

Flávia Lage Pessoa da Costa

**Avaliação do efeito do propofol na liberação de
acetilcolina em sinaptosomas de hipocampo de ratos**

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Belo Horizonte 2013

Flávia Lage Pessoa da Costa

**Avaliação do efeito do propofol na liberação de
acetilcolina em sinaptosomas de hipocampo de ratos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina
da Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito para obtenção do grau de mestre em
Ciências da Saúde: Medicina Molecular.

Orientador: Dr. Renato Santiago Gomez
Co-Orientador: Dr. Marcus Vinícius Gomez

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Belo Horizonte 2013



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
cpa@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE MESTRADO DE FLAVIA LAGE PESSOA DA COSTA, n.º de registro 2011656782. No dia catorze de fevereiro de Dois mil e Treze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROPOFOL NA LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA EM SINAPTOSOMAS DE HIPOCAMPO DE RATOS."; requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina 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 a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata 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>
Prof. Marcus Vinicius Gomez / co-orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Célio José de Castro Junior	Instituição: SCMMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof.ª Luciene Bruno Vieira	Instituição: SCMMG	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata 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, 14 de fevereiro de 2013.

Prof. Renato Santiago Gomez / orientador Renato Santiago

Prof. Marcus Vinicius Gomez / co-orientador _____

Prof. Célio José de Castro Junior Celio José de Castro Junior

Prof.ª Luciene Bruno Vieira Luciene Bruno Vieira

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
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG



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



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores: Prof. Renato Santiago Gomez / orientador, Prof. Marcus Vinicius Gomez / co-orientador, Prof. Célio José de Castro Junior, Prof.ª Luciene Bruno Vieira (membros titulares), aprovou a defesa Dissertação de Mestrado de FLAVIA LAGE PESSOA DA COSTA. A Dissertação foi intitulada: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROPOFOL NA LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA EM SINAPTOSOMAS DE HIPOCAMPO DE RATOS.", estando à mesma apta à obtenção do título de Mestrado em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2013.

Prof. Renato Santiago Gomez / orientador

Prof. Marcus Vinicius Gomez / co-orientador

Prof. Célio José de Castro Junior

Prof.ª Luciene Bruno Vieira

Apoio Institucional

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- ✓ Laboratório de Neurociências - Departamento de Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;
- ✓ Laboratório de Genética Molecular- Departamento de Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;
- ✓ Centro de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;
- ✓ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia– Medicina Molecular (INCT-MM).
- ✓ 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);

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dissimilaridades, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

Partes dos resultados desta dissertação foram apresentadas nos seguintes encontros:

- ✓ 15th WFSA World Congress of Anaesthesiologists® - março de 2012.
- ✓ 10th international congress on Cell Biology - julho de 2012.
- ✓ Simpósio de Biologia Celular da UFMG - agosto de 2012.
- ✓ I Simpósio Brasileiro de Sinalização de Ca²⁺: Bioquímica e Fisiologia Celulares – outubro de 2012.

Dedico este trabalho ao meu pai, Israel Pessoa da Costa, por sempre ter sido meu maior incentivador na busca pelo conhecimento e por nunca ter medido esforços para possibilitar meu crescimento e a realização de meus sonhos.

Dedico este trabalho á minha mãe, Maria Aparecida Lage da Costa, por sempre ter me mostrado que o amor, a paciência e a oração criam caminhos onde antes parecia não haver saída.

Agradecimentos

Agradeço à Deus, por ter me dado saúde e plenitude para que eu pudesse desenvolver esse trabalho e por ter me abençoado colocando pessoas muito especiais em minha vida.

Aos meus pais, Israel e Cida agradeço pelo esforço infinito para me dar sempre muito mais do que tiveram. Vocês sempre deixaram claro para mim a importância da responsabilidade, da humildade, da honestidade, do estudo, da família e da força de vontade, valores que eu nunca me esquecerei! Obrigada pelo incentivo, amor e total compreensão. Vocês sempre serão minha referência e meu maior orgulho. Amo vocês!!

À minha irmã Marina agradeço por ser um grande exemplo de profissionalismo, competência e persistência. Obrigada pelo carinho, amor e por sempre ser minha confidente e maior conselheira! Te amo titutu!!

Ao André, agradeço por ter aparecido em minha vida há sete anos e ter decidido ficar pra sempre!! Você é essencial em minha vida! Obrigada pelos bons momentos compartilhados, pelo amor, paciência e pelos desafios apresentados que me fizeram crescer e fortalecer. Amo você catinho!

Ao Bruno, agradeço pelos agradabilíssimos momentos, pela mão sempre estendida, pelo carinho, conselhos e pelo cuidado e preocupação comigo! Lelê, você é o melhor irmão que eu poderia sonhar em ter! Amo você!

Ao Theo por sempre tornar meus dias mais alegres com a sua simples existência em minha vida.

À Madalena pelo carinho, orações, energia positiva e grande disponibilidade.

Ao meu orientador Professor Dr. Renato Santiago Gomez agradeço por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho de forma ética, competente e prazerosa. Agradeço por sempre ter me incentivado a seguir com a pesquisa; pelas ricas discussões sobre o projeto, disponibilidade e apoio. Obrigada pelas contribuições para meu crescimento profissional e por ser um grande exemplo a ser seguido.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Marcus Vinícius Gomez agradeço pela oportunidade que me deu de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pelo acolhimento agradável em seu laboratório. Agradeço pelos desafios que me apresentou, que muito contribuíram para o meu crescimento científico e pela confiança em mim depositada. O seu espírito científico, o seu humor e o seu prazer visível na carreira acadêmica e científica são alvos de minha admiração e me motivam a seguir este caminho. O senhor sempre será um grande exemplo de profissionalismo, comprometimento e seriedade.

Aos professores Luiz Armando, Marco Aurélio e Débora Miranda agradeço pelo aprendizado, apoio e pelas demonstrações de competência e profissionalismo.

À professora Cristina Guatimosim Fonseca, fonte de inspiração científica, agradeço pelo exemplo, conselhos e discussões científicas que tanto contribuíram para minha formação profissional.

À Amiga Nancy agradeço pelos ensinamentos profissionais, discussões científicas, elaborações de protocolos e companheirismo durante os experimentos. Agradeço imensamente pela “orientação” e suporte que só você soube me dar. Sua amizade verdadeira, cumplicidade e dedicação foram decisivas para a realização deste trabalho.

À aluna de iniciação Científica Luanna Monteiro, por quem tenho imenso carinho e gratidão, agradeço pela imensa disponibilidade e boa vontade para me acompanhar nos experimentos e por se dedicar além do possível para a realização deste projeto.

Aos amigos de laboratório, Alexandre Barros, Alexandre Magno, Ana Cristina Pinheiro, André Teixeira, Antônio Alvim, Arley Samuel, Bruno Souza, Camila Gewehr, Célio de Castro, Cíntia Vila Nova, Cláudio Antônio, Cristina Sábado, Daniela Valadão, Danuza Gontijo, Elizete Pereira, Flávia Melo, Flávia Passos, Franciele Bianchi, Gabriel Aguiar, Giselle Sabrina, Geisilaine Soares, Helena Sarubi, Jéssika Bridi, Juliana Figueira, Karen Navarro, Lucélia Coimbra, Luciana Bastos, Luciene Vieira, Luiza Amorim, Marcelo Mamede, Mariana Rossette, Mário Lavor, Mauro Cunha, Mateus Marchini, Nayra Soares, Patrícia Oliveira, Patrícia Couto, Paulo Henrique Moraes, Paulo Henrique Diniz, Priscila Gubert, Renalice Vieira, Rodrigo Nicolato, Rômulo Mourão, Simone Becho, Victor Bortolo e demais companheiros agradeço pelas contribuições que cada um a sua maneira soube me dar; agradeço pelo apoio, aprendizado, discussões científicas e pelos momentos agradáveis.

Aos meus familiares e amigos agradeço, pelo apoio, pelas orações, pelo incentivo e pela compreensão de minhas ausências.

Aos funcionários: Marcelo, Derlim e Dona Nívea meus sinceros agradecimentos pela seriedade, competência e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos animais utilizados neste trabalho, meu respeito e imensa gratidão.

À UFMG, à Faculdade de Medicina, ao Departamento de Saúde Mental e às entidades financiadoras CNPq, CAPES e FAPEMIG agradeço por propiciarem uma pós-graduação de tão elevado nível no Brasil.

Sumário

Lista de Figuras	xivv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas	xviii
Resumo	xxx
Abstract	xxii
I. Introdução	1
1.0 Anestésicos	2
1.1 Anestésicos gerais	2
1.2 Mecanismos de Ação dos Anestésicos gerais	3
1.3 Neurotransmissão	6
1.4 Neurotransmissão Colinérgica	8
1.4.1 Síntese de ACh	9
1.4.2 Captação de Ch pelo terminal pré-sináptico	9
1.4.3 Transporte de ACh para vesículas sinápticas	10
1.4.4 Liberação e inativação de ACh	10
1.5 Hipocampo	12
1.5.1 Hipocampo e memória	13
1.5.2 Distribuição de ACh no hipocampo	13
1.6 Propofol	15
1.6.1 Mecanismos de ação do propofol	15
1.7 Canais Iônicos	18
1.7.1 Canais de Na ⁺	18
1.7.2 Canais de Ca ²⁺	20
1.8 Modelo experimental: Sinaptosomas	22
1.9 Estímulos despolarizantes:	23
1.9.1 Veratridina	23

1.9.2 KCl.....	24
II.Objetivos	25
2.0 Objetivo geral.....	26
III. Material e Métodos.....	27
3.0 Drogas e reagentes.....	28
3.1 Soluções.....	28
3.2 Animais.	30
3.3 Equipamentos.	30
3.4 Determinação da liberação de cloreto de [³ H metil]- Ch em sinaptosomas de hipocampo de ratos.	31
3.4.1 Sacrifício dos animais e dissecação dos hipocampos.....	31
3.4.2 Preparação dos sinaptosomas de hipocampo de ratos.	31
3.4.3 Incubação do sinaptosoma com solução despolarizante.....	31
3.4.4 Marcação do sinaptosoma com cloreto de [³ H metil]- Ch.	32
3.4.5 Procedimentos na Câmara de Perfusão.....	32
3.4.5.1 A câmara de perfusão.	32
3.4.5.2 Protocolo experimental na câmara de perfusão.....	34
3.4.6 Contagem da radioatividade das amostras.....	37
3.4.7 Caracterização da [³ H]-ACh liberada (kits de Ch e de ACh).....	37
3.4.8 Dosagem de proteínas.	38
3.4.9 Análise estatística dos resultados.	38
IV. Resultados.....	39
4.0 Efeito do propofol na liberação espontânea de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos.	40
4.1 Avaliação do efeito da veratridina na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos.	41
4.2 Avaliação do efeito do propofol na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos, evocada por veratridina.	43

4.3 Avaliações do mecanismo de ação do propofol.....	45
4.3.1 Avaliação da participação dos canais de Na ⁺ sensíveis à voltagem.	45
4.3.2 Avaliação da participação do Ca ²⁺ extracelular.....	48
4.3.3 Avaliação da participação do Ca ²⁺ intracelular.....	51
4.4 Avaliação do efeito do KCl na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos.....	55
4.5 Avaliação do efeito do propofol na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos, evocada por KCl.....	57
4.6 Avaliação do mecanismo de ação do propofol	59
4.6.1 Avaliação da participação dos íons Ca ²⁺ extracelular	59
4.6.2 Avaliação da participação dos íons Ca ²⁺ intracelular.	63
4.7 Dosagem de Ch e de ACh presente nas amostras.....	67
V. Discussão.....	69
VI. Conclusão	80
VII. Referências Bibliográficas	82

