entre a transmissão excitatória mediada pelo glutamato e a transmissão inibitória do GABA parece estar relacionado à ação dos anestésicos gerais (Hemmings, 2009). Já está bem estabelecido a associação desse aumento do tônus GABAérgico com os efeitos pós sinápticos e extra-sinápticos do receptor GABA-A (Hemmings, et al. 2005). Entretanto, o efeito de potencializar esse receptor é insuficiente para explicar a ação dos anestésicos inalatórios (Liao; Sonner; Judg, 2005). Isso ficou mais claro a partir de um estudo feito em ratos, que não demonstrou perda do efeito do isoflurano sobre a imobilização na presença da bicuculina, um antagonista do receptor GABA-A. (Zhang, et al; 2004).

Muitos autores já demonstraram aumento da liberação de GABA induzido por anestésicos inalatórios (Murugaiah; Hemmings, 1998; Bank; Pearce, 1999). Esses estudos utilizaram tanto técnicas de sinaptosomas, em que se obtém o terminal nervoso isolado, como também técnicas de fatias, em que se preservam as conexões do terminal com as células da glia, com o corpo neuronal e entre os neurônios ao redor. Entretanto, anestésicos inalatórios podem alterar a liberação de neurotransmissores atuando por diferentes vias, já que podem se ligar aos canais iônicos (Study, 1994; Franks; Honoré, 2004), proteínas do complexo SNARE (Nagele et al., 2005) ou a qualquer outra proteína da membrana. Nesse contexto, alguns estudos sugerem que o sistema pré-sináptico de captação de neurotransmissores, incluindo o GABA, pode ser um alvo molecular de ação dos anestésicos inalatórios (Sugimura et al., 2001).

Nos últimos anos, tem sido estudado o efeito dos anestésicos inalatórios sobre os diferentes transportadores de neurotransmissores, presentes na membrana neuronal. Shahani; Lingamaneni; Hemmings (2002) observaram que a captação de DA foi inibida pelo halotano e isoflurano em células LLC-PK1 transfectadas com transportador de dopamina (DAT) humano. Em 2007, nosso grupo de pesquisa publicou estudos sugerindo que o aumento da liberação de dopamina induzido por sevoflurano e halotano em fatias córtex de ratos envolve o transportador de monoaminas (Silva et al., 2007; Diniz et al, 2007). Também há evidências do envolvimento do transportador na liberação de serotonina induzida pelo halotano em fatias de córtex cerebral de ratos (Silva, et al. 2008). Em relação ao transportador de GABA, alguns autores mostraram sua inibição induzida pelos anestésicos venosos propofol e etomidato em sinaptosomas do estriato de ratos (Mantz; Lechary; Laudénbach, 1995), mas ainda há poucos estudos disponíveis.

Diante de tantos sítios prováveis de atuação, percebe-se a necessidade de mais estudos para tentar elucidar os mecanismos envolvidos no efeito dos anestésicos na liberação de neurotransmissores.

## **2- Objetivos**

## **2.1 Objetivo Geral**

- Investigar o efeito do anestésico inalatório sevoflurano na liberação de GABA em córtex cerebral de ratos.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar se diferentes concentrações do sevoflurano interferem na liberação de GABA em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar se o efeito do sevoflurano na liberação de GABA em fatias de córtex cerebral de ratos é dependente do tempo de incubação.
- Investigar o envolvimento do íon  $\text{Ca}^{2+}$  extra e intracelular na liberação de GABA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar a participação dos canais de  $\text{Na}^+$  sensíveis à TTX na liberação de GABA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar o papel do transportador de GABA na liberação de GABA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar o envolvimento dos transportadores de GABA presentes na membrana das células da glia no efeito do sevoflurano na liberação de GABA em fatias de córtex cerebral de ratos

## **3- Materiais e Métodos**

### 3.1 Drogas e reagentes

Reagentes e toxinas obtidos da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA:

- Tetrodotoxina C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>
- EGTA, C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>
- BAPTA-AM, C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>
- Ácido Aminoxacético C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>
- β- alanina
- POPOP, C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- PPO, C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO
- SKF 89976A C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>.HCl

O Sevoflurano foi gentilmente fornecido por Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

Reagentes obtidos da Reagen-Quimiobras Indústrias Químicas do Brasil:

- Cloreto de potássio, KCl.
- Alcool polivinílico

Reagentes obtidos da Merk S.A Indústrias Químicas:

- Cloreto de sódio, NaCl.
- Sulfato de magnésio, MgSO<sub>4</sub>.(7H<sub>2</sub>O).
- Glicose, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.
- Tolueno, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>.
- Cloreto de cálcio dihidratado, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.



- Ácido clorídrico, HCl.
- Álcool etílico, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH.
- Fosfato diácido de potássio, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Hidróxido de sódio, NaOH.
- Tris(hidroximetil)aminometano (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>
- Tritom, C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>.

Os reagentes obtidos do Grupo Química Indústria Ltda, Brasil.

- Naftaleno, C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>.
- Dioxana, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>.

Substância obtida da Amersham Pharmacia Bioetech UK Limited, England:

- Acido 4- aminobutirico n- [ 2,3- <sup>3</sup>H(N)], atividade específica 84 Ci/mmol

### 3.2 Soluções

Meio de incubação 1

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,35 mM
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).	1,2 mM
Glicose	5,5 mM
Tris	10 mM
Ácido Aminoxacético	100mM

pH 7.4 ajustado com KCl 0,1 N

Obs: Ácido aminoxacético: droga inibidora da degradação do GABA.

Solução 2:

Solução de [<sup>3</sup>H]-GABA, contendo aproximadamente 0,20 µCi de [3H]GABA em 2000 mL do meio de incubação (solução 1)

Líquido de cintilação (solução de Bray modificado)

- Álcool etílico 30% v/v
- Dioxana 30% v/v
- Tolueno 30% v/v
- Naftaleno 7% p/v
- POPOP 0,02% p/v
- PPO 0,5% p/v
- Triton 10% v/v

### 3.3 Animais

Foram utilizados ratos adultos da raça Wistar (180-200 gramas), de ambos os sexos, fornecidos e criados no CEBIO, Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### **3.4 Determinação da liberação de GABA em fatias de córtex cérebral de ratos**

#### **3.4.1 Obtenção das fatias de córtex cerebral de ratos**

Ratos adultos da raça Wistar eram decaptados para remoção do encéfalo. Dissecava-se rapidamente o córtex cerebral em superfície de uma placa de petri, que era recoberta com papel de filtro umedecido com solução (meio de incubação 1). Tudo era feito sobre o gelo para melhor preservação do tecido.

O córtex era então fatiado em frações de 0,5mm usando um fatiador de tecidos. Essas fatias eram pesadas em balança de torção para dividi-las em alíquotas de 40mg. Essas alíquotas eram colocadas em frascos contendo meio de incubação com cerca de 0,25 mCi de [3H]-GABA. Sempre que estavam em condições de repouso, os frascos ficavam sobre o gelo.

#### **3.4.2 Marcação das fatias com [<sup>3</sup>H] GABA**

Os frascos, que continham as fatias em meio de incubação com a solução radioativa, eram transferidos para um banho com agitação (120 rpm). As fatias eram pré- incubadas a 37°C durante cinco minutos e posteriormente incubadas por 30 minutos com [3H]-GABA (atividade específica 94,0 Ci/mmol). Após a marcação, as fatias foram transferidas para tubos de centrífuga que já se encontravam no gelo e, logo após, centrifugadas a 6000 rpm (3300 g) por cinco minutos, a 4°C.

#### **3.4.3 Lavagem das fatias**

Depois da retirada dos tubos da centrífuga, o sobrenadante era desprezado e o precipitado contendo os “pellets” com as fatias eram lavados com 2,0 mL de solução (meio de incubação 1). Toda essa etapa de centrifugação e lavagem era repetida três vezes, para retirar o [3H]-GABA inespecificamente ligado ao tecido.

#### 3.4.4 Incubação das fatias

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. O “pellet” com as fatias eram colocados em 2,0 mL de meio de incubação e transferidos novamente para frascos de vidro. As amostras eram, então, levadas ao banho com agitação (120 rpm) à temperatura de 37°C e pré-incubadas durante 5 minutos. Após esse período, seguia-se o tempo de incubação. Era nesta fase que as fatias entravam em contato com o anestésico e as drogas a serem testadas. Vale destacar que, em situações específicas a serem mencionadas mais adiante, as drogas eram colocadas minutos antes da adição do anestésico. Em experimentos para testar a influência de baixas temperaturas, parte das amostras foram levadas em banho com a temperatura especificada (17°C), também nesta etapa. A duração da fase de incubação das fatias foi obtida a partir de uma curva com diferentes tempos de incubação, conforme discutido em outra seção.

#### 3.4.5 Administração e mensuração da concentração do sevoflurano

Soluções estoques saturadas com sevoflurano eram preparadas a cada experimento e obtidas da seguinte maneira: 10 ml do meio de incubação foram equilibrados com o anestésico estudados na forma líquida (100, 200, 400, 600, 800, ou 1600µl) a 37°C em frascos de vidro, hermeticamente fechados por 30 minutos. Em seguida, utilizando-se uma seringa de vidro, 500µl da solução estoque saturada com sevoflurano foram adicionadas aos frascos de vidro contendo 2,0 mL de meio de incubação a 37°C após 5 minutos de pré-incubação. Após a administração do anestésico, os frascos foram, então hermeticamente fechados, agitados e incubados por até 30 minutos. A saturação da solução estoque e a concentração aquosa do sevoflurano e no meio de incubação após 30 minutos foram confirmadas após a extração com n-heptano utilizando-se o princípio da cromatografia gasosa (Rutledge e cols, 1963). Com esse objetivo, utilizamos um cromatógrafo a gás Hewlett Packard Series II-Modelo 5890 equipado com uma coluna capilar (HP1:SE-30;35 metros de comprimento; diâmetro interno 20 mm; espessura de filme de 0,33 µm; temperatura máxima: 325°C), onde um microlitro da

solução estoque ou do meio de incubação era introduzido diretamente através de um septo (elastômero). As condições de separação incluíam uma análise cromatográfica à temperatura constante da coluna (30°C) e uma mistura de hidrogênio (fluxo:35, 350 e 30 ml /min, respectivamente) como gás carreador (Silva et al. 2005).