Lista de Figuras

Figura 1 - Diagrama Estrutural Das Proteínas Componentes do Complexo SNARE.....	6
Figura 2 - O ciclo de vesículas sinápticas.....	8
Figura 3- Desenho esquemático representando a síntese, armazenamento, liberação e inativação da ACh em um terminal sináptico.....	11
Figura 4 - Desenho esquemático representando as diferentes regiões anatômicas do hipocampo.....	12
Figura 5 - Projeções de neurônios colinérgicos para o hipocampo.....	14
Figura 6 - Efeitos desencadeados pela anestesia com o propofol em humanos.....	17
Figura 8 - Representação esquemática de canal para Ca^{2+} sensível á voltagem.	21
Figura 9 - Esquema da Câmara de Perfusão em vista lateral.	34
Figura 10- Esquema da bandeja coletora de efluentes de cada mini-câmara do aparato perfusor.	34
Figura 11 – Diagrama de tempo do protocolo experimental, na câmara de perfusão.	36
Figura 12 - O propofol reduz a liberação espontânea de [3H]- ACh.....	40
Figura 13 - A veratridina evoca a liberação de [3H]-ACh de forma dose dependente.	42
Figura 14 - O propofol inibe a liberação de ACh evocada por veratridina, de maneira dose dependente.....	44
Figura 15 - Efeito da TTX na liberação de [3H]-ACh evocada por veratridina.	46
Figura 16 - O mecanismo de atuação do propofol está relacionado aos canais de Na^+ sensíveis á voltagem.....	48
Figura 17 - Avaliação da participação do Ca^{2+} extracelular no mecanismo de atuação do propofol.....	50
Figura 18 - O mecanismo de atuação da veratridina envolve os íons Ca^{2+} intracelular.	52
Figura 19 - Avaliação da participação do Ca^{2+} intracelular no mecanismo de atuação do propofol.....	54
Figura 20 - O KCl evoca a liberação de [3H]-ACh de forma dose dependente.....	56
Figura 21 - O propofol inibe a liberação de ACh evocada por KCl.....	58
Figura 22 - O EGTA inibe a liberação de ACh evocada por KCl.....	60
Figura 23 - O mecanismo de atuação do propofol não está relacionado ao Ca^{2+} extracelular. ...	62

Figura 24 - Efeito do BAPTA-AM na liberação de [³ H]-ACh evocada por KCl.....	64
Figura 25 - O mecanismo de atuação do propofol está relacionado ao Ca ²⁺ intracelular.....	66
Figura 26 - Proporção de [³ H] Ch e de [³ H] ACh nas amostras sinaptosomais.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Meio de incubação.	28
Tabela 2 - Solução despolarizante.....	29
Tabela 3 - Líquido de cintilação (solução de Bray).	29

Lista de Abreviaturas

α	Alfa.
[³ H]-ACh	Acetilcolina triciada.
[³ H]-Ch	Colina Triciada.
ACh	Acetilcolina.
AChE	Acetilcolinesterase.
AChn	Receptor nicotínico da Acetilcolina.
ANOVA	Análise de variância de uma via.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BAPTA-AM	1,2 - bis(aminofenoxi)etano-N,N,N', N'-ácido tetra acético
BSA	Albumina de soro bovino.
BuChE	Butilcolinesterase.
β	Beta.
Ca ²⁺	Íons cálcio.
[Ca ²⁺]	Concentração de íons cálcio.
[Ca ²⁺] _E	Concentração de íons cálcio extracelular.
[Ca ²⁺] _i	Concentração de íons cálcio intracelular.
C.A.	Corno de Ammon.
CE	Córtex Entorrinal.
CEBIO	Centro de Bioterismo.
CETEA	Cômite de Ética em Experimentação Animal.
Ch	Colina.
ChAT	Colina Acetil-Transferase.
Cl ⁻	Íons Cloreto.
CCSV	Canais de cálcio sensíveis á voltagem.
CKSV	Canais de potássio sensíveis á voltagem.
CSSV	Canais de sódio sensíveis á voltagem.

D.A.	Doença de Alzheimer.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DPM	Decaimento por minuto.
DNA	Ácido Desoxirribonucléico.
EC ₅₀	Concentração capaz de estimular em 50% a ação máxima efetiva de uma determinada substância.
EGTA	Ácido tetra acético etileno glicol bis-(β-aminoetil éter)
EPM	Erro padrão médio.
Fluo 3-AM	1-[Amino-5-(2,7-dichloro-6-acetomethoxy-3-oxo-3 <i>H</i> -xanthen-9-yl) phenoxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid, pentaacetoxy-methyl Ester.
GABA	Ácido γ- aminobutírico.
GABA _A	receptor de GABA do tipo A.
GD	Giro Denteado.
HEPES	4 - (2-hidroxietyl) piperazina-1-etanosulfónico N-(2-hidroxietyl) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% da ação máxima efetiva de uma determinada substância.
IP ₃	Inositol 1, 4,5 trifosfato.
Isômero S (+)	Isômero Dextrógiros.
Isômero R (-)	Isômero Levógiro.
K ⁺	Íons potássio.
KCl	Cloreto de potássio.
kDa	Kilodalton.
M	Molar.
ME	Meio extracelular.
MI	Meio intracelular.
mM	Milimolar.

mL	Mililitro.
Na ⁺	Íons sódio.
[Na ⁺] _E	Concentração de Na ⁺ extracelular.
[Na ⁺] _i	Concentração de Na ⁺ intracelular.
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
POPOP	1,4 – bis 2 (5-feniloxazolil)-benzeno.
PPO	2,5 difeniloxazol.
qsp	Quantidade suficiente para.
RNAi	RNA de interferência.
S	Segmentos transmembrana.
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor.
SNC	Sistema nervoso central.
Syt	Sinaptotagmina.
Sub	Complexo subicular.
TREK-1	Two-pore-domain K ⁺ (K ₂ P) channel subunits.
TTX	Tetrodotoxina.
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
μm	Micrômetro.
μM	Micromolar.
μs	Microssegundos.
ΔΣ liberação de [³ H]-ACh	Somatório da fração de liberação de [³ H]-ACh.
VACHT	Transportador vesicular de ACh.
δ	Delta.
γ	Gama.

Resumo

Os anestésicos gerais são amplamente utilizados para induzir a anestesia geral, mas os mecanismos moleculares de ação deste agentes permanecem indeterminados. O propofol é um anestésico intravenoso utilizado para a indução, manutenção da anestesia e para sedação em unidades de tratamento intensivo. Esse agente é capaz de modificar a transmissão sináptica, alterando a liberação de neurotransmissores pré-sinápticamente e também modulando a resposta na região pós-sináptica. Dentre os efeitos gerados por esse agente destacam-se a imobilidade, a inconsciência e a amnésia. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório, comumente presente no cérebro de mamíferos, envolvido na regulação da consciência, da memória, dos processos cognitivos e do sono. O hipocampo é uma região cerebral envolvida com a formação da memória, aprendizagem e com as emoções. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do propofol na liberação de ACh evocada por veratridina, uma toxina capaz manter os canais de sódio sensíveis à voltagem abertos, e KCl, um agente despolarizante capaz de ocasionar o influxo de cálcio, em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Os sinaptosomas foram incubados com [metil-³H] cloreto de colina, confinados em uma câmara de perfusão e, posteriormente as amostras radioativas por eles liberadas foram quantificadas através do uso de um cintilador. O propofol reduziu a liberação espontânea e a evocada de [³H]-ACh e esse resultado sugere que o efeito do propofol na neurotransmissão colinérgica pode justificar o efeito fisiológico de amnésia característico desse agente. Mediante o estímulo com veratridina demonstramos que o mecanismo de ação do propofol envolve a participação dos canais de sódio sensíveis à voltagem, mas não foi possível descartar a participação dos íons Ca²⁺ extra e intracelular neste processo e mediante estímulo com KCl foi possível demonstrar que o mecanismo de ação do propofol independe dos íons Ca²⁺ extracelular mas depende dos íons Ca²⁺ intracelular.

Abstract

General anesthetics are widely used to induce general anesthesia but their molecular mechanisms of action remain undetermined. Propofol is an intravenous anesthetic commonly used for induction and maintenance of anesthesia and for sedation in the intensive care. This agent is capable of modifying synaptic transmission by altering the release of neurotransmitters in the presynaptic region and also modulating the response in the postsynaptic region. Among the effects caused by this agent the most common are immobility, unconsciousness and amnesia. Acetylcholine (ACh) is a common distributed excitatory neurotransmitter in mammal's brain that is involved in the regulation of consciousness, awakening, cognitive functions, memory and sleep disorders. The hippocampus is a brain region involved in memory formation, learning and emotions.

In the present study we investigated the effect of propofol on ACh release induced by veratridine, a voltage-dependent Na^+ channel opening agent, and induced by KCl, a depolarizing agent capable of inducing calcium influx, in rat hippocampus synaptosomes and try to unravel the mechanisms of presynaptic action of this agent. The synaptosomes were incubated with [methyl- ^3H] choline chloride and subsequently confined in a perfusion chamber. The radioactive samples released were counted in a liquid scintillator. Propofol reduced spontaneous and evoked release of [^3H] ACh and this result suggests that propofol effects on cholinergic transmission may be the reason that explains the physiological effect of amnesia characteristic of this agent. Upon stimulation with veratridine was possible to demonstrated that the mechanism of action of propofol involves the participation of voltage sensitive sodium channels, but wasn't possible to rule out the involvement of extracellular and intracellular Ca^{2+} in this process. Upon stimulation with KCl was possible to demonstrate that the mechanism of action of propofol is independent of extracellular Ca^{2+} and depends on intracellular Ca^{2+} .

I. Introdução

1.0 Anestésicos

A história da anestesia se inicia em 1846, quando o dentista Willian T.G. Morton demonstrou publicamente o efeito promissor dos anestésicos ao submeter o paciente Edward Gilbert Abbott a uma cirurgia para a retirada de um tumor na glândula submaxilar e na língua. Após a inalação de éter por alguns minutos, o paciente permaneceu inconsciente e não apresentou sinais de dor, nem sequer reflexos motores embora estivesse vivo e respirando. Desde este dia a técnica de Morton propiciou um rápido desenvolvimento na cirurgia moderna e tornou-se uma das descobertas mais revolucionárias da medicina, de forma que atualmente mais de 17 milhões de pacientes nos Estados Unidos da América são submetidos à anestesia anualmente (Antkowian, 2001).

Os anestésicos gerais são caracterizados, clinicamente, por causarem amnésia, analgesia, inconsciência e imobilidade aos estímulos nociceptivos (Antognini, Carstens, 2002; Hemmings et al 2005). São divididos em dois grupos, conforme sua via de administração: inalatórios e intravenosos. Os anestésicos inalatórios geralmente são utilizados para a manutenção da anestesia enquanto os anestésicos intravenosos são empregados para induzir a anestesia.

1.1 Anestésicos gerais

Os anestésicos gerais foram utilizados, pioneiramente, há mais de 150 anos e até os dias de hoje, o mecanismo de ação desses agentes permanece obscuro. A dificuldade de determinação dos alvos potenciais desses agentes reside na multiplicidade de efeitos que os mesmos são capazes de gerar nos pacientes, uma vez que cada efeito anestésico envolve a participação de diferentes regiões cerebrais e, conseqüentemente, distintos alvos celulares e moleculares (Hemmings et al 2005).

A amnésia ocasionada pelo uso de anestésicos gerais presumivelmente envolve circuitos do hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e córtex perirrinal, todos os quais são implicados na aprendizagem e memória (Hemmings et al 2005). O efeito da inconsciência relaciona-se ao tálamo, ao córtex e ao tronco cerebral (Sonner et al 2003), enquanto que a imobilidade aparentemente está envolvida com a depressão de vias reflexas na medula espinhal como conseqüência da supressão de mecanismos excitatórios ou da potencialização de mecanismos inibitórios (Sonner et al 2003). Já a analgesia está relacionada à atuação dos anestésicos no circuito da dor.

Além desses efeitos, os anestésicos gerais produzem consideráveis efeitos colaterais, sendo os principais, a depressão cardiovascular e respiratória, fraqueza, excitação e sonolência.

1.2 Mecanismos de Ação dos Anestésicos gerais

Após a descoberta dos anestésicos, iniciaram-se as tentativas para explicar os mecanismos moleculares de ação dos mesmos. Pioneiramente, em 1901, Meyer e Overton propuseram a hipótese lipídica, baseada na observação de que a potência dos anestésicos gerais é diretamente proporcional à solubilidade lipídica. Como os anestésicos eram moléculas pequenas que não possuíam uma estrutura química similar, ou seja, uma relação estrutura atividade, Meyer e Overton concluíram que a solubilidade lipídica, ao invés da estrutura química determinava o efeito anestésico. Dessa forma, apenas o número de moléculas anestésicas e não a estrutura química das mesmas era relevante para causar o efeito. Para explicar essa hipótese, Meyer propôs que as moléculas anestésicas são dissolvidas na membrana celular causando mudanças críticas nas propriedades físico-químicas da estrutura lipídica. Assim, inicialmente acreditou-se que os anestésicos atuavam nas membranas biológicas de maneira não – específica (Antkowiak, 2001).

Entretanto, apesar da boa aceitação naquela época, a hipótese lipídica não explicava observações diversas que começaram a ser feitas. Dentre elas, o fenômeno da interrupção, que consistia na perda da atividade anestésica quando um determinado comprimento da cadeia de hidrocarboneto do anestésico fosse atingido, embora a solubilidade lipídica continuasse a aumentar. Posteriormente a descoberta de que estereoisômeros de compostos anestésicos, que são igualmente solúveis em lipídeos, podem ser diferentemente efetivos em causar a anestesia também se contrapôs à teoria de que a bicamada lipídica da membrana plasmática seja o local de ação para os anestésicos (Franks, Lieb 1991; Tomlin et al 1998). Isômeros ópticos do isoflurano foram testados em camundongos e foi observado que o isômero S (+) foi 50% mais potente que o isômero R (-) (Harris, Moody, Skolnick, 1992; Franks et al 1998). Cabe ressaltar que a hipótese lipídica abrangia em sua explicação apenas os mecanismos de ação dos anestésicos gerais voláteis e excluía os anestésicos gerais intravenosos, sendo, portanto, incompleta.

Em 1984, Franks e Lieb realizaram um experimento cujos resultados sugeriram, pela primeira vez, que os anestésicos gerais poderiam interagir com as proteínas. Foi demonstrado que a proteína luciferase do pirilampo (conhecido popularmente como vaga-lume) era modulada por diversos anestésicos. Estes autores comprovaram que os anestésicos gerais, tanto inalatórios quanto intravenosos, eram capazes de inibir a atividade emissora de luz dessa proteína ao se ligarem a um domínio hidrofóbico da enzima.

Tal achado foi amplamente aceito pela comunidade científica concebendo-se a Hipótese protéica. Sendo os canais iônicos proteínas presentes nas membranas celulares que estão

claramente envolvidos com a neurotransmissão, os mesmos têm sido considerados os principais alvos de ação dos anestésicos no sistema nervoso de mamíferos (SN).

Os canais iônicos diferem-se tanto na seletividade para íons como no mecanismo de abertura. É cada vez mais evidente que a maioria dos anestésicos gerais afeta um grande número de diferentes canais iônicos (Antkowiak, 2001). Os canais iônicos se subdividem em diversos tipos, no entanto, dentre todos destacam-se os canais operados por voltagem, em que o mecanismo de abertura do canal é controlado pela variação de voltagem e os canais operados por ligante, onde após a ligação de uma molécula específica a um receptor associado a um canal iônico o mesmo se abre.

Os canais iônicos operados por ligantes parecem desempenhar um papel importante na anestesia. Os receptores ionotrópicos como o de ácido γ -aminobutírico do tipo A ($GABA_A$), o receptor nicotínico da ACh (AChn) e o receptor de glutamato são considerados sítios de ação dos anestésicos gerais (Campagna, Miller, Forman 2003). Da mesma forma os canais iônicos voltagem dependentes como os de Na^+ (CSSV), os de K^+ (CKSV), os de Ca^{2+} (CCSV) e os canais hiperpolarizados ativados por ligação de um nucleotídeo cíclico também são potenciais alvos da grande maioria dos anestésicos gerais (Hemmings et al 2005).

O receptor $GABA_A$ é considerado um alvo importante para a ação dos anestésicos (Zimmerman, Jones, Harrison, 1994). Existem evidências de que as ações dos anestésicos no receptor GABA estejam envolvidas na hipnose, imobilidade e amnésia, enquanto seu papel em produzir analgesia é incerto (Collins, Kending, Mason, 1995; McGaugh, Izquierdo, 2000). Os anestésicos gerais agem como moduladores alostéricos positivos ou negativos dos canais iônicos acoplados à ligantes. A maioria dos anestésicos inalatórios, incluindo todos os anestésicos voláteis do grupo do éter (como o isoflurano, o sevoflurano, o desflurano e o enflurano), alguns dos alcanos (como o halotano) assim como os barbitúricos, o propofol e agentes esteróides aumentam a função do receptor $GABA_A$, devido a um aumento no tempo de abertura do canal, ou seja, hiperpolarizam a célula, ao aumentar o influxo de Cl^- , favorecendo a neurotransmissão inibitória (Hemmings et al 2005, revisto por Franks, Lieb, 1994).

Os estudos realizados no intuito de se investigar a ação dos anestésicos gerais nos receptores de AChn têm revelado que a ativação destes receptores é inibida por anestésicos voláteis em concentrações subanestésicas (Violet et al 1997; Flood, Role, 1998; Raines, Claycomb; Forman, 2002; Raines, Claycomb, Forman; 2003). Um estudo realizado com o peixe *torpedo* demonstrou que os anestésicos voláteis alteram a afinidade de agonistas pelo receptor nicotínico (Firestone et al 1986). Rada e colaboradores (2003) também mostraram que o sevoflurano e o isoflurano reduzem a afinidade de ligação de agonista dos receptores de AChn

no cérebro. O bloqueio destes receptores pode deprimir a neurotransmissão através de uma inibição direta dos canais de cátion ou pela supressão indireta da liberação de neurotransmissores a partir do terminal pré-sináptico (Arias; Blanton; 2002). Da mesma forma, os anestésicos intravenosos, em concentrações clínicas relevantes, foram capazes de atuar nos canais iônicos acoplados à ligantes, incluindo os receptores nicotínicos (Franks, Lieb; 1994; Krasowski, Harrison, 1999; Yamakura et al 2001). Particularmente, os barbitúricos e o anestésico intravenoso cetamina foram capazes de inibir os canais nicotínicos neuronais (Andoh et al; 1997; Downie, Franks, Lieb, 2000; Flood, Krasowski, 2000; Yamakura et al, 2000; Coates, Flood; 2001; Coates et al 2001; Kamiya et al, 2001; Weber et al 2005).

Em adição aos seus efeitos proeminentes sobre os receptores GABA_A e sobre os receptores de AChn, os anestésicos gerais deprimem a transmissão sináptica excitatória pré-sinápticamente, reduzindo a liberação de glutamato. Os anestésicos inalatórios não halogenados, tais como xenônio, o óxido nitroso, o ciclopropano e o anestésico intravenoso cetamina têm pouco ou nenhum efeito sobre os subtipos de receptores gabaérgicos, no entanto, atuam bloqueando os receptores de glutamato do tipo NMDA (N- metil- D- aspartato) e, portanto, deprimindo a neurotransmissão excitatória devido a uma ação pós-sináptica. (Hemmings et al 2005). O propofol também atua de forma a inibir a liberação de glutamato porém, através de mecanismos pré-sinápticos (Ratnakumari, Hemmings;1997).

Em relação aos canais iônicos voltagem dependentes os anestésicos gerais agem de forma a influenciar na liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica. Quando um potencial de ação chega ao terminal nervoso a membrana despolariza-se e os CSSV se abrem, permitindo o influxo deste íon. Com a alteração do potencial de membrana ocorre abertura dos CCSV. O aumento local e transitório da concentração de Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺] induz a exocitose de vesículas sinápticas com consequente liberação do neurotransmissor na fenda sináptica, aproximadamente 100 μs após o estímulo desencadeado pelo potencial de ação (Rizo; Rosenmund; 2008). Assim, é compreensível que os canais de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ sensíveis à voltagem possam ser alvos pré-sinápticos dos anestésicos gerais, interferindo na transmissão sináptica. Dentre a família de canais de K⁺ apenas os canais TREK-1 são modulados por anestésicos gerais voláteis e gasosos (Honoré, 2007) e não por anestésicos intravenosos.

1.3 Neurotransmissão

Os terminais nervosos pré-sinápticos são regiões secretórias preparadas para executarem repetidos ciclos de liberação de neurotransmissores (Sudhof, 2004). No entanto, para que esse processo ocorra é necessária a presença de componentes fundamentais neste terminal, tais como canais iônicos para Ca^{2+} , Na^+ e K^+ dependentes de voltagem; as vesículas sinápticas repletas de neurotransmissores e competentes para fundirem com a membrana do terminal pré-sináptico e alguns complexos protéicos essenciais à ocorrência da exocitose, tais como o complexo SNARE (Soluble NSF attachment protein receptor). O complexo SNARE compreende um conjunto de três proteínas conhecidas como sinaptobrevina/VAMP (Vesicle-associated membrane protein), SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein 25) e sintaxina-1 as quais estão ancoradas nas membranas da vesícula sináptica (sinaptobrevina) e do terminal nervoso (SNAP-25 e sintaxina). Estas proteínas foram denominadas SNARES por possuírem uma seqüência codificante comum, altamente conservada, denominada motivo SNARE que apresenta alta propensão para formar super-hélices. O complexo SNARE consiste em um feixe de quatro hélices paralelas formado pela união dos motivos SNARE dessas três proteínas (Rizo, Rosenmund, 2008) (figura 1).

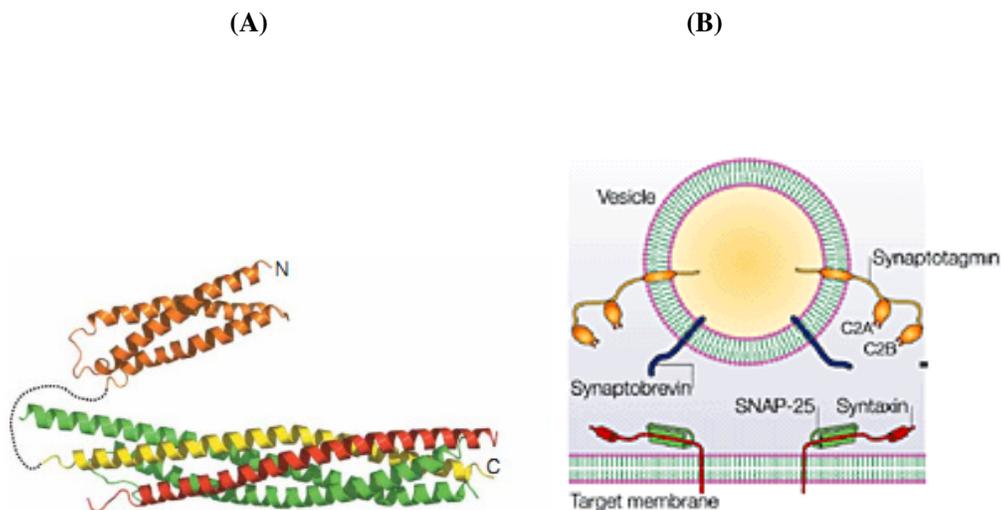


Figura 1 - Diagrama Estrutural Das Proteínas Componentes do Complexo SNARE. (A) Em vermelho sinaptotagmina/VAMP; em verde SNAP-25 com suas duas hélices componentes; em amarelo domínio C terminal da sintaxina -1 e em alaranjado domínio N terminal da sintaxina-1. (retirado de Rizo, Rosenmund 2008). (B) Esquema extraído de Chapman, 2002, demonstrando a localização da sinaptotagmina, SNAP-25, Sintaxina e da sinaptotagmina.