#### 3.4.6 Concentração da radioatividade e do sobrenadante

Após o período de incubação, os frascos eram novamente retirados do banho e o material transferido em seguida para um tubo de centrífuga. Após a centrifugação (3300g por 5 minutos, a 4°C), o sobrenadante era colocado em tubo de ensaio e 100µL desta solução era transferido para um microtubo (eppendorf) contendo 1000µL de solução de Bray. A radioatividade era contada no espectrofotômetro de cintilação líquida durante 10 minutos. Em estudos prévios, foi realizado uma cromatografia da fração do sobrenadante. Isso demonstrou que aproximadamente 95% da radioatividade presente é [<sup>3</sup>H]-GABA (Goodchild 1973; Nicolato, 2002). O termo liberação de GABA foi utilizado para indicar a quantidade de [<sup>3</sup>H]-GABA presente no sobrenadante após a liberação pré-sináptica e que não foi captada pelo sistema de captação (neurônio e glia).

#### 3.4.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram obtidos, analisados e expressos de duas formas: a primeira pela contagem da radioatividade do sobrenadante em que se utilizou a liberação de [<sup>3</sup>H]-GABA em dpm/mg de tecido. Representa a média das amostras, feitas em duplicata, repetidas no mínimo três vezes (em dias diferentes),  $\pm$  o erro padrão da média (EPM) subtraído o valor do [<sup>3</sup>H]-GABA liberada nos frascos mantidos em gelo. Na segunda forma, expressamos a radioatividade do sobrenadante pelo delta ( $\Delta$ ) de liberação de [<sup>3</sup>H]-GABA. Representa a liberação de [<sup>3</sup>H]-GABA em dpm/mg de tecido (conforme citado anteriormente) na presença de drogas (anestésicos ou outros agentes) subtraída da liberação de [<sup>3</sup>H]-GABA em dpm/mg de tecido obtida nas condições controle definidas em cada experimento.

Os resultados foram analisados por análise de variância ANOVA ou pelo teste “t-student”, quando indicado. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O programa de computador utilizado na elaboração dos gráficos, análise estatística e cálculo para o  $EC_{50}$  foi o GraphPad Prism Versão 4.

## **4- Resultados**

#### **4.1 Liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos induzida por sevoflurano**

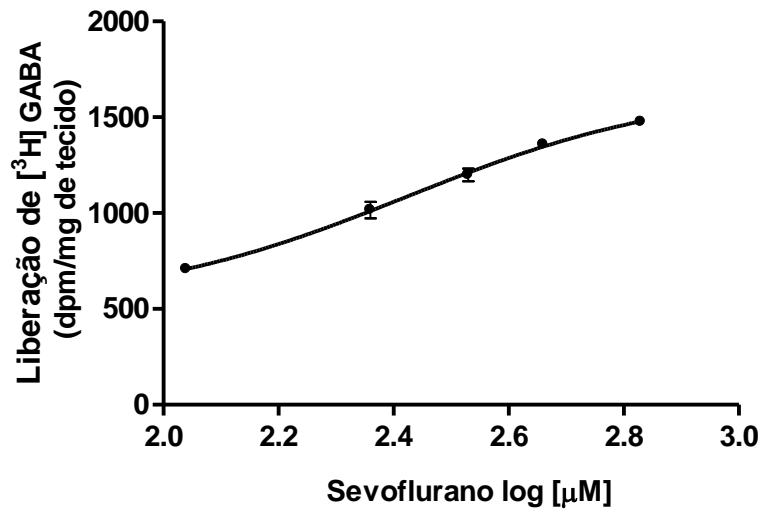
Para investigar o efeito do sevoflurano na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos, essas fatias foram incubadas com diferentes concentrações do anestésico.

As fatias de córtex cerebral de ratos foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C e, subseqüentemente, estimuladas com concentrações crescentes de sevoflurano (0,058, 0,11, 0,23, 0,46 e 0,93 mM) durante 20 minutos. Os resultados foram agrupados na figura 02, que traz a curva dose resposta do sevoflurano.

Pode-se notar que o sevoflurano foi capaz de induzir um aumento na liberação de [<sup>3</sup>H]-GABA de uma maneira dependente da concentração do anestésico. Nota-se que, em relação ao controle, o sevoflurano aumentou significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]-GABA ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações utilizadas. O  $EC_{50}$  calculado (concentração efetiva capaz de obter 50% da liberação máxima) foi de 0,265 mM.

Apesar de observamos um efeito dose dependente, a curva tende a se estabilizar após a concentração de 0,230 mM ( $1198,67 \pm 33,57$  dpm/mg de tecido). Dessa forma, selecionamos a concentração de 0,11 mM de sevoflurano (liberação de  $1016 \pm 43,3$  dpm/mg de tecido), nos experimentos subseqüentes, para investigar o mecanismo pelo qual o anestésico induziu liberação de GABA. Considerando que no grupo controle houve liberação de  $359,33 \pm 19,1$  dpm/mg de tecido (dado não representado no gráfico), pode-se notar que na concentração de 0,11 mM, o anestésico aumentou a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em 2,83 vezes em relação ao controle.





**Figura 02: Dose-resposta do sevoflurano na liberação de [ $^3$ H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos**

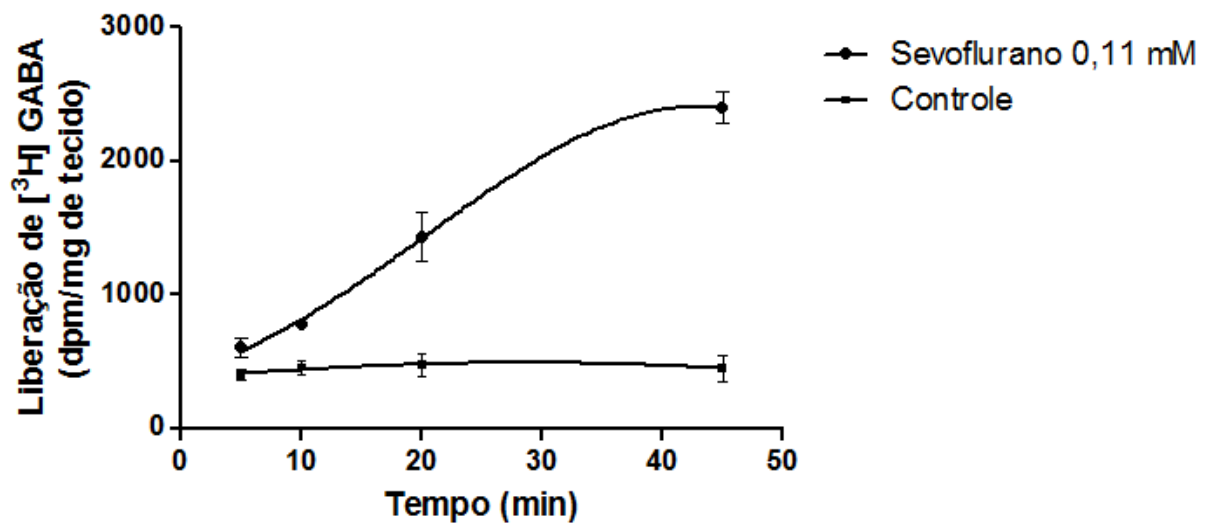
Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [ $^3$ H]GABA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano nas concentrações de 0,058, 0,11, 0,23, 0,46, 0,93 mM, durante 20 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicatas.

#### **4.2 Efeito do tempo de incubação do sevoflurano na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos**

Para determinar a relação entre a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA e o tempo de incubação das fatias com o sevoflurano, as amostras foram incubadas com o anestésico por diferentes períodos. As fatias de córtex cerebral de ratos foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 5, 10, 20, e 45 minutos à 37°C. A Figura 03 mostra que a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo sevoflurano é diretamente proporcional ao tempo de incubação.

A curva de liberação foi crescente, com tendência um platô em torno de 45 minutos. O tempo de incubação escolhido para ser utilizado nos próximos experimentos foi de 20 minutos, que se encontra na fase de ascensão rápida da curva obtida. Nesse tempo, a média de liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo anestésico foi de  $1433,33 \pm 76$  dpm/mg de tecido, enquanto no grupo controle houve liberação média de  $473,33 \pm 13$  dpm/mg de tecido. Isso mostra que o sevoflurano aumentou em 3,02 vezes a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em relação ao controle.

Importante notar que nesta etapa de experimentos a média de liberação de GABA foi maior do que observada nos experimentos da curva de concentração. Entretanto, a proporção de liberação não sofreu alteração significativa ( $2,83 \times 3,02$ ). Isso pode ser considerado uma característica do método usado para contagem da radioatividade.



**Figura 03: Curva de tempo de incubação do sevoflurano na liberação de  $[^3\text{H}]$ GABA em fatias de córtex cerebral de ratos**

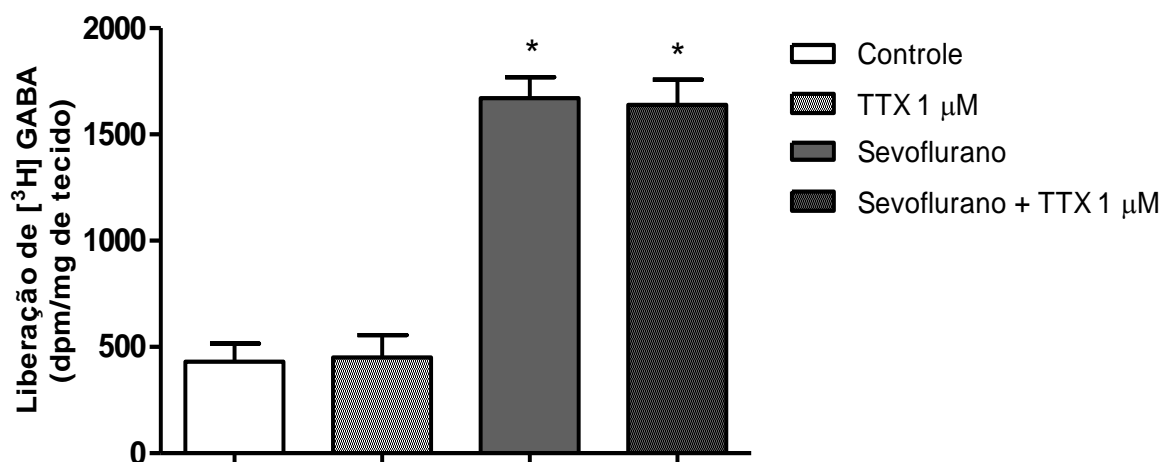
Fatias de córtex cerebral de ratos (40mg) marcadas com  $[^3\text{H}]$ GABA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a  $37^\circ\text{C}$  e, subseqüentemente, estimuladas ou não com sevoflurano (0,11 mM) durante 5, 10, 20, e 45 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicatas.