A principal função desse complexo é providenciar a aproximação das membranas das vesículas e do terminal pré-sináptico para prover a fusão das mesmas com consequente liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica. No entanto, para que esse processo ocorra é necessária a participação de uma gama de outras proteínas com características e funções distintas, estrategicamente localizadas em regiões específicas dos terminais nervosos (Takamori et al, 2006). Várias destas proteínas já têm o seu papel elucidado, enquanto outras ainda requerem estudos mais aprofundados para a determinação de sua função neste processo.

Todas as funções pré-sinápticas, direta ou indiretamente, envolvem as vesículas sinápticas, assim a compreensão da formação e da rota estabelecida por essas vesículas é essencial para o estudo da neurotransmissão. As vesículas sinápticas seguem uma rota de tráfego cíclica no terminal nervoso a qual pode ser dividida em passos sequenciais (para revisão Sudhof, 2004; Ryan, 2006).

Primeiramente, os neurotransmissores são ativamente transportados para dentro das vesículas sinápticas e as vesículas formadas se agregam formando um aglomerado vesicular que logo em seguida migra para a zona ativa (Sudhof, 2004). Nessa região, as vesículas se ancoram através do estabelecimento de interações protéicas entre a vesícula e o terminal pré - sináptico, passo este conhecido como ancoragem ou *docking*. Esse acontecimento é simultâneo a um estágio conhecido como amadurecimento ou *priming*. Nessa etapa, as vesículas passam por um estágio no qual se tornam competentes para formar um poro de fusão em resposta a um aumento da concentração intracelular de cálcio [Ca^{2+}]_i próxima à membrana do terminal pré-sináptico.

Após a abertura do poro de fusão, o conteúdo vesicular é liberado na fenda sináptica e as vesículas sofrem endocitose compensatória e posterior reciclagem, a fim de se evitar uma interrupção da neurotransmissão. A reciclagem pode ocorrer através de três possíveis mecanismos: (a) as vesículas são reacidificadas e preenchidas com neurotransmissor sem desancorarem, permanecendo no aglomerado de liberação rápida, passo chamado *Kiss-and-stay* (Barker, Dowdall, Whittaker, 1972); (b) as vesículas desancoram e reciclam localmente, passo chamado *Kiss-and-run*, onde são reacidificadas e preenchidas com neurotransmissor (Ceccarelli, Hulburt, Mauro, 1973), voltando aos passos iniciais do ciclo; ou (c) *full collapse*, onde as vesículas sofrem fusão completa com a membrana plasmática sendo posteriormente endocitadas via clatrina, reacidificam e preenchem novamente com neurotransmissores tanto diretamente ou passando por um intermediário endossomal (Heuser, Reese, 1973) (figura 2).

Ao final do ciclo das vesículas sinápticas, ocorre o recrutamento de duas proteínas chamadas α -SNAP (Proteína associada ao sinaptosoma) e NSF (Proteína de fusão sensível à N-etil-maleimida), presentes no citoplasma. Através da hidrólise de uma molécula de ATP (trifosfato de adenosina), a NSF promove a dissociação do complexo SNARE. Com isso, Syntaxina, SNAP-25 e VAMP se tornam então livres e prontas para um novo ciclo de exocitose.

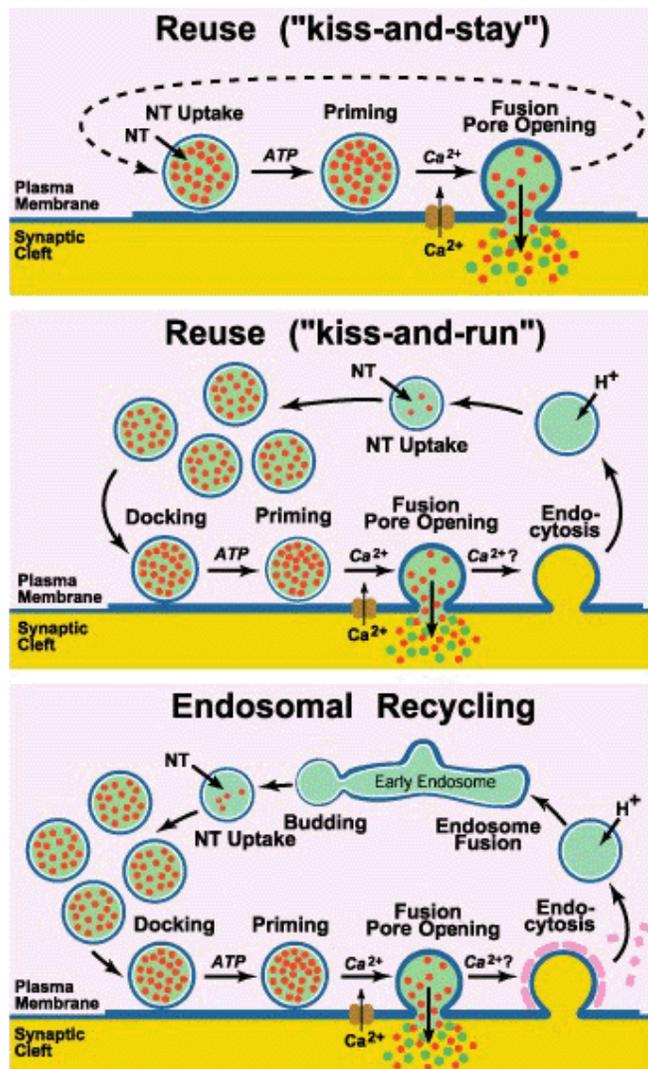


Figura 2 - O ciclo de vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas são preenchidas com neurotransmissor através de transporte ativo e formam um agrupamento de vesículas que migram para a zona ativa, se ancorando (*docking*). Nas zonas ativas, as vesículas se tornam competentes para fusão, processo chamado *priming*. Após a abertura do poro de fusão e exocitose, disparada por influxo de Ca^{2+} , as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclagem por diversas vias: local (*Kiss-and-stay*), reciclagem rápida sem formação de intermediário endossomal (*Kiss-and-run*) ou endocitose mediada por clatrina (*endosomal recycling*), a qual pode passar pela formação de um intermediário endossomal (retirado de Sudhof, 2004).

1.4 Neurotransmissão Colinérgica

Os relatos de estudos sobre a acetilcolina (ACh) iniciaram-se em 1907, quando Hunt propõe a participação dessa substância como mediadora da função celular. Posteriormente, em 1914 Dale demonstrou que a ação da ACh era capaz de mimetizar a estimulação de nervos

parassimpáticos. Em 1921, Loewi reconhece a ACh, pioneiramente, como um transmissor químico e, em 1935, Dale isola e caracteriza tanto a função quanto a estrutura desse agente de forma inovadora. (Taylor, Brown, 2006).

Quimicamente, a ACh é um éster de ácido acético e colina (Ch), cuja simplicidade estrutural subestima a complexidade das ações que exerce. Tal substância é essencial para o funcionamento do sistema nervoso e seu bloqueio agudo é geralmente letal, enquanto sua perda gradual, como observada na Doença de Alzheimer (DA), é associada com a deterioração progressiva de funções neurais (Hoffman et al, 2001). A ACh participa do controle central e periférico do movimento, funcionamento do sistema nervoso autônomo, regulação do sono e de múltiplos processos cognitivos como memória, atenção e aprendizado (Sarter, Parikh, 2005; Gold, 2003), sendo essencial ao bom funcionamento de nosso organismo.

1.4.1 Síntese de ACh

A síntese de ACh, que ocorre no interior do terminal pré-sináptico, inicia-se quando a colina acetil-transferase (ChAT), catalisa a transferência de um grupo acetil, proveniente de uma molécula de Acetil-CoA para uma molécula de Ch. Tal reação ocorre em um único passo, contrastando-se com a síntese das catecolaminas, que envolvem reações sequenciais (figura 3).

O acetil-CoA, composto requerido para a ocorrência dessa reação, tem seus níveis mantidos em concentrações ideais no terminal em decorrência da oxidação de ácidos graxos, da glicólise e do metabolismo de aminoácidos. O suprimento de Ch é provido, prioritariamente, pela dieta e, em pequenas proporções, pelo metabolismo da fosfatidilcolina presente nas membranas celulares devido à incapacidade dos neurônios em sintetizar Ch (Fernstrom, 1981; Zeisel, 1981).

A ChAT é encontrada predominantemente como uma proteína solúvel no citoplasma, com uma pequena parcela de sua população total associada à membrana ou ao núcleo (Gill, Bhattacharya, 2003). A atividade da ChAT é influenciada por sua distribuição, interação com proteínas celulares e estado de fosforilação (Dobransky, Ryllet, 2005). Ferramentas bioquímicas e farmacológicas indicam que a ChAT encontra-se em excesso cinético em relação aos seus substratos, sugerindo que sua ação não seja a etapa limitante da síntese de ACh (Blusztajn, Wurtman, 1983). Entretanto, uma redução da atividade da ChAT, encontrada em diferentes situações patológicas, pode reduzir a disponibilidade de ACh (Oda, 1999).

1.4.2 Captação de Ch pelo terminal pré-sináptico

A Ch é uma molécula pequena e sua carga positiva a impede de difundir-se pela membrana do terminal nervoso. Portanto, é necessário um sistema de transporte que possibilite a transferência da Ch do meio extracelular para o intracelular. Estudos em sinaptosomas

demonstraram a presença de dois sistemas de transporte de Ch: o sistema de baixa e o de alta afinidade (Yamamura, Snyder, 1973; Kuhar, Murrin, 1978). O primeiro apresenta baixa afinidade pela Ch e parece não estar associado com a manutenção dos níveis de ACh nos terminais colinérgicos. O sistema de alta afinidade está presente em neurônios colinérgicos e parece ser responsável pela captação de Ch a ser utilizada para a síntese de ACh. Este sistema é dependente de Na^+ extracelular e utiliza o gradiente químico deste íon como força motriz para a captação da Ch (Meyer, Engek, Cooper, 1982). A captação de Ch pelo sistema de transporte de alta afinidade é assumida como etapa limitante da síntese de ACh (revisado por Ribeiro et al, 2006).

1.4. 3 Transporte de ACh para vesículas sinápticas

Após a formação da ACh no interior do terminal pré-sináptico o neurotransmissor é transportado para o interior das vesículas sinápticas. Como a relação entre a concentração de ACh vesicular e citoplasmática é de 100:1, respectivamente, é necessário um mecanismo de transporte ativo para que a ACh seja transportada para o interior da vesícula. Assim, para que tal processo ocorra, destaca-se a presença de dois componentes na membrana das vesículas: uma bomba de prótons do tipo ATPase que bombeia prótons para o interior das vesículas, tornando-a ácida (pH próximo de 5) (Parsons, 2000); e o transportador vesicular de ACh (VACHT), que medeia a armazenagem de ACh em vesículas sinápticas por trocar ACh citoplasmática por prótons vesiculares. O VACHT é uma glicoproteína de 500-600 aminoácidos que troca dois prótons por uma ACh citoplasmática (Nguyen, Cox, Parsons, 1998). Este transporte de ACh para o interior das vesículas pode ser inibido pelo 2-(4-fenilperidino)-cicloexano (vesamicol), uma droga que age de maneira não competitiva bloqueando a armazenagem vesicular de ACh e, conseqüentemente, reduzindo a liberação deste neurotransmissor (Parsons et al, 1993).

1.4.4 Liberação e inativação de ACh

De acordo com a teoria da liberação vesicular da ACh, a liberação de ACh ocorre após a propagação de potencial de ação que ocasiona influxo de Na^+ e Ca^{2+} através de canais sensíveis à voltagem, levando à excitação das vesículas situadas próximas às zonas ativas junto ao terminal pré-sináptico (Katz, Miledi, 1965; Katz, Miledi, 1967; revisto por Neher, 1998).

Após a sua liberação, a ACh possui um mecanismo específico para o término de sua ação. Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage reversivelmente com receptores muscarínicos e nicotínicos pré e pós-sinápticos. Após dissociação dos receptores, a ACh é hidrolisada pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) em acetato e Ch (que é recaptada pelo transportador vesicular de Ch de alta afinidade para a síntese de novas moléculas de ACh). Portanto, cabe à AChE limitar as concentrações de ACh na fenda sináptica. A hidrólise da ACh

também pode ser catalisada por uma enzima relacionada a AChE, a butilcolinesterase (BuChE). A BuChE apresenta menor especificidade para a ACh que a AChE, e sua função ainda é pouco entendida (Darvesh, Hopkins, Geula, 2003).

A inibição da AChE é capaz de aumentar a duração de ação do neurotransmissor. A AChE é inibida por um grande repertório de toxinas animais, inseticidas (organofosforados e carbamatos) e fármacos que aliviam os sintomas de patologias que vão de glaucoma à doença de Huntington (Silman, Sussman, 2005). Os inibidores da AChE são especialmente úteis no tratamento de duas doenças com diferentes formas de comprometimento do sistema colinérgico: D.A e Miastenia.

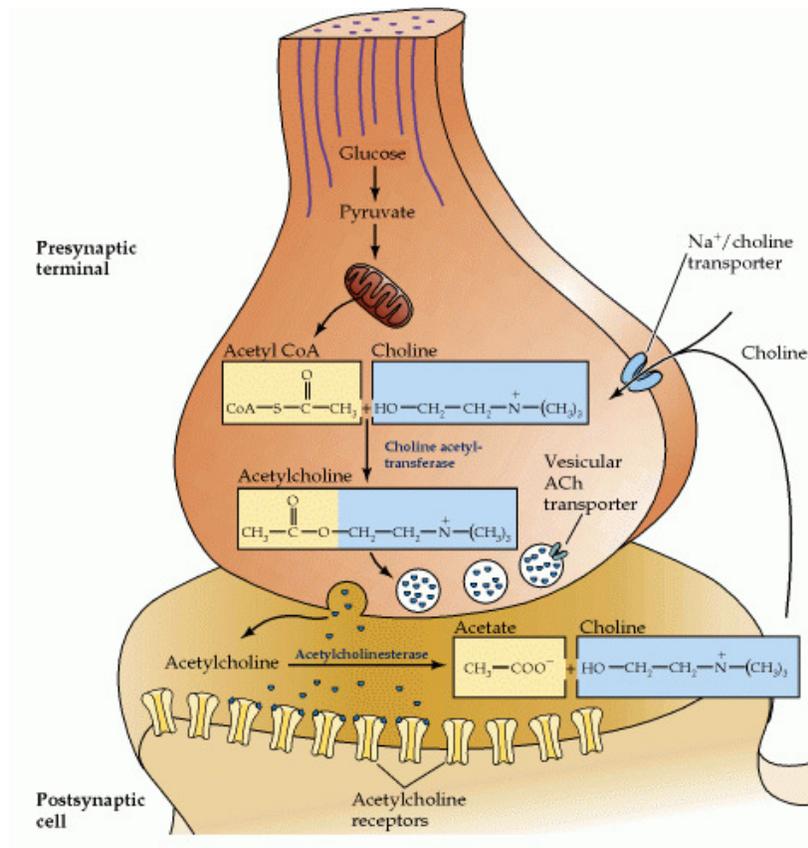


Figura 3 - Desenho esquemático representando a síntese, armazenamento, liberação e inativação da ACh em um terminal sináptico. A síntese de ACh inicia-se quando o Acetil-CoA transfere o grupo acetil para a molécula de Ch devido á ação da ChAT. A molécula recém-formada é armazenada em vesículas, de forma ativa, pela ação do VAcHT. Com a chegada de um potencial de ação, o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica e pode exercer sua ação ao se ligar aos receptores presentes no terminal pós – sináptico. Pela ação da AChE a ACh é rapidamente hidrolisada em acetato e Ch. Esta é recaptada pelos transportadores de Ch presentes na membrana do terminal pré-sináptico reiniciando um novo ciclo de síntese do neurotransmissor (modificado de Purves, Augustine, Fitzpatrick, 2001).

1.5 Hipocampo

O hipocampo é uma formação cortical localizada no lobo temporal do cérebro. É um importante componente do sistema límbico, que se caracteriza por ser um conjunto de estruturas situadas desde o telencéfalo até o mesencéfalo, que atua no controle das emoções, dos processos motivacionais, da memória, da aprendizagem, e que ainda tem participação na regulação do sistema nervoso autônomo e da interação neuroendócrina.

Anatomicamente o hipocampo é dividido em quatro regiões estruturalmente distintas: córtex entorrinal (CE), o giro denteado (GD), o Corno de Ammon (CA) e o complexo subicular (Sub) (Figura 4). O GD compreende uma camada de células granulares, pequenas e bem próximas, dispostas em semi-círculos. O C.A., densamente povoado por células piramidais semelhantes às encontradas no neocórtex, se divide em 4 regiões: a região CA4 , que está na base do giro dentado; a CA3; a pequena área CA2 e finalmente a CA1. Após a região CA1 está o subiculum, que se subdivide em presubiculum e parasubiculum, e que corresponde à região de transição do hipocampo para o córtex.

Pesquisas anatômicas e eletrofisiológicas indicam que o hipocampo contém um circuito neuronal muito bem definido, de forma que, as informações fluem do CE, para o GD, de onde prosseguem para a região CA3 e dali para a CA1. Dessa região seguem para o subiculum e para as regiões medial e lateral entorrinal (Jarrard, 1980).

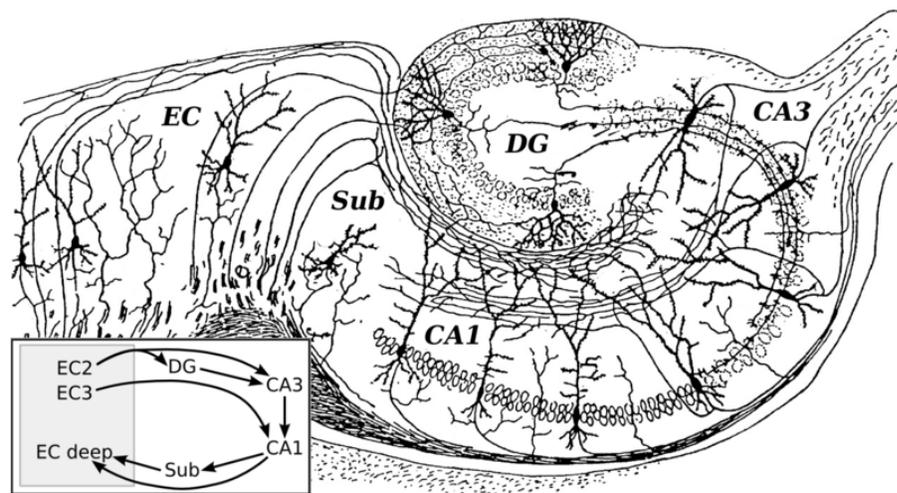


Figura 4 - Desenho esquemático representando as diferentes regiões anatômicas do hipocampo. Representação das diferentes regiões hipocampais. Em detalhe, representação do circuito neuronal hipocampal. (EC = córtex entorrinal; DG = giro denteado; CA= Corno de Ammon; Sub = complexo subicular). Imagem extraída de Ramon y Cajal. *Histologie du Système Nerveus de l'Homme & des Vertébrés*, Vol. 2. L Azoulay (transl), 1911.

1.5.1 Hipocampo e memória

A relação do hipocampo com o processo de formação da memória é conhecida desde 1957 quando Willian Becher Scoville e Brenda Milner sugeriram que lesões no hipocampo e no giro hipocampal causavam efeitos deletérios na formação da memória. Neste trabalho é relatado um estudo de caso envolvendo um paciente que foi submetido a uma cirurgia para retirada do lobo temporal medial em busca de alívio para suas crises epiléticas. Segundo relatos, durante o radical procedimento cirúrgico uma área de aproximadamente 8 cm foi afetada ocasionando lesões no hipocampo e no giro hipocampal, bilateralmente, o que fez com que o paciente apresentasse quadros de amnésia. O paciente apresentou graves déficits na memória declarativa (capacidade de lembrar fatos e eventos cotidianos) e quadros de amnésia anterógrada. Apesar de tais sequelas a memória perceptiva e a cognitiva permaneceram intactas. Nesse trabalho, Scoville e Milner sugerem que o processamento da memória mediado pelo hipocampo começa durante a aprendizagem e se estende até a consolidação da memória por um prolongado período (Scoville; Milner, 1957).

Análises neurofisiológicas e exames de imagens contrastando pacientes normais e pacientes amnésicos demonstraram a real participação do hipocampo na formação da memória (Aggleton, Brown, 1999; Eichenbaum, Cohen, 2001; Squire, Stark, Clark, 2004). Esses estudos demonstraram a participação do hipocampo também na memória episódica (capacidade de recordar experiências pessoais). Em um estudo realizado por Hales e Brewer, em 2011, 296 fotografias foram demonstradas a estudantes que estavam conectados a aparelhos de ressonância magnética capazes de mapear as funções do cérebro de cada um deles, individualmente. Após um período de 30 minutos sem o contato com as imagens, os estudantes tinham que apontar as imagens que se lembravam. Hales e Brewer demonstraram que sempre que uma imagem era reconhecida pelos alunos, o computador apontava maior metabolismo nas áreas do hipocampo e do cortex frontal, indicando a relação dessas áreas com o processo de consolidação da memória.

1.5.2 Distribuição de ACh no hipocampo

No hipocampo, não estão presentes neurônios colinérgicos, no entanto, tal estrutura cerebral recebe projeções de neurônios colinérgicos de três grupos cerebrais. Dessa forma, o suprimento de ACh é mantido em níveis adequados no hipocampo, garantindo seu bom funcionamento (figura 5). Segue abaixo a relação dos três grupos que fornecem o neurotransmissor para o hipocampo e adjacências:

1. Grupo do núcleo septal médio: projeta axônios de neurônios colinérgicos para o hipocampo e para o giro para-hipocampal.

2. Grupo do núcleo basal: projeta axônios de neurônios colinérgicos para todas as partes do neocórtex, sistema límbico e amígdala.
3. Grupo dos neurônios pontomesencefálicos tegumentais: projetam axônios de neurônios colinérgicos para rombencéfalo, hipotálamo, tálamo e prosencéfalo basal.