### **4.3 Participação dos canais de Na<sup>+</sup> sensíveis à TTX na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

A excitose é deflagrada primariamente pelo influxo de Na<sup>+</sup> para o meio intracelular. Essa onda de despolarização vai provocar alteração no potencial de ação da membrana, ativando a cascata de eventos que resultará na liberação dos neurotransmissores armazenados em vesículas. Assim, a liberação de GABA induzida pelo anestésicos poderia estar relacionada com alterações na entrada desse íon através de canais sensíveis à voltagem.

Para investigar esta hipótese, utilizou-se a tetrodotoxina (TTX), potente inibidor de canais para Na<sup>+</sup> sensíveis à voltagem, que bloqueia a geração e a propagação do potencial de ação em tecidos excitáveis (Moore; Narahashi, 1967).

As fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência de TTX (1 µM) e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos. A Figura 04 mostra que a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo anestésico sevoflurano não foi afetada pela TTX (p>0,05), sugerindo que a resposta do anestésico é independente da despolarização de membrana.



**Figura 04: Efeito da TTX na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]GABA foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de TTX (1 μM) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

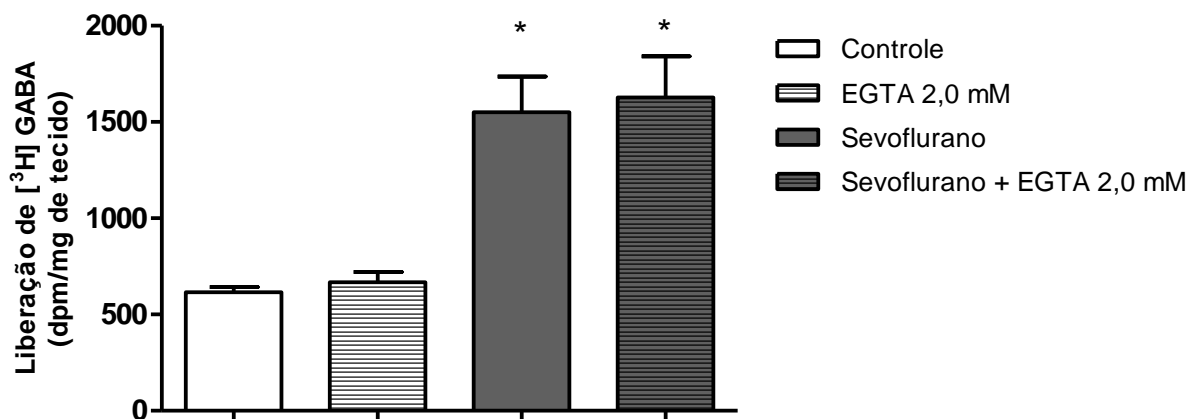
\* estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05)

#### **4.4 Envolvimento do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular na liberação de [ $^3\text{H}$ ]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos**

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de  $\text{Ca}_v$ s deflagra a exocitose com conseqüente liberação do neurotransmissor (Katz; Miledi, 1967; revisto por Neher, 1998). Assim, para avaliar a participação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na liberação de [ $^3\text{H}$ ]GABA induzida pelo sevoflurano (0,11 mM), as fatias de córtex cerebral de ratos foram incubadas em meio contendo EGTA, um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram colocadas em meio de incubação com ou sem  $\text{CaCl}_2$ . Quando não se colocava  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de incubação, era adicionado EGTA (2,0mM). As fatias eram pré-incubadas durante 15 minutos, após o qual as mesmas foram estimuladas com sevoflurano (0,11mM) durante 20 minutos.

A Figura 05 mostra que a liberação de [ $^3\text{H}$ ]GABA induzida pelo anestésico sevoflurano não foi alterada pela presença do EGTA ( $p>0,05$ ).



**Figura 05: Efeito do EGTA na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]GABA foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de EGTA (2,0mM) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

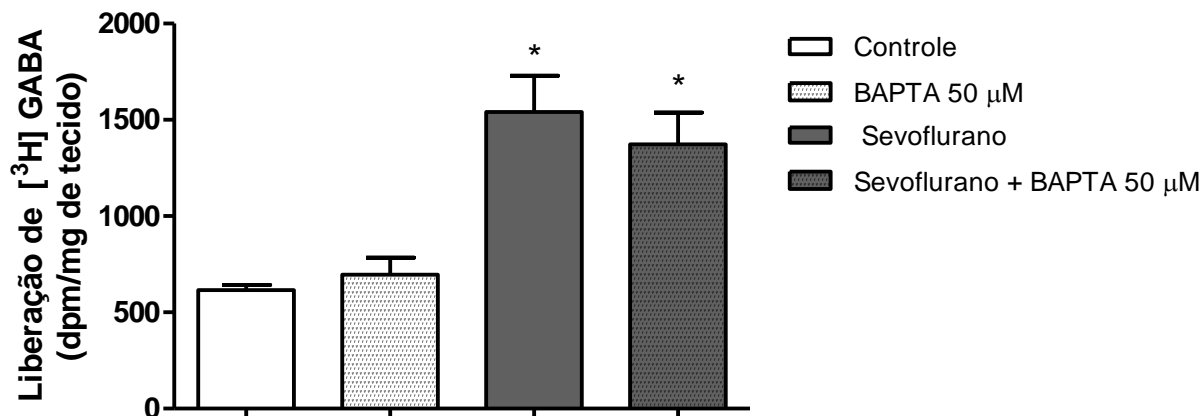
\* estatisticamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ )

#### 4.5 Envolvimento do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular na liberação de [ $^3\text{H}$ ]GABA induzida por sevoflurano

Há evidências de que a excitose pode ser desencadeada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente dos estoques intracelulares (Tse e cols., 1997; Berridge, 1998). Assim, para avaliarmos a participação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular na liberação de [ $^3\text{H}$ ]GABA induzida pelo anestésico, foi utilizado o BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ), um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Adler e cols, 1991). Nesses experimentos as fatias de córtex cerebral de ratos foram pré-incubadas em meio de incubação por 30 minutos na presença ou ausência de BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ) e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos. O BAPTA era colocado apenas em meio de incubação sem  $\text{Ca}^{2+}$ .

De acordo com os dados mostrados na Fig. 06, essa droga também não interferiu na resposta dos anestésicos ( $p > 0,05$ ).





**Figura 06: Efeito do BAPTA-AM na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]GABA foram pré-incubadas por 30 minutos na presença ou ausência de BAPTA-AM (50 μM) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* estatisticamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ )

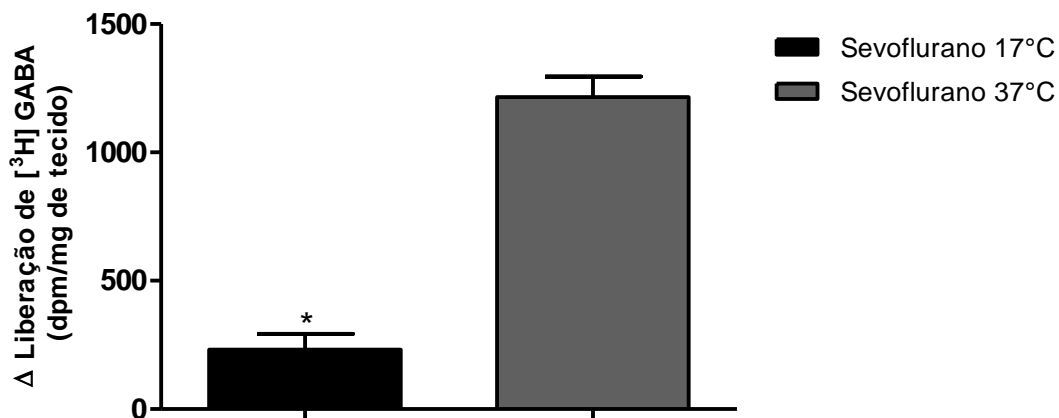
#### **4.6 Liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo sevoflurano em córtex cerebral de ratos em baixas temperaturas**

Além da função de recaptar o GABA liberado na fenda sináptica, interrompendo assim a ação deste sobre seus receptores, o GAT pode também operar de modo reverso e, assim, aumentar a liberação do neurotransmissor (Wu et al., 2007). Essa liberação mediada pelo transportador é Ca<sup>2+</sup> independente e parece estar envolvida não só em condições patológicas, mas também fisiológicas (Gaspary et al, 1998).

Em 1999, Vizi e Sperlágh mostraram que condições de temperaturas baixas (12-17°C) são uma ferramenta confiável para separar a exocitose da liberação mediada pelo transportador transmembrana. Nessas condições, a liberação vesicular não é afetada, enquanto o funcionamento do carreador é inibido.

Baseado nisso, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C ou 12°C, e subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11mM) durante 20 minutos, em banho com as respectivas temperaturas.

Os resultados, mostrados na figura 07, mostram que a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos em meio de incubação a 17 °C foi significativamente reduzida, sendo obtida uma inibição média de 82,17% (p<0,001).



**Figura 07 : Liberação de [3H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (17 °C)**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [3H]GABA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C ou 17 °C, e subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos, em meio com as respectivas temperaturas. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [3H]GABA que corresponde à seguinte relação:

sevoflurano 37°C - controle 37°C

sevoflurano 17°C - controle 17°C

\* estatisticamente diferente do sevoflurano 37°C.

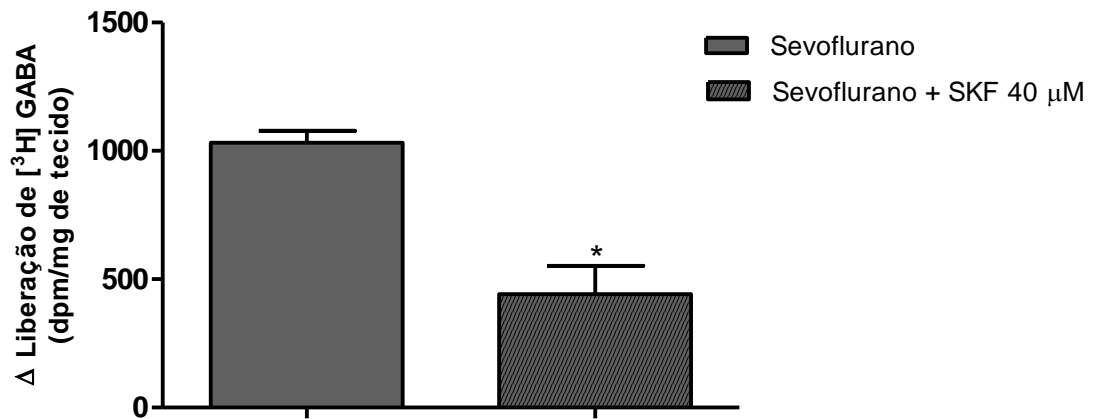
#### **4.7 Liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de SKF 89976A**

Adicionalmente, para avaliar o envolvimento do GAT na liberação de induzida pelo sevoflurano, foi utilizado outra estratégia farmacológica: o bloqueio direto do transportador por seu inibidor.

Como citado anteriormente, o GAT-1 é o transportador de GABA considerado neurônio específico, localizado no terminal pré sináptico dos neurônios de ratos e humanos. (Nelson, 1998). Na última década, foi desenvolvido um inibidor específico e potente do GAT-1, denominado SKF 89976A (Jin; Paré; Smith, 2011), utilizado então nesta etapa.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 20 minutos em meio de incubação na presença ou ausência de SKF 89976A (40µM) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos.

Os resultados, representados na figura 08, mostram que a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos foi reduzida em 57,22% na presença do inibidor do GAT-1.



**Figura 08: Efeito do SKF 89976A, um inibidor do GAT-1, na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]GABA foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência de SKF 89976A (40µM) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [<sup>3</sup>H]GABA, que corresponde à seguinte relação:

- sevoflurano - controle

- (sevoflurano + SKF 89976A) - SKF 89976A

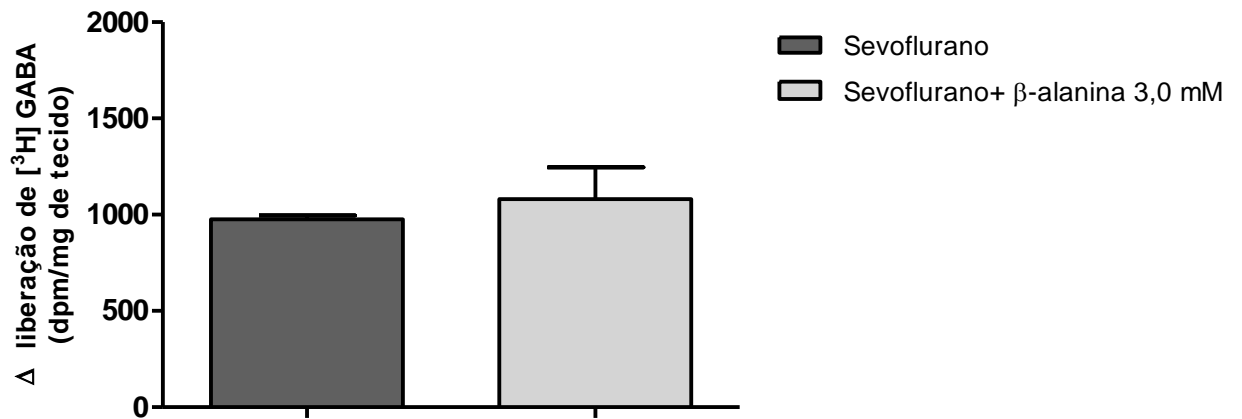
\* Estatisticamente diferente do sevoflurano.

#### **4.8 Envolvimento das células da glia na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de rato**

Como a técnica de fatias preserva as conexões do terminal nervoso com os corpo neuronal, com os neurônios ao redor e as células da glia, esta técnica permite também estudar o envolvimento das células da glia na liberação do GABA, visto que também apresentam a maquinaria para síntese, liberação, transporte e catabolismo deste neurotransmissor (Ângulo et al.,2008; Hemmings, 2009). Os transportadores expressos na membrana das células da glia são o GAT-2 e GAT-3, inibidos pela  $\beta$ -alanina (Borden et al.,1995).

Dessa forma, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 30 minutos em meio de incubação na presença ou ausência de  $\beta$ -alanina e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos.

Os resultados, expressos na figura 09, mostram que a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos não foi alterada na presença do inibidor dos transportadores de GABA localizados na membrana das células da glia. ( $p>0,05$ )



**Figura 09: Efeito da β-alanina, um inibidor do GAT-2 e GAT-3, na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]GABA foram pré-incubadas por 30 minutos na presença ou ausência de β-alanina (3,0 mM) e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,11 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [<sup>3</sup>H]GABA, que corresponde à seguinte relação:

- sevoflurano - controle
- (sevoflurano + β-alanina) - β-alanina

p>0,05.

## **5 - Discussão e conclusões**



Muitos estudos têm sido publicados tentando esclarecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação dos anestésicos inalatórios. Sabe-se que esses agentes atuam primariamente em sinapses e parece não afetar a condução axonal (Griffiths; Norman, 1993). Classicamente, envolve a potencialização da neurotransmissão inibitória, marcadamente as sinapses GABAérgicas, e depressão da neurotransmissão excitatória (Hemmings, 2009).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, presente principalmente em interneurônios, modulando a atividade de outras vias de neurotransmissão, como as vias glutamatérgicas. Várias drogas de importante aplicação clínica tem sua ação primária na neurotransmissão GABAérgica, que também está envolvida na fisiopatologia de diversas doenças neuropsiquiátricas, como citado previamente.

Dos vários alvos até então identificados, os receptores pós-sinápticos emergem como importante sítio de ação dos anestésicos no sistema GABAérgico. Já foi demonstrado que o receptor GABA-A sofre ação modulatória desses agentes, que podem, inclusive, ativar diretamente o receptor, mesmo sem a participação do GABA (Orser; Canning; MacDonald, 1998). Possivelmente, o GABA-A possui um sítio de interação alostérica com o anestésico, até então não identificado (McCracken et al., 2010).

Assim como observado com outros neurotransmissores, os anestésicos inalatórios também pode exercer efeitos pré-sinápticos, alterando a liberação de GABA (Murugaiah; Hemmings, 1998; Bank; Pearce, 1999). E, para exercerem esse efeito, existem vários alvos potenciais, que ainda estão sob investigação.

O presente estudo emerge deste contexto, tentando contribuir com o conhecimento do efeito dos anestésicos na liberação de neurotransmissores através de mecanismos pré sinápticos. Foi investigado o efeito do anestésico inalatório sevoflurano, amplamente utilizado nos procedimentos cirúrgicos, na liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos.

A técnica de fatias tem sido utilizada em diversos estudos, com particularidades que merecem ser destacadas. Nesta técnica, são preservadas as interações do terminal nervoso com os outros neurônios dispostos ao redor deste, inclusive conexões com outros sistemas de

neurotransmissores. Também são preservadas a integridade do neurônio, mantendo as conexões do terminal nervoso com o seu respectivo corpo neuronal. Além disso, é mantida a proximidade com as células da glia. Atualmente sabe-se que essas células desempenham uma função mais ativa no SNC além do papel de sustentação dos neurônios, tradicionalmente reconhecido (Ângulo et al. 2008). Particularmente, essas células possuem a maquinaria de síntese, armazenamento, liberação, transporte e catabolismo do GABA. (Koch & Magnusson, 2009), constituindo um alvo potencial para ação dos anestésicos.

Inicialmente, as fatias foram estimuladas com sevoflurano em diferentes concentrações (0,058, 0,11, 0,23, 0,46 e 0,93 mM). Os dados mostram que há aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]GABA de forma dose-dependente (Figura 02). Além disso, parece ser atingido um platô após uma determinada concentração do anestésico (0,23 mM). Importante destacar que a concentração de 0,11 mM, utilizada nos próximos experimentos, contribui para validação do nosso trabalho. Se fossem testadas altas concentrações dos anestésicos – bem maiores daquelas usadas na prática – poderiam ter sido recrutados alvos de ação que não estariam convencionalmente envolvidos nos efeitos clínicos da anestesia (Franks, 2006).

Outro ponto importante a ser destacado é que, nos experimentos realizados nesse trabalho, as amostras contendo as fatias, além de serem hermeticamente fechadas, foram estimuladas usando solução aquosa de sevoflurano, cuja concentração apresenta menor dependência da temperatura do meio em relação ao anestésico em sua forma gasosa (Franks; Lieb, 1994).

O aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]GABA é também dependente do tempo de incubação do anestésico (figura 03). Nesse experimento, as fatias foram incubadas com o sevoflurano por diferentes tempos (5, 10, 20 e 45 minutos). Seria interessante avaliar como se dá a variação da liberação do neurotransmissor dentro desses intervalos. Entretanto, a metodologia utilizada limita-se apenas a quantificar o [<sup>3</sup>H]GABA que permanece no meio extracelular ao final de cada tempo estipulado.

Após verificar que o sevoflurano induz a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos proporcionalmente à concentração e ao tempo de incubação com o agente, o

que é compatível com estudos divulgados previamente por outros autores, foram utilizadas estratégias farmacológicas para tentar avaliar os mecanismos moleculares envolvidos.

A exocitose é considerada o mecanismo clássico de liberação dos neurotransmissores. É uma forma de liberação dependente do aumento dos níveis citoplasmáticos do  $Ca^{2+}$ , que podem se originar do meio externo, pela entrada do íon através de seus canais dependentes de voltagem, ou mesmo do meio interno, a partir de seus estoques intracelulares localizados em organelas como o retículo sarcoplasmático, mitocôndria e retículo nucleoplasmático. (Berridge, 1998).