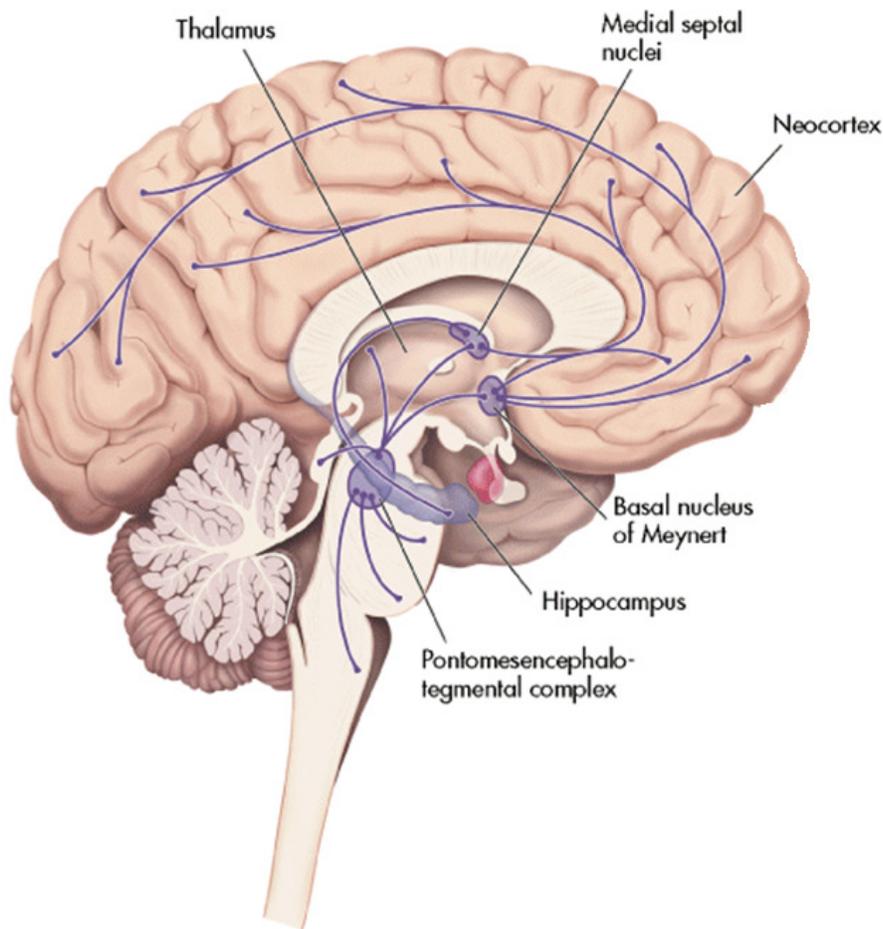


Figura 5 - Projeções de neurônios colinérgicos para o hipocampo. O hipocampo não apresenta neurônios colinérgicos, tendo seu suprimento de ACh garantido pelo fornecimento de três grupos: o grupo do núcleo septal médio; o grupo do núcleo basal e o grupo dos neurônios pontomesencefálicos tegumentais. (Figura extraída de <http://m.psychiatryonline.org/content.aspx?bookid=29§ionid=1348983>).

1.6 Propofol

O propofol, ou 2,6-diisopropilfenol, é um agente hipnótico intravenoso, não barbitúrico, amplamente utilizado para indução e manutenção da anestesia em adultos e em crianças com mais de três anos de idade, bem como para a sedação de pacientes internados em Unidades de Cuidado Intensivo. Sua grande aceitação na área clínica é decorrente de sua capacidade de induzir a hipnose rapidamente (em torno de 40 segundos); de permitir que o paciente se recupere ligeiramente (entre 10 e 15 minutos) e devido aos poucos efeitos colaterais que causa (Infarmed, 2002).

A curta latência do propofol é atribuída à imediata elevação de sua concentração no SNC, o que gera depressão deste sistema devido ao efeito inibitório exercido por este agente sobre os receptores do GABA e devido ao decréscimo do metabolismo cerebral (Concas et al. 1991). A rápida redistribuição do fármaco para outros tecidos e órgãos é a responsável pelo curto período farmacológico de ação e pela rápida recuperação observada, normalmente sem episódios de excitação (Morgan, Legge, 1989; Paddleford, 2001) e pode ser dividida em três fases. A primeira que se caracteriza por uma distribuição rápida do fármaco nos tecidos a partir da corrente sanguínea (meia-vida 2-4 minutos), a segunda onde acontece a metabolização do agente no fígado (meia-vida 30-60 minutos) e, finalmente, a terceira fase onde ocorre a redistribuição lenta do fármaco a partir dos tecidos menos irrigados de volta à corrente sanguínea (Infarmed, 2002).

Apesar de todas as vantagens relacionadas ao uso do propofol uma revisão da literatura revela situações em que a infusão prolongada (> 48h), de doses altas (> 4mg/kg/h), pode resultar no aparecimento de uma complicação rara, mas fatal: a síndrome de infusão do propofol (Fodale, Monaca, 2008). Esta síndrome caracteriza-se por acidose metabólica, atraso da condução cardíaca com bradicardia que pode evoluir até assistolia, rabdomiólise dos músculos esquelético e cardíaco, insuficiência renal e morte.

Dentre os principais efeitos colaterais causados pelo propofol, destacam-se a hipotensão, a depressão respiratória (apnéia) e a dor no local da injeção.

1.6.1 Mecanismos de ação do propofol

Os efeitos do propofol no SNC são múltiplos e ainda não foram completamente estabelecidos. Apesar de que a última década apresentou um grande progresso no conhecimento adquirido sobre a anestesia geral os mecanismos moleculares e celulares de ação dos anestésicos gerais ainda não estão compreendidos. Tal dificuldade reside no fato de que não existe um único mecanismo de ação capaz de justificar os múltiplos efeitos gerados por cada anestésico. Cada agente anestésico apresenta sua particularidade e age de forma diferenciada em cada região do

SNC. Além disso, cada anestésico é capaz de gerar diferentes efeitos nos pacientes e cada um desses efeitos observados pode ser decorrente da ação do anestésico numa região celular específica gerando uma cascata molecular única para aquele efeito. Assim, ao estudar o mecanismo de ação de um agente anestésico é interessante tentar desvendar sua atuação nos níveis regional, celular e molecular além de tentar estabelecer a relação entre o efeito observado e o mecanismo de ação descoberto.

Em relação à região de atuação dos anestésicos existe um consenso na literatura de que todos esses agentes exercem seus efeitos no SNC, pois, esse grupo de substâncias afetam funções sob controle do sistema nervoso tais como a memória, a consciência, o limiar de dor e a mobilidade (Hemmings, 2005). Além disso, é sabido que os anestésicos são capazes de atuar nos terminais sinápticos, tanto nas regiões pré como as pós-sinápticas (Leite et al 2011), estimulando a neurotransmissão inibitória e bloqueando a neurotransmissão excitatória (Richards, 2002; Pearce, 2003).

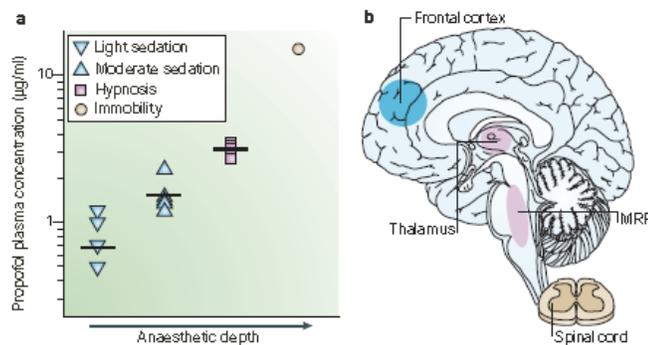
Apesar de atuarem no SNC cada anestésico é capaz de exercer um efeito diferenciado em cada região do SNC. Em baixas concentrações (1-2 $\mu\text{g/mL}$) o propofol induz sedação nos pacientes decorrente de sua ação prioritária no córtex frontal. Concentrações em torno de 4 $\mu\text{g/mL}$ ocasionam hipnose com efeito no tálamo e no mesencéfalo, enquanto, doses altas deste anestésico atuam na medula espinhal induzindo os quadros de imobilidade (figura 6).

Em nível celular existe um grande número de evidências sugerindo que concentrações clínicas de grande parte dos anestésicos gerais atuam em receptores específicos acoplados á canais iônicos presentes nas células como os receptores para GABA e para glutamato ou em importantes canais iônicos tais como os CSSV e os CKSV (Hemmings et al 2005). O principal mecanismo de ação do propofol, dentre os já descobertos, está relacionado aos seus efeitos sedativos, hipnóticos e à imobilidade que causa (figura 6). Tais efeitos são atribuídos à interação deste fármaco com o sítio alostérico do receptor GABA_A . Ao interagir com este sítio o propofol é capaz de exercer seu efeito molecular potencializando as correntes evocadas por baixas concentrações de GABA, aumentando assim, a eficácia do agonista. Em concentrações maiores, esse agente é capaz de abrir diretamente o canal do receptor de GABA permitindo a entrada de Cl^- na ausência de GABA e levando à hiperpolarização neuronal. (Concas et al, 1991; Hara, Kai, Ikemoto, 1993; Orser et al 1995).

Em relação aos receptores para glutamato, acredita-se que o propofol esteja relacionado à inibição da liberação deste neurotransmissor através de mecanismos pré-sinápticos (Ratnakumari, Hemmings, 1997). Segundo Orser e colaboradores (1995), esse agente é capaz de atuar inibindo o receptor de glutamato do tipo NMDA, possivelmente através da modulação alostérica do canal. Segundo Rudolph (2004), ainda existem evidências da atuação do propofol

nos receptores de glicina, no entanto, os mecanismos moleculares de ação do anestésico neste receptor e nos canais iônicos para Na^+ e Ca^{2+} , assim como os efeitos derivados da ação em tais alvos ainda não foram esclarecidos (figura 6).

O anestésico em questão tem seu uso amplamente difundido, principalmente, pela conhecida característica do mesmo em gerar quadros de amnésia anterógrada nos pacientes. De acordo com a literatura a redução na liberação de ACh no hipocampo pode estar relacionada com déficits na formação da memória (Gorman et al 1994), uma vez em que esse neurotransmissor e tal área cerebral estão envolvidos no processo de formação de memória. Dessa forma, a análise do efeito do propofol na neurotransmissão colinérgica pode ser um dos mecanismos que justifique o efeito fisiológico de amnésia característico desse agente. Desenvolvendo papel chave na neurotransmissão, os canais iônicos são considerados potenciais alvos moleculares de ação dos anestésicos gerais. Trabalhos prévios, realizados nos terminais sinápticos do SNC, relatam a ação inibitória do propofol em canais de Ca^{2+} . (Inoue et al 1999; Shirasaka et al 2004; Martella et al 2005). Em adição a esta evidência, a literatura corrobora sugerindo que altas doses de propofol podem ter efeito direto nos canais de Na^+ (Frenkel, Urban, 1991; Frenkel, Duch, Urban 1993; Ratnakumari et al, 2001; Lingamaneni, Hemmings 2003; Martella et al 2005).



C

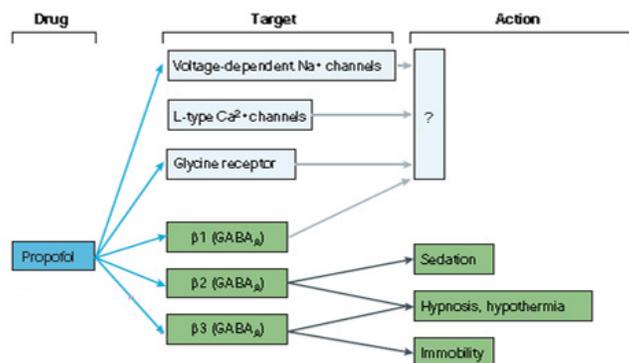


Figura 6 - Efeitos desencadeados pela anestesia com o propofol em humanos.(A) Correlação entre a concentração de propofol no plasma sanguíneo e os efeitos anestésicos. (B) Efeitos diferenciados do propofol em distintas regiões cerebrais. (C) Possíveis alvos de ação moleculares do propofol e a correlação com os efeitos causados por esse agente. (Rudolph, 2004).

1.7 Canais Iônicos

A presença de carga elétrica impede os íons de terem livre passagem através da bicamada lipídica. Assim, o fluxo de íons nas células é executado através de canais iônicos. Estes são complexas estruturas formadas por proteínas integrais de membrana, de estrutura tridimensional, que formam túneis seletivos para a passagem de alguns íons entre os meios intra e extracelular.

Nas células existem canais iônicos seletivos para os íons Ca^{2+} , Cl^- , K^+ e Na^+ . Focaremos nosso estudo apenas nos canais iônicos de Na^+ e Ca^{2+} .

1.7.1 Canais de Na^+

Os CSSV são glicoproteínas heteroméricas integrais de membrana que podem ser diferenciadas pela sua estrutura primária, cinética e sensibilidade relativa à neurotoxina tetrodotoxina (TTX). São constituídos de uma subunidade α de aproximadamente 260 kDa (aproximadamente 2000 aminoácidos), que está associada com uma ou mais subunidades β reguladoras ($\beta 1$ - $\beta 4$) de aproximadamente 35 kDa cada (Catterall, 2000).

Cada subunidade α é composta de quatro domínios homólogos (I-IV) que contém cada um seis segmentos transmembrana, S1-S6 (figura 7). Esses domínios estão organizados ao redor do poro central do canal. Cada segmento S4 presente em cada um dos domínios contém uma grande concentração de cargas positivas devido à presença do aminoácido arginina e atua como o sensor de voltagem do canal, sendo responsável pela ativação do mesmo (figura 7). O segmento S4 é atraído pelo interior celular eletrostaticamente. Em consequência da despolarização celular, S4 move-se para o lado extracelular. Tal movimentação puxa o link presente entre os segmentos S4 e S5 curvando o segmento S6, iniciando a abertura do poro central do canal (Catterall, Kalume, Oakley, 2010). O movimento do segmento S4 dos domínios I, II e III está associado com a ativação do canal (Stühmer et al, 1989), enquanto o segmento S4 do domínio IV está relacionado com a inativação do canal (Chanda, Bezanilla, 2002). O segmento S6 de todos os domínios forma a superfície interna do poro. O loop presente entre os segmentos cinco e seis compõem o poro do canal formando um filtro iônico seletivo

entre os meios intra e extracelular (Galimberti, Michael, Dawwod, 2012).

As subunidades β são proteínas integrais de membrana compostas por um domínio N terminal extracelular, um domínio transmembrana e um domínio C terminal intracelular. São expressas em células excitáveis e não excitáveis. São encontradas no sistema nervoso e no coração; além disso, Patino e colaboradores demonstraram que podem estar presentes até mesmo na ausência de subunidades α nas células (Patino, Isom, 2010).

Uma ou mais subunidades β podem se associar a uma subunidade α através de ligações não covalentes (subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$) ou através de ligações covalentes (subunidades $\beta 2$ e $\beta 4$) (Yu, Catterall 2003; Catterall, Goldin, Waxman, 2005; Patino, Isom, 2010). As subunidades β atuam como proteínas regulatórias que podem tanto garantir a adesão celular quanto a expressão dos CSSV na superfície celular aumentando a densidade dos canais de Na^+ e a excitabilidade celular (Galimberti, Michael, Dawwod, 2012). Também são importantes para a migração celular, para modular as propriedades biofísicas das subunidades α (Patton et al, 1994) e interagem com o citoesqueleto (Isom, 2002).

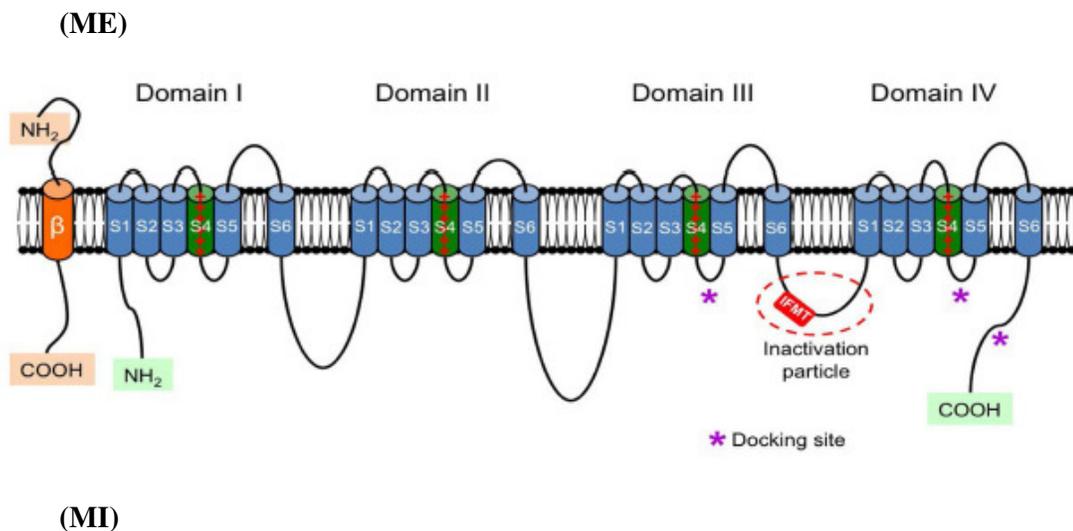


Figura 7- Representação esquemática de um único canal para Na^+ sensível à voltagem.

Estrutura primária das subunidades dos canais iônicos ativados por voltagem. ME: meio extracelular; MI: meio intracelular. Figura extraída de Galimberti, Michael, Dawwod, 2012.

1.7.2 Canais de Ca²⁺

Na maior parte das células o Ca²⁺ desenvolve suas principais funções de sinalização quando sua concentração citoplasmática é elevada. O aumento do Ca²⁺ intracelular é essencial para a neurotransmissão, pois, permite a formação dos microdomínios de Ca²⁺, que se localizam, preferencialmente, nas zonas ativas dos terminais pré-sinápticos, em correspondência com os aglomerados de vesículas sinápticas (Llinas et al, 1992), favorecendo a ocorrência da exocitose.

O influxo de Ca²⁺ responsável pela liberação de neurotransmissores é desencadeado pelos canais operados por voltagem (Katz, 1969). Estes são membros de uma superfamília de canais catiônicos sensíveis à voltagem e são compostos por 4 ou 5 diferentes subunidades: α_1 , β_1 , $\alpha_2\delta$ e γ (figura 8-A).

A subunidade α_1 é a maior das subunidades com peso molecular de 190-250 kDa. Ela incorpora o poro condutor, o sensor de voltagem, o aparato de *gating* e os sítios de regulação do canal por segundo mensageiro, drogas e toxinas. A subunidade α_1 é estruturalmente organizada de forma similar à subunidade α dos CSSV: apresenta quatro domínios homólogos (domínio I-IV), cada um contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6) (figura 8-B). O segmento S4 serve como sensor de voltagem. A alça do poro entre o segmento S5 e S6 de cada domínio determina a condutância iônica e a seletividade. No total, já foram descritas dez subunidades α_1 e cada uma delas apresenta funções e distribuição especializada (figura 8-C). Mudanças em apenas três aminoácidos na alça do poro entre os domínios I, III e IV convertem um canal seletivo a Na⁺ para um canal seletivo a Ca²⁺ (Catterall, Goldin, Waxman, 2005).

A subunidade intracelular β compreende quatro distintas isoformas : β_1 - β_4 que se diferem quanto à localização. $\beta_1\alpha$ apresenta-se no músculo esquelético enquanto β_1b é a isoforma neuronal e cardíaca; β_2 foi inicialmente clonada a partir de músculo cardíaco; β_3 está presente no músculo cardíaco, no músculo liso e no tecido neuronal e β_4 foi clonado a partir do cérebro (Dolphin, 2006).

A subunidade auxiliar $\alpha_2\delta$ é codificada por apenas um gene cujo único produto polipeptídico formado é clivado em α_2 e em δ . Apresenta quatro distintas isoformas: $\alpha_2\delta_1$, predominantemente encontrada no músculo esquelético; $\alpha_2\delta_2$ de distribuição ubíqua; $\alpha_2\delta_3$ que está localizada principalmente em neurônios e $\alpha_2\delta_4$ de localização neuronal. Já a subunidade γ está presente em canais iônicos para Ca²⁺ presentes no músculo esquelético.

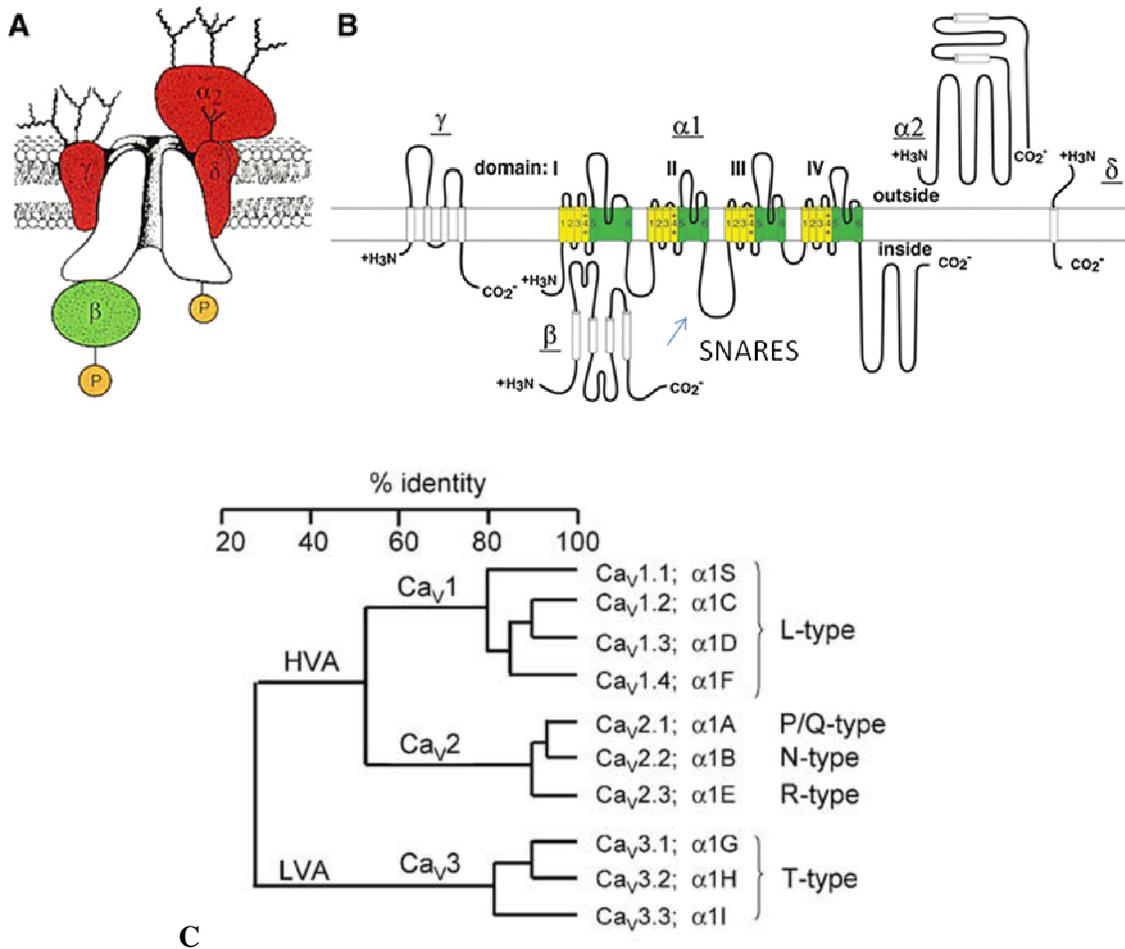


Figura 8 - Representação esquemática de canal para Ca^{2+} sensível à voltagem. (A) Composição das subunidades e estruturas de canais para Ca^{2+} ativados por voltagem. (B) As hélices são representadas pelos cilindros. As linhas cheias correspondem aos segmentos de polipeptídios. Os sensores de voltagem são representados pelos cilindros amarelos e o poro formador do canal em verde. A seta indica o sítio de interação das proteínas SNARES na superfície intracelular da unidade α do canal. Figura extraída de Catterall, Few, 2008. (C) Dendograma dos canais de Ca^{2+} demonstrando a porcentagem de igualdade entre os diferentes subtipos de canais para Ca^{2+} . HVA: corrente ativada por grandes despolarizações; LVA : corrente ativada por baixas despolarizações; Ca_v : canais de cálcio sensíveis á voltagem (CCSV). Figura extraída de Dolphin, 2006.