Outro íon primariamente envolvido na neurotransmissão é o  $Na^+$ . Sua entrada através de seus canais sensíveis à voltagem ( $Na_v$ ) leva à despolarização e à abertura dos  $Ca_v$ s, com consequente liberação vesicular de neurotransmissores (Jackson & Strange, 1995). Experimentos utilizando técnicas de eletrofisiologia indicam que os  $Na_v$  são alvos de ação dos anestésicos voláteis (Rehberg et al., 1996; Ratnakumari et al., 1998). No entanto, esse alvo parece não estar envolvido na ação do sevoflurano na liberação de GABA. Nossos resultados (Figura 04) mostram que a liberação de GABA induzida pelo sevoflurano não foi alterada pela presença do TTX, um bloqueador potente dos canais para  $Na^+$ , sugerindo que a liberação desse neurotransmissor induzida pelo anestésico é independente da despolarização de membrana.

Resultados semelhantes também foram obtidos por outros autores. Keita e colaboradores (1999) demonstraram que o halotano e o isoflurano aumentam a liberação de dopamina em fatias de corpo estriado pré-tratadas com TTX. Em 2007, Silva e cols mostraram que a liberação de dopamina em fatias de córtex de rato induzida por sevoflurano não é alterada pela droga.

Muitos estudos já mostraram que os  $Ca_v$ s são um possível alvo molecular para ação dos anestésicos na liberação de neurotransmissores. Em 1998, Xu e cols demonstraram que concentrações clinicamente relevantes do halotano ou isoflurano inibem os  $Ca_v$  2.2. Yamakage e colaboradores (1995) também demonstraram que esses anestésicos voláteis podem deprimir as correntes dos canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem e, conseqüentemente, inibir a transmissão sináptica. Por outro lado, Hall; Lieb; Franks (1994), investigando o efeito de vários

anestésicos inalatórios e intravenosos em células de purkinje do cerebelo, observaram que os  $Ca_v2.1$  são insensíveis a vários anestésicos gerais.

Nossos achados mostram que a liberação de [ $^3H$ ]GABA induzida pelo anestésico não foi alterada na presença do EGTA, um quelante do  $Ca^{2+}$  extracelular (Figura 05). Essa liberação independente do  $Ca^{2+}$  externo indica que os  $Ca_v$ s não estão envolvidos na ação desses agentes na liberação de [ $^3H$ ]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos. Dados semelhantes foram mostrados em estudos que investigaram o efeito de anestésicos na liberação de acetilcolina, dopamina e serotonina, que também não mostraram participação do  $Ca^{2+}$  extracelular (Gomez et al., 1999, 2000; Silva et al., 2005. Silva et al., 2007; Silva et al. 2008).

O aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ , a partir de seus estoques intracelulares, é outro mecanismo que pode exercer um papel importante na regulação da liberação de hormônios e neurotransmissores. Dessa forma, constituem potenciais alvo de ação dos anestésicos. De fato, vários trabalhos já mostraram que os anestésicos inalatórios estimulam a liberação deste íon a partir desses estoques intracelulares. Há estudos em vários modelos experimentais, incluindo, por exemplo, sinaptosomas de cérebro de camundongos (Daniell & Harris, 1988), fatias de hipocampo de ratos (Mody e cols., 1991) e em células SN56, linhagem que apresentam fenótipo colinérgico (Gomez e cols., 2001; Pinheiro e cols., 2006). Além disso, já foi observado que, em fatias de córtex cerebral de ratos, o aumento da liberação de acetilcolina induzida pelo sevoflurano, halotano e isoflurano pode ser devido ao aumento da [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> via estoques intracelulares (Gomez e cols., 1999, 2000; Silva e cols., 2005).

Sendo assim, para avaliar se o alvo molecular de ação do sevoflurano no aumento de [ $^3H$ ]GABA envolveria o  $Ca^{2+}$  liberado a partir de estoques intracelulares, utilizamos o quelante do cálcio intracelular, o BAPTA-AM (Adler e cols, 1991). Nossos resultados (Figura 06), mostram que a liberação de GABA induzida pelo anestésico não foi afetada pelo quelante, sugerindo que essa liberação, diferente da acetilcolina, é independente do cálcio proveniente de seus estoques intracelulares.

Os resultados até então apresentados indicam que a liberação de GABA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos é independente de  $Ca^{2+}$  e dos canais de  $Na^+$

sensíveis à voltagem. Isso sugere que a liberação não depende da despolarização da membrana e também não envolve os mecanismos de exocitose. Dessa forma, uma possibilidade é que o GABA estaria sendo liberado pela via não-vesicular, cálcio-independente, que envolve o transportador transmembrana de GABA.

Nos últimos anos, o papel do transportador de GABA na liberação desse neurotransmissor tem ganhado destaque. A liberação de GABA pelo transporte reverso pode limitar o dano celular causado pela exacerbação da neurotransmissão excitatória, fenômeno envolvido na isquemia neuronal (Attwell; Barbour; Szatkowski, 1993, Wu; Wang; Richerson, 2001). Alguns fármacos, inclusive com grande importância clínica, parecem interferir na liberação de GABA por meio dessa via. Por exemplo, o aumento da liberação de GABA com o uso do anticonvulsivante vigabatrina, um inibidor da enzima GABA-T, pode estar associado à reversão desse transporte. Ao inibir sua degradação, ocorre acúmulo do neurotransmissor no citoplasma. Esse conseqüente aumento da concentração citosólica de GABA predispõe o transporte reverso deste neurotransmissor mediado pelo carreador (Qume and Fowler, 1997; Wu; Wang; Richerson, 2001).

Dessa forma, foi estudado o envolvimento do transportador na liberação de GABA induzida pelo sevoflurano, utilizando duas diferentes estratégias. Uma envolve o bloqueio farmacológico do transportador, através dos antagonistas já descritos. A outra estratégia baseia-se nas características termodinâmicas do GAT.

Há evidências mostrando de que, em baixas temperaturas (12-17°C), somente o mecanismo exocitótico de liberação está operando, enquanto a liberação e a captação via transportador de membrana está inibida. Essa variação de temperatura demonstrou-se ser uma ferramenta confiável para diferenciar a liberação exocitótica da liberação mediada pelo carreador (Vizi, 1998).

A liberação de neurotransmissores através de transportadores de membrana é um processo ativo que requer, muitas vezes, energia e, portanto dependente de temperatura. Segundo Gerevick e colaboradores (2001) as propriedades da membrana plasmática em baixas temperaturas são alteradas e a rigidez da membrana está aumentada, dificultando a eficácia da liberação de neurotransmissores citoplasmáticos.

Dessa forma, foi avaliado a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA induzida pelo sevoflurano em condições de baixa temperatura do meio de incubação. Os achados (figura 07) mostram que essa liberação foi inibida em 82,17%, de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), comparada à liberação ocorrida à 37°C.

Em 2007, nosso grupo de pesquisa publicou trabalhos mostrando que a liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano era cálcio-independente, e também foi inibida em condições de baixas temperaturas, sugerindo o envolvimento do transportador da monoamina (Diniz et al., 2007; Silva et al., 2007).

Para confirmar a participação do GAT na liberação de GABA induzida sevoflurano, as fatias foram pré-incubadas na presença de SKF 89976A, inibidor do GAT-1, um subtipo de transportador de membrana considerado neurônio específico (Krause & Schwarz, 2005). Na presença dessa droga, observou-se uma significativa inibição na liberação de GABA induzida pelo sevoflurano (Figura 08), de aproximadamente 57,22%. O fato dessa inibição não ter sido maior pode sugerir o envolvimento do transportador BGT-1, que, apesar da menor importância, também pode ser expresso no SNC (Nelson, 1998). Entretanto, os inibidores do GAT até então conhecidos tem especificidade e efeito inibidor pequeno sobre esse subtipo de transportador, motivo pelo qual não foram testados nesse trabalho. (Soudijn & Wijngaarden, 2000).

Para excluir o envolvimento das células da glia como alvo de ação do sevoflurano na liberação de GABA em fatias de córtex de rato, foi usado a  $\beta$ -alanina, um inibidor específico dos transportadores gliocitários GAT-2 e GAT-3. A figura 09 mostra que a liberação de GABA induzida pelo anestésico não foi alterada na presença dessa droga ( $p > 0,05$ ).

A análise conjunta desses resultados sugere o envolvimento do transportador de GABA, presente na membrana dos neurônios, como alvo de ação do sevoflurano no aumento do neurotransmissor. Entretanto, por limitações técnicas, ainda não está esclarecido se há atuação direta do anestésico sobre o transportador. Wu; Wang; Richerson (2001) mostraram que essa liberação por transporte reverso pode ocorrer quando há aumento dos níveis citoplasmáticos de GABA,  $\text{Na}^+$  ou até mesmo  $\text{Cl}^-$ , ou, de forma análoga, quando há redução da concentrações extracelulares dessas substâncias. Como há varias formas indiretas de

aumento desse transporte reverso, não investigadas nesse trabalho, faz-se necessário mais estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos.

Então, conclui-se que o sevoflurano aumenta a liberação de [<sup>3</sup>H]GABA em fatias de córtex cerebral de ratos, de forma dose dependente, com relação direta ao tempo de incubação, sem envolvimento da excitose, mas com participação do transportador presente na membrana neuronal.

Essa conclusão segue a maioria dos três princípios apontados por Franks (2006) para identificação de mecanismos moleculares e celulares relevantes envolvidos na anestesia geral. O primeiro é a plausibilidade. De fato, a liberação de GABA, seja por excitose ou não, é um evento compatível com as linhas de investigação até então desenvolvidas. O efeito encontrado corresponde a uma concentração do anestésico que não é considerada alta, conforme já discutido, o que preenche o segundo critério. O terceiro critério, que corresponde à demonstração de diferentes potências entre os esteroisômeros do anestésico sobre o alvo molecular em investigação, não foi testado por limitações técnicas do presente estudo.

## **6- Referências Bibliográficas**



ADLER, E. M.; AUGUSTINE, G .J.; DUFFY, S. N.; & CHARLTON, M. P. (1991). Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J. Neurosci.***11**:1496-1507.

ALKIRE MT, POMFRETT CJ, HAIER RJ, GIANZERO MV, CHAN CM, JACOBSEN BP, FALLON JH (1999). Functional brain imaging during anesthesia in humans: effects of halothane on global and regional cerebral glucose metabolism. *Anesth.* **90(3)**:701-9.

ALKIRE MT, HAIER RJ (2001). Correlating in vivo anaesthetic effects with ex vivo receptor density data supports a GABAergic mechanism of action for propofol, but not for isoflurane. *Br J Anaesth.* **86**:618–626.

ANGULO MC, LE MEUR K, KOZLOV AS, CHARPAK S, AUDINAT E (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol.* **86(3)**:297-303.

ANTKOWIAK B (2001). How do general anaesthetics work? *Naturwissenschaften*, **88**:201-213.

ANTOIGNINI JF, WANG XW, CARSTENS E (2000). Isoflurane action in the spinalcord blunts electroencephalographic and thalamic-reticular formation responses to noxious stimulation in goats. *Anesth.* **92**:559-566.

ANTOIGNINI JF, CARSTENS E (2002). In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *Br J Anaesth.* **89**:156-166.

ATTWELL D, BARBOUR B, SZATKOWSKI M (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* **11**:401–407.

AWAPARA, J, LANDUA, AJ, FUERST R, SEALE B (1950). Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem.* **187**:35–39.

BANKS MI, PEARCE RA (1999). Dual actions of volatile anesthetics on GABA (A) IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesth.* **90**:120–34.

BARNARD EA, SKOLNICK P, OLSEN RW, MOHLER H, SIEGHART W, BIGGIO G (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* **50**:291-313.

BEHNE M, WILKE HJ, HARDER S (1999). Clinical pharmacokinetics of sevoflurane. *Clin Pharmacokinet.* **36(1)**:13-26.

BELEBONI RO, CAROLINO ROG, PIZZO AB, CASTELLAN-BALDAN L, COUTINHO-NETTO J, SANTOS WF, COIMBRA NC (2004). Pharmacological and Biochemical Aspects of GABAergic Neurotransmission: Pathological and Neuropsychobiological Relationships. *Cell Mol Neurob.* **24(6)**:707-727.

BELEBONI, RO., PIZZO, AB., FONTANA, ACK., CAROLINO, ROG, COUTINHO- NETTO, J, SANTOS, WF. (2004). Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European Journal of Pharmacology.* **493**, 1 – 17.

BERNATH S, ZIGMOND MJ (1988). Characterization of [3H] GABA release from striatal slices: Evidence for a calcium-independent process via the GABA uptake system. *Neuroscience* **27**: 563–570.

BERRIDGE, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**: 13-26

BORDEN LA, SMITH KE, GUSTAFSON EL, BRANCHEK TA., WEINSHANK RL (1995). Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J Neurochem.* **64**:977–984.

BORGES M, ANTOGNINI JF (1994). Does the brain influence somatic responses to noxious stimuli during isoflurane anesthesia? *Anesth.* **81**:1511-1515.

BORMANN, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**:16–19.

CAMMACK JN, SCHWARTZ EA (1996). Channel behavior in a gamma-aminobutyrate transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:723–727.

CAMPAGNA JA, MILLER KW, FORMAN SA (2003). Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med.* **348**: 2110–2124.

CAO Y, PAGER S, LESTER HA (1997). H<sup>+</sup> permeation and pH regulation at a mammalian serotonin transporter. *J Neurosci.* **17**:2257–2266.

CARIANI P (2000). Anesthesia, neural information processing, and conscious awareness. *Conscious Cogn.* **9**:387–395.

CHAPMAN ER, DAVIS AF (1998). Direct interaction of a Ca<sup>2+</sup>-binding loop of with lipid bilayers. *J Biol Chem.* **273(22)**:13995-4001.

CHAPMAN ER (2008). How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem.* **77**:615-41.

CHOI S, SILVERMAN RB (2002). Inactivation and inhibition of gamma-aminobutyric acid amino-transferase by conformationally restricted vigabatrin analogues. *J Med Chem.* **45**:4531–4539.

CHRISTENSEN H, FYKSE EM, FONNUM F (1991). Inhibition of  $\gamma$ -aminobutyrate and glycine uptake into synaptic vesicles. *Eur J Pharmacol.* **207**:73–79.

CHRISTGAU S, AANSTOOT HJ, SCHIERBECK H, BERGLEY K, TULLIN S, HEJNAES K, BAEKKESKOV S (1992). Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH<sub>2</sub>-terminal domain. *J Cell Biol.* **118**:309–320.

COYLE JT (2004). The GABA-glutamate connection in schizophrenia: which is the proximate cause? *Biochem Pharmacol.* **68**:1507–1514.

CUTTING, G. R., LU, L., O'HARA, B., KASCH, L. M., MONTROSE-RAFIZADEH, C., DONOVAN, D. M., SHIMADA, S., ANTONARAKIS, S. E., GUGGINO, W. B., UHL, G. R., AND

DANIELL, LC.; HARRIS, RA. (1988). Neuronal intracellular calcium concentrations are altered by anesthetics: relationship to membrane fluidization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**:1-7

DE GRAFF RA, PATEL AB, ROTHMAN DL, BEHAN KL (2006). Acute regulation of steady-state GABA levels following GABA-transaminase inhibition in rat cerebral cortex. *Neurochem Int.* **48**:508-514.

DELGADO-HERRERA L, OSTROFF RD, ROGERS SA (2001). Sevoflurane: approaching the ideal inhalational anesthetic. a pharmacologic, pharmacoeconomic, and clinical review. *CNS Drug Rev.* **7(1)**:48-120.

DINIZ PH, SILVA JH, GOMEZ MV, GUATIMOSIM C, GOMEZ RS (2007). Halothane increases non-vesicular [(3)H]dopamine release from brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol.*; **27(6)**:757-70.

DODD PR, WATSON WE, MORRISON MM, JOHNSTON GA, BIRD ED, COWBURN RF, HARDY JA (1989). Uptake of gamma-aminobutyric acid and L-glutamic acid by synaptosomes from post mortem human cerebral cortex: Multiple sites, sodium dependence and effect of tissue preparation. *Brain Res.* **490**:320–331.

DUNLAP K, LUEBKE JI, TURNER TJ (1995). Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* **18**:89-98.

EDELMAN GM (2003). Naturalizing consciousness: A theoretical framework. *PNAS.* **100**:5520-5524.

EGER EI (1997). Hypothesis: inhaled anesthetics produce immobility and amnesia by different mechanisms at different sites. *Anesth Analg.* **84**:915–918.

ESCOUBAS, P., WEILLE, J.R., LECOQ, A., DIOCHOT, S., WALDMAM, R., CHAMPIGNY, G., MOINIER, D., MÉNEZ, A., LAZDUNSKI, M. (2000). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of próton-gated Na<sup>+</sup> channels. *The journal of Biological Chemistry.* **275(33)**, 25116 – 25121.

FELDMAN SM, WALLER HJ (1962). Dissociation of electrocortical activation and behavioural arousal. *Nature.* **196**:1320-1322.

FRANKS NP (2006). Molecular targets underlying general anaesthesia. *Brit J Pharmacol.* **147**: 72–81.

FRANKS NP, HONORÉ E (2004). The TREKK2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci.* **25**:601–8.

FRANKS NP, LIEB WR (1984). Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors. *Nature*. **310**:599-601.

FRANKS NP, LIEB WR (1991). Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science*. **254**:427-430.

FRANKS NP, LIEB WR (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. **367**:607-614.

GADEA A, LOPEZ-COLOMÉ AM (2001). Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res*. **63**:461–468.

GAHWILER BH, BROWN DA (1985). GABAB-receptor-activated K<sup>+</sup> current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. **82**:1558–1562.

GARRET, M., BASCLES, L., BOUE-GRABOT, E., SARTOR, P., CHARRON, G., BLOCH, B., AND MARGOLSKEE, R. F. (1997). An mRNA encoding a putative GABA-gated chloride channel is expressed in the human cardiac conduction system. *J. Neurochem*. **68**:1382–1389.

GASPARY HL, WANG W, RICHERSON GB (1998). Carrier-mediated GABA release activates GABA receptors on hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. **80**:270–281.

GEREVICH, Z., TRETTER, L., ADAM-VIZI, V., BARANYI, M., KISS, J.P., ZELLES T. & VIZI, E.S. 2001. Analysis of high intracellular [Na<sup>+</sup>]-induced release of [<sup>3</sup>H] noradrenaline in rat hippocampal slices. *Neuroscience*. 104:761-768.

GOLDIN, AL, BARCHI, RL., CALDWELL, JH., HOFMANN, F, HOWE, JR, HUNTER, JC, KALLEN, RG, MANDEL, G, MEISLER, MH, NETTER, YB, NODA, M, TAMKUN. MM, WAXMAN, SG, WOOD, N, CATTERALL, WA (2000). Nomenclature of voltage gated sodium channels. *Neuron*. **28**, 265 – 368.

GOODCHILD M, NEAL MJ (1973). The uptake of 3H-g-aminobutyric acid by the retina. *Br J Pharmacol*. **47(1973)**:529–542.

GOMEZ, R. S.; PRADO, M. A. M.; CARAZZA, F. & GOMEZ, M. V. (1999). Halotane enhances exocytosis of [3H]-acetylcholine without increasing calcium influx in rat brain cortical slices. *Br. J. Pharmacol*, **127**: 679-684.

GOMEZ, R. S.; GOMEZ, M. V. & PRADO, M. A. M. (2000). The effect of isoflurane on the release of [3H]-acetylcholine from rat brain cortical slices. *Brain Res.*, **52**:263-267.

GRIFFITHS R, NORMAN RI. (1993). Effects of anaesthetics on uptake, synthesis and release of transmitters. *Br J Anaesth.*; **71(1)**:96-107.

GUGINO LD (2001). Quantitative EEG changes associated with loss and return of consciousness in healthy adult volunteers anaesthetized with propofol or sevoflurane. *Br J Anaesth*. **87**:421–428.



HALL AC, LIEB WR, FRANKS NP (1994). Insensitivity of P-type calcium channels to inhalational and intravenous general anesthetics. *Anesth.* **81(1)**:117-23.

HANANIA T, JOHNSON KMR (1998). Regulation of neurotransmitter release by endogenous nitric oxide in striatal slices. *Eur J Pharmacol.* **359**:111–117.

HARAYAMA N, SHIBUYA I, TANAKA K, KABASHIMA N, UETA Y, YAMASHITA H (1998). Inhibition of N- and P/Q- type calcium channels by postsynaptic GABAB receptor activation in rat supraoptic neurones. *J Physiol.* **509**:371–383.

HARRIS B, MOODY E, SKOLNICK P (1992). Isoflurane anesthesia is stereoselective. *Eur J Pharmacol.* **217**: 215-216.

HEMMINGS HCJR (2009). Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth.* **103(1)**:61-9.

HEMMINGS HC, AKABAS MH, GOLDSTEIN PA, TRUDELL JR, ORSER BA, HARRISON NL (2005). Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci.* **26**:503-10.

HENDRY SH, SCHWARK HD, JONES EG, YAN J (1987). Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci.* **7**:1503–1519.

JACOB, A.K.; KOPP, S.L.; BACON, D.R.; SMITH, H.M. (2009). The History of Anesthesia. In: BARASH, P.G.; CULLEN, B.F.; STOELTING, R.K.; CAHALAN, M.K.; STOCK, M.C. *Clinical Anesthesia*. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. 1640p. cap.1, p.3-26.

JACKSON PS, STRANGE K .(1995). Characterization of the Voltage-Dependent Properties of A Volume-Sensitive Anion Conductance. *Journal of General Physiology* **105**: 661-676.

JAHN R, SÜDHOF TC (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* **68**:863-869.

JIN XT, PARÉ JF, SMITH Y (2011). Differential localization and function of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in the rat globus pallidus. *Eur J Neurosci.* **33(8)**:1504-18.

JOHNSTON GAR (1996). GABA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther.* **69**:173–198.

JONAS P, BISCHOFBERGER J, SANDKUHLER J (1998). Correlease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science.* **281**:419–424.

JONES RM (1990). Desflurane and sevoflurane: Inhalation anesthetics for this decade? *Br J Anaesth.* **65**:527–536.

JONES KA, TAMM JA, CRAIG DA, YAO WJ, PANICO R (2000). Signal transduction by GABAB receptor heterodimers. *Neuropsychopharmacology.* **23**:41–49.

JURSKY F, TAMURA S, TAMURA A, MANDIYAN S, NELSON H, NELSON N (1994). Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol.* **196**:283–295.

KAZAZIAN, H. H. (1991). Cloning of the GABA[ $\rho$ ]1 cDNA: A novel GABA subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:2673–2677

KAVANAUGH MP, ARRIZA JL, NORTH RA, AMARA SG (1992). Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* **267**:22007–22009.

KATZ B, MILEDI R (1967). Ionic requirements of synaptic transmitter release. *Nature.* **215**:651.

KEITA H, HENZEL-ROUELLE D, DUPONT H, DESMONTS JM, MANTZ J (1999). Halothane and isoflurane increase spontaneous but reduce the N-methyl-D-aspartate-evoked dopamine release in rat striatal slices - Evidence for direct presynaptic effects. *Anesthesiology* **91**: 1788-1797.

KENDIG JJ (1993). Spinal cord as a site of anesthetic action. *Anesthesiology.* **79**:1161–1162.

KOCH U, MAGNUSSON AK. (2009). Unconventional GABA release: mechanisms and function. *Curr Opin Neurobiol.*; **19**(3):305-10

KORPI ER, GRUNDER G, LUDDENS H (2002). Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* **67**:113–159.

KRAUSE S, SCHWARZ W (2005). Identification and selective inhibition of the channel mode of the neuronal GABA transporter 1. *Mol Pharmacol*. **68(6)**:1728-35.

KRNJEVIC K (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol Rev*. **54**: 418–540.

LEVI G, RAITERI M (1993). Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci*. **16**:415–419.

LIAO M, SONNER JM, JURD R (2005). Beta3-containing gamma-aminobutyric acid A receptors are not major targets for the amnesic and immobilizing actions of isoflurane. *Anesth Analg*. **101**:412–8.

LLOYD KG, MORSELLI PL, BARTHOLINI,G (1987). GABA and affective disorders. *Med Biol*. **65**:159-165.

LU L, HUANG Y (1998). Separate domains for desensitization of GABA rho1 and beta2 subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol*. **164**:115–124.

MCCRACKEN ML, BORGHESE CM, TRUDELL JR, HARRIS RA. (2010). A transmembrane amino acid in the GABAA receptor  $\beta$ 2 subunit critical for the actions of alcohols and anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther.*; **335(3)**:600-6

MACLENNAN DH, CHEN SR (1993). The role of calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic in malignant hyperthermia. *Ann N Y Acad Sci.* **83**:294–304.

MAGER S, KLEINBERGER-DORON N, KESHET GI, DAVIDSON N, KANNER BI, LESTER HA (1996). Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. *J Neurosci.* **16**:5405–5414.

MANTZ J, LECHARNY JB, LAUDENBACH V (1995). Anesthetics affect the uptake but not the depolarization-evoked release of GABA in rat striatal synaptosomes. *Anesthesiology.* **82**:502–11.

MASHOUR GA (2004). Consciousness unbound: toward a paradigm of general anesthesia. *Anesthesiology.* **100**:428–433.

MAZZE RI, EBERT TJ, KHARASCH ED (1998). New developments in inhalation anesthesia. *Anesthesiol News Special Report.* **24**:1–8.

MARTIN, DL, RIMVALL, K.(1993). Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* **60**:395–407.

MCINTIRE SL, REIMER RJ, SCHUSKE K, EDWARDS RH, JORGENSEN EM (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature.* **389(6653)**:870-876

MERRETT KL, JONES RM(1994). Inhalational anaesthetic agents. Br J Hosp Med. **52**:260–263.

MEIR A, GINSBURG S, BUTKEVICH A, KACHALSKY SG, KAISERMAN I, AHDUT R, DEMIRGOREN S, RAHAMIMOFF R (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. Physiol Rev. **79**:1019-1088.

MILLER SL (1961). A theory of gaseous anesthetics. Proc Nat. Acad Sci USA. **47**:1515-1524.

MINOR DL JR, FINDEISEN F (2010). Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (Ca<sub>v</sub>) function and modulation. Channels (Austin). **4(6)**:459-74.

MODY, I.; TANELIAN, D. L.; MACIVER, M. B. (1991) Halothane enhances tonic neuronal inhibition by elevating intracellular calcium. Brain Res., **538**: 319-323.

MORUZZI G, MAGOUN HW (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **1**:455–473.

MOSCOWITZ JA, CUTLER RW (1980). Bidirectional movement of gamma-aminobutyric acid in rat spinal cord slices. J Neurochem. **35**:1394–1399.

MURUGAIAH KD, HEMMINGS HCJR. (1998). Effects of intravenous anesthetics on [3H]GABA release from rat cortical synaptosomes. Anesthesiology. **89**:919–28.

MOORE JW, NARAHASHI T (1967). Tetrodotoxin's highly selective blockage of an ionic channel. *Fed. Proc.* **26**:1655-1663.

NAGELE P, MENDEL JB, PLACZEK WJ, SCOTT BA, D' AVIGNON DA, CROWDER CM (2005). Volatile anesthetics bind rat synaptic SNARE proteins. *Anesthesiology.* **103**:768–78.

NEHER E (1998). Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron.* **20**:389-399.

NELSON N (1998). The family of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> neurotransmitter transporters. *J Neurochem.* **71**:1785–1803.

NELSON LE (2002). The sedative component of anesthesia is mediated by GABA<sub>A</sub> receptors in an endogenous sleep pathway. *Nature Neurosci.* **5**:979–984.

NICOLATO R, FERNANDES VM, MORAES-SANTOS T, GOMEZ RS, PRADO MA, ROMANO-SILVA MA, GOMEZ MV (2002). Release of gamma-[<sup>3</sup>H]aminobutyric acid in rat brain cortical slices by alpha-scorpion toxin. *Neurosci Lett.* **325(3)**:155-8.

NICHOLLS D, ATTWELL D(1990). The release and uptake of excitatory aminoacids. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**:462–468.

NICOLL RA, MALENKA RC (1998). A tale of two transmitters. *Science*. **281**:360–361.

OGAWA T, SHINGU K, SHIBATA M, OSAWA M, MORI K (1992). The divergent actions of volatile anaesthetics on background neuronal activity and reactive capability in the central nervous system in cats. *Can J Anaesth*. **39**:862–872.

ORSER BA, MCADAM LC, RODER S, MACDONALD JF (1998). General anaesthetics and their effects on GABA(A) receptor desensitization. *Toxicol Lett*. **100-101**: 217-24.

ORSER B A, CANNING K J, MACDONALD J F. (2002). Mechanisms of general anesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol*. **15(4)**:427-33.

PALMADA M, CENTELLES JJ (1998). Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage, and reuptake of glutamate in brain. *Frontiers in Bioscience* **3**:701-718.

PEARCE, R. A., General anesthetic effects on GABAA receptors. In: *Neural Mechanisms of Anesthesia*. Edited by Antognini J. F., Carstens, E. E, Raines, D. E: New Jersey, Humana Press. 2003, pp 265-82.

PERIN MS, BROSE N, JAHN R, SÜDHOF TC. (1991). Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem*. Jan 5;266(1):623-9. Erratum in: *J Biol Chem* 1991 25; **266(15)**:1001-8.

PERRY, E.; WALKER, M.; GRACE, J.; PERRY, R. (1999). Acetylcholine in mind: A neurotransmitter correlate of consciousness?. *Trens in Neurosci.*, **22**: 273-280.



PETROFF OA (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*. **8(6)**:562-73.

PIN JP, BOCKAERT J (1989). Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory aminoacids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture. *J Neurosci*. **9**:648–656.

PINHEIRO ACN, GOMEZ RS, GUATIMOSIM C, SILVA JH, PRADO MAM, GOMEZ MV. (2006). The effect of sevoflurane on intracellular calcium concentration from cholinergic cells. *Brain Research Bulletin* **69**: 147-152.

PIQUERAS L, MARTINEZ V (2004). Peripheral GABAB agonists stimulate gastric acid secretion in mice. *Br J.Pharmacol*. **142**:1038–1048.

QUME, M., & FOWLER, L. J. (1997). Effect of chronic treatment with the GABA transaminase inhibitors gamma-vinyl GABA and ethanolamine O-sulphate on the in vitro GABA release from rat hippocampus. *Br.J.Pharmacol*. **122**:539–545.

RADIAN R, OTTERSEN OP, STORM-MATHISEN J, CASTEL M, KANNER BI (1990). Immunocytochemical localization of the GABA transporter in rat brain. *J Neurosci*. **10**:1319–1330.

RAMPIL IJ, MASON P, SINGH H (1993). Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology*. **78**:707-712.

RAMPIL, IJ (1994). Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology*. **80**:606–610.

RATNAKUMARI L, HEMMINGS HC . (1998). Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane. *Anesthesiology* **88**: 1043-1054

REDMAN S (1996). The hippocampus, long-term potentiation and memory. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **23(10-11)**:961-4.

REHBERG B, XIAO YH, DUCH DS. (1996). Central nervous system sodium channels are significantly suppressed at clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesthesiology* **84**: 1223-1233.

ROBERTS, E. (1986A). GABA: The road to neurotransmitter status. In Olsen, R. W., and Venter, C. J. (eds.), *Benzodiazepine / GABA Receptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties*, Wiley, New York, **pp.1–39**.

ROBERTS E (1986B). What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. *Exp Neurol.* **93**:279–290.

ROBERTS, E, FRANKEL S (1950). Gamma-aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. *J Biol Chem.* **187**:55–63.

RUDOLPH U, ANTKOWIAK B (2004). Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci.*; **5(9)**:709-20

RUTLEDGE CO, SEIFEN E, ALPER MH, FLACKE W (1963). Analysis of halothane in gas and blood by gas chromatography. *Anesthesiology*, **24**:862-867.

SANACORA G, GUEORGUIEVA R, EPPERSON CN, WU YT, APPEL M, ROTHMAN DL, KRYSTAL JH, MASON GF (2004). Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*. **61**:705–713.

SCHULER V, LUSCHER C, BLANCHET C, et al. (2001). Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and post synaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* **31**:47–58.

SEILER N, AL-THERIB MJ, KATAOKA K (1973). Formation of GABA from putrescine in the brain of fish (*Salmo irideus* Gibb.). *J Neurochem*. **20**:699–708.

SHAHANI SK, LINGAMANENI R, HEMMINGS HC (2002). General anesthetic actions on norepinephrine, dopamine, and gamma-aminobutyric acid transporters in stably transfected cells. *Anesth Analgesia*. **95**:893-899.

SHERIF, FM, AHMED SS (1995). Basic aspects of GABA-transaminase in neuropsychiatric disorders. *Clin. Biochem*. **28**:145–154.

SHERIF F, WAHLSTROM G, ORELAND L (1994). Increase in brain GABA-transaminase activity after chronic ethanol treatment in rats. *J Neural Transm Gen Sect*. **98**:69–79.

SILLS GJ (2003). Pre-clinical studies with the GABAergic compounds vigabatrin and tiagabine. *Epileptic Disord.* **5**:51–56.

SILVA JH, GOMEZ R, PINHEIRO AC, GOMEZ MV, GUATIMOSIN C (2005). Acetylcholine induced by the volatile anesthetic sevoflurane in rat brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol.* **25**: 807-818.

SILVA JH, GOMEZ RS, DINIZ PH, GOMEZ MV, GUATIMOSIM C (2007). The effect of sevoflurane on the release of [3H]dopamine from rat brain cortical slices. *Brain Res Bull.* **72(4-6)**:309-14.

SILVA JH, GOMEZ MV, SILVA JH, GUATIMOSIM C, GOMEZ RS (2008). Halothane induces vesicular and carrier-mediated release of [3H]serotonin from rat brain cortical slices. *Neurochem Int.* **52(6)**:1240-6.

SOLLNER T, BENNETT MK, WHITEHEART SW ET AL., (1993). A protein assembly disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* **3**:409-18.

SON Y (2010). Molecular mechanisms of general anesthesia. *Korean J Anesthesiol.* **59(1)**:3-8.

SONDERS MS, AMARA SG (1996). Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol.* **6**:294–302.

SONNER JM ET AL. (2003) Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg.* **97**: 718–740.

SOUDIJN W, VAN WIJNGAARDEN I. (2000). The GABA transporter and its inhibitors. *Curr Med Chem.* **7(10)**:1063-79.

STUDY RE (1994). Isoflurane inhibits multiple voltage-gated calcium currents in hippocampal pyramidal neurons. *Anesthesiology.* **81(1)**:104-16

SUGIMURA M, KITAYAMA S, MORITA K, IRIFUNE M, TAKARADA T, KAWAHARA M, DOHI T.(2001). Effects of volatile and intravenous anesthetics on the uptake of GABA, glutamate and dopamine by their transporters heterologously expressed in COS cells and in rat brain synaptosomes. *Toxicol Lett.* **6;123(1)**:69-76.

TAKAMORI S, RIEDEL D, JAHN R (2000). Immuno isolation of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J Neurosci.* **20**:4904–4911.

TSE FW, TSE A, HILLE B, HORSTMANN H, ALMERS W (1997). Local Ca<sup>2+</sup> release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron.* **18**:121-132.

TUNG A, BERGMANN BM, HERRERA S, CAO D, MENDELSON WB (2004). Recovery from sleep deprivation occurs during propofol anesthesia. *Anesthesiology.* **100**:1419–1426.

ULLOOR J, MAVANJI V, SAHA S, SIWEK DF, DATTA S (2004). Spontaneous REM sleep is modulated by the activation of the pedunculo pontine tegmental GABAB receptors in the freely moving rat. *J Neurophysiol.* **91**:1822–1831.

VANDAM L (1994). History of Anesthetic Practice. In: Miller R D, ed. Anesthesia. 4<sup>th</sup> edition. New York: Churchill Living Stone Inc. 1994:9–19.

VIZI ES. (1998). Different temperature dependence of carrier-mediated (cytoplasmic) and stimulus-evoked (exocytotic) release of transmitter: a simple method to separate the two types of release. *Neurochemistry International* **33**: 359-366.

VIZI ES, SPERLÁGH B. (1999). Separation of carrier mediated and vesicular release of GABA from rat brain slices. *Neurochem Int.* **34(5)**:407-13.

YAMAKAGE M, HIRSHMAN CA, CROXTON TL (1995). Volatile anesthetics inhibit voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol.* **268**:187-191.

WALLIN RF, REGAN BM, NAPOLI MD (1975). Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent. *Anesth Analg.* **54**:758-66.

WANG D, DEKEN SL, WHIT WORTH TL, QUICK MW (2003). Syntaxin 1A inhibits GABA flux, efflux, and exchange mediated by the rat brain GABA transporter GAT1. *Mol Pharmacol.* **64**:905–913.

WATANABE, E, FUJIKAWA, A, MATSUNAGA, H, YASOSHIMA, Y, SAKO, N, YAMAMOTO, T, SAEGUSA, C, NODA, M (2000). NaV2 / NaG channel is involved in control of salt intake behavior in the CNS. *J. Neuroscience.* **20**, 7743 – 7751.

WEBER T, ZEMELMAN BV, MCNEW JA (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. **6**:759-72.

WORRALL DM, WILLIAMS DC (1994). Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: A review of recent developments. *Biochem J*. **297**:425–436.

WU Y, WANG W, RICHERSON GB (2001). GABA transaminase inhibition induces spontaneous and enhances depolarization-evoked GABA efflux via reversal of the GABA transporter. *J Neurosci*. **21**:2630–2639.

WU, Y, WANG, W, RICHERSON GB (2006). The Transmembrane Sodium Gradient Influences Ambient GABA Concentration by Altering the Equilibrium of GABA Transporters. *J Neurophysiol*. **96**:2425-2436.

WU Y, WANG W, DÍEZ-SAMPEDRO A, RICHERSON GB (2007). Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron*. **6;56(5)**:851-65.

XU F, SARTI P, ZHANG J, BLANCK TJJ. (1998). Halothane and isoflurane alter calcium dynamics in rat cerebrocortical synaptosomes. *Anesthesia and Analgesia* **87**: 701-710.

ZERIAL M, MCBRIDE H (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:107-117.

ZHANG Y, SONNER JM, EGER E III (2004). Gamma-aminobutyric acid A receptors do not mediate the immobility produced by isoflurane. *Anesth Analg*. **99**:85–90.



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



UFMG

## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Renato Santiago Gomez, Cristina Guatimosin Fonseca e Janice Henriques Silva, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“EFEITO DO ANESTÉSICO INALATÓRIO SEVOFLURANO NA LIBERAÇÃO DE GABA EM FATIAS DE CORTEX CEREBRAL DE RATOS”**, apresentada pelo mestrando **PAULO HENRIQUE COSTA DINIZ**, estando o mesmo apto à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2011.

Prof. Renato Santiago Gomez  
Orientador

Profa. Cristina Guatimosin Fonseca

Profa. Janice Henriques Silva





FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (31) 3409.9641 - FAX: (31) 3409.9640  
www.medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PAULO HENRIQUE COSTA DINIZ, nº de registro 2009667013. No dia **vinte e cinco de maio de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"EFEITO DO ANESTÉSICO INALATÓRIO SEVOFLURANO NA LIBERAÇÃO DE GABA EM FATIAS DE CORTEX CEREBRAL DE RATOS"**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Renato Santiago Gomez, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Renato Santiago Gomez/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa. Cristina Guatimosin Fonseca	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa. Janice Henriques Silva	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>

pelas indicações o candidato foi considerado Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de maio de 2011.

Prof. Renato Santiago Gomez/ Orientador Renato Santiago Gomez

Profa. Cristina Guatimosin Fonseca Cristina Guatimosin Fonseca

Profa. Janice Henriques Silva Janice Henriques Silva

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador Luiz Armando Cunha De Marco

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG

CONFERE COM O ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação

Diniz, Paulo Henrique Costa.  
D585e Efeito do anestésico inalatório sevoflurano na liberação de GABA em fatias de córtex cerebral de ratos [manuscrito]. / Paulo Henrique Costa Diniz. -- Belo Horizonte: 2011.  
88f.: il.  
Orientador: Renato Santiago Gomez.  
Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Anestésicos Inalatórios. 2. Neurotransmissores. 3. Ácido gama-Aminobutírico. 4. Córtex Cerebral. 4. Farmacologia. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Gomez, Renato Santiago. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QV 81