As correntes de Ca^{2+} em neurônios são divididas em: corrente ativada por grandes despolarizações (HVA) e corrente ativada por baixas despolarizações (LVA). Os canais são classificados em vários subtipos. Os CSSV do tipo 1 (1.1 a 1.4) conduzem correntes do tipo L. CSSV do tipo 2 (2.1 a 2.3) conduzem correntes do tipo P/Q, N e R. CSSV do tipo 3 (3.1 a 3.3) conduzem correntes do tipo T. As correntes L, P/Q, N e R são ativadas por alta despolarização e a corrente T por baixa despolarização (Vacher, Mohapatra, Trimmer, 2008) (figura 8-C).

1.8 Modelo experimental: Sinaptosomas

Sinaptosoma é a designação dada, desde 1964 por Whittaker e colaboradores, para se referir ao terminal pré-sináptico isolado de um neurônio. Desde a sua descoberta são amplamente utilizados como modelo de estudo de mecanismos moleculares pré-sinápticos, tais como a recaptação e liberação de neurotransmissores, por representarem o mais simples sistema neuronal que ainda retém toda a maquinaria para a captação, síntese, armazenamento e exocitose de neurotransmissores (Dunkley, Robinson, 1986).

São obtidos através da homogeneização de uma região cerebral em uma solução isotônica e do subsequente fracionamento do tecido nervoso através de centrifugações consecutivas a velocidades e tempos pré-determinados para que ocorra a separação mecânica do terminal pré-sináptico do restante do axônio. Por serem formados por fosfolípidos da membrana celular são capazes de se auto-selarem após o isolamento do terminal formando vesículas de diâmetro entre 0.5-1 μm .

Diversos estudos desde 1960 tentaram, com sucesso, caracterizar os sinaptosomas funcionalmente e bioquimicamente (Whittaker 1962, Balázs, 1975, Morgan, Legge, 1976; Dunkley, Robinson, 1986; Dunkley, 1987; Polosa, Attardi, 1991; Ahston, Ushkaryon, 2005;). Tais estruturas são capazes de sintetizar ATP (trifosfato de adenosina); contém mitocôndrias; contém canais iônicos, receptores e transportadores na membrana celular que os permitem manter o potencial de membrana e a homeostase iônica; contém vesículas sinápticas elétronicamente ativas de 50 nm de diâmetro que podem captar e liberar neurotransmissores; suas membranas podem ser recicladas por exocitose; contém um completo conjunto de proteínas e enzimas normalmente presente nos terminais nervosos e em alguns casos, podem conter membrana pós-sináptica aderida ao terminal. Não dispõem da maquinaria necessária (exceto da presente na mitocôndria) para sintetizar proteínas e a capacidade de reparo de tal modelo experimental é limitada a poucas proteínas do complexo respiratório. Por essa razão, não podem ser usados para experimentos de transfecção de DNA e de RNAi (Dunkley, 2008).

Na temperatura de 37°C começam a perder rapidamente ATP, no entanto, se armazenados à 4°C e providos dos nutrientes necessários são capazes de permanecerem viáveis por até 6 horas sem perder a capacidade de manter seus níveis de ATP, gradientes iônicos e a liberação de neurotransmissores. Neste tempo são capazes de preservarem as propriedades bioquímicas, morfológicas e eletrofisiológicas da sinapse (Koh et al 1993).

Os sinaptosomas preparados do SNC de mamíferos normalmente são extraídos de regiões cerebrais como córtex e hipocampo por apresentarem divisões anatômicas em camadas de forma clara. As preparações sinaptosomais são heterogêneas no que se refere ao tipo de

neurotransmissor contido nas vesículas. Entretanto, é possível maximizar o neurotransmissor de interesse, escolhendo áreas cerebrais específicas que contenham maior concentração dessa substância. Por outro lado, não é possível separar subpopulações de sinaptosomas com neurotransmissor específico baseado em diferenças físicas como tamanho ou densidade (Nicholls, 1993).

1.9 Estímulos despolarizantes:

1.9.1 Veratridina

Veratridina é uma toxina lipossolúvel derivada de plantas da família Liliaceae que tem tropismo por CCSV.

Atua, ligando-se preferencialmente ao sítio 2 do canal para Na^+ no seu estado ativado, causando abertura dos CSSV por mais tempo, o que leva a um maior influxo de Na^+ e consequente despolarização do terminal nervoso. Com a alteração do potencial de membrana os CCSV se abrem aumentando a concentração intracelular deste íon e acarretando a liberação do neurotransmissor.

A TTX é uma potente neurotoxina extraída de diversas espécies animais tais como salamandras, sapos, polvos, peixes e outras, que atua bloqueando a ocorrência de potenciais de ação nos neurônios através da ligação extracelular que estabelece com o domínio I da subunidade α do CSSV. Devido à esse bloqueio ocorre oclusão do poro exterior do canal e os íons Na^+ ficam impossibilitados de atravessá-lo, o que inibe a ocorrência do potencial de ação. Assim a TTX é capaz de inibir os efeitos causados pela veratridina. (Catterall, 1980; Hille et al, 1987).

Os nove subtipos de CSSV presentes em mamíferos têm cinéticas distintas, diferem na sua localização e quanto à sensibilidade a TTX. Concentrações nanomolares de TTX bloqueiam os canais de Na^+ do tipo 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, 1.7 (canais de Na^+ sensíveis á TTX). Os demais subtipos de CSSV necessitam de concentrações mais elevadas (micromolar) para serem bloqueados 1. 5, 1.8 e 1.9 (canais de Na^+ resistentes á TTX). Portanto, em mamíferos, os efeitos fisiológicos da TTX diferem entre os vários tecidos excitáveis, dependendo das isoformas de CSSV expressas nas suas células (Neto et al, 2012).

1.9.2 KCl

A concentração do íon K^+ em condições normais é de 4 mEq/L no meio extracelular e de 140 mEq/L no meio intracelular. Essa diferença de concentração do íon K^+ é mantida devido ao funcionamento da ATPase de Na^+ e K^+ presente na membrana das células que transporta três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular a cada ciclo, estabelecendo uma diferença de cargas entre o meio intra e o meio extracelular que é fundamental para a manutenção do potencial de membrana.

O aumento da concentração extracelular de K^+ induz o influxo desse íon. O aumento na concentração de cargas positivas no meio intracelular gera alteração no potencial de membrana e ocasiona abertura dos CCSV. Com isso, ocorre influxo de Ca^{2+} através destes canais e aumenta-se a $[Ca^{2+}]_i$. Esta pode estar aumentada através do influxo deste íon como também pela liberação de Ca^{2+} de estoques internos, por inibição do efluxo ou por seqüestro do mesmo.

O EGTA (Ácido tetra acético etileno glicol bis- β -aminoetil éter) é um ácido carboxílico poli-amínico, que tem grande afinidade pelo Ca^{2+} (Marks, Maxfield, 1991). É amplamente empregado como quelante de Ca^{2+} extracelular, e ao minimizar a disponibilidade deste íon no meio externo reduz o influxo do mesmo pelos CCSV impedindo o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ secundária a despolarização provocada pelo KCl. Como consequência, tem-se uma grande redução na liberação dos neurotransmissores.

II. Objetivos

2.0 Objetivo geral

Avaliar o efeito do propofol na liberação de [³H]-ACh, evocada por veratridina e KCl, em sinaptosomas de hipocampo de ratos.

III. Material e Métodos

3.0 Drogas e reagentes.

- Ácido clorídrico e Álcool Etílico Absoluto foram obtidos da LabSynth®, Brasil.
- 1,4- dioxano, ácido perclórico e hidróxido de sódio foram obtidos pela VETEC Química Fina Ltda., Brasil.
- POPOP, PPO, Propofol, HEPES, EGTA, BSA, D (+) Glicose, Naftaleno, Reagente de Bradford, Sacarose, TTX, Triton X-100 e Veratridina, foram obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO- EUA.
- Bicarbonato de sódio foi adquirido da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A.
- Cloreto de cálcio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, dihidrogenofosfato de sódio monohidratado, DMSO, foram obtidos da Merk S.A indústrias químicas, Darmstadt, Germany.
- Cloreto de [³H metil]- Ch (atividade específica 82 Ci/mmol; concentração radioativa de 1.0mCi/mL) obtida da Amersham Searle International, England.
- EnzyChrom™ Ch Kit e EnzyChrom™ ACh Kit foram adquiridos da Genese Produtos Diagnósticos Ltda., Brasil.
- Paraoxon foi obtido da Supelco Analytical, empresa pertencente à Sigma Chemical Company, St. Louis, MO- EUA.
- Tolueno foi adquirido da empresa Carlos Erba Reagents, Itália.

3.1 Soluções.

Todas as soluções utilizadas tiveram o pH ajustado para 7,4.

3.1.1 Meio de incubação.

Reagente	Concentração
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
NaHCO ₃	5 mM
MgCl ₂	1 mM
Na ₂ HPO ₄	1,56 mM
Glicose	10 mM
HEPES	20 mM
CaCl ₂	2 mM
Paraoxon	12 mM

Tabela 1 - Meio de incubação.

3.1.2. Solução despolarizante.

Reagente	Concentração
NaCl	95 mM
KCl	50 mM
NaHCO ₃	5 mM
MgCl ₂	1 mM
Na ₂ HPO ₄	1,56 mM
Glicose	10 mM
HEPES	20 mM
CaCl ₂	2 mM
Paraoxon	12mM

Tabela 2 - Solução despolarizante.

3.1.3 Sacarose 0,32 M.

3.1.4 Sacarose 0,8 M.

3.1.5 NaCl 0,15 M.

3.1.6 KCl 32mM

3.1.7 KCl 50mM

3.1.8 Veratridina 4mM

3.1.9. Paraoxon 8mM

3.1.10 Líquido de cintilação (solução de Bray).

Reagente	Concentração
Dioxano	15% v/v
Etanol	37,5% v/v
Naftaleno	7,2 % p/v
POPOP	0,02% p/v
PPO	0,5% p/v
Tolueno	37,5% v/v
Triton X-100	10% v/v

Tabela 3 - Líquido de cintilação (solução de Bray).

3.2 Animais.

Foram utilizados ratos albinos adultos, da raça Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 180 a 300 gramas fornecidos pelo CEBIO do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG-campus Pampulha. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura entre 22 – 26°C e disponibilidade luminosa controlada (14/10hs luz/noite).

Os ratos foram armazenados em caixas de dimensão 40X34X16 cm com, no máximo, dez animais de mesmo sexo e idade contendo água e comida disponíveis *ad libitum*. A cada dois dias as caixas dos animais eram assepsiadas, a maravalha trocada e a comida e a água eram renovadas.

Os animais foram acondicionados até o momento dos experimentos conforme sugerido pelo CETEA da UFMG e também foram sacrificados conforme os princípios do mesmo comitê. Houve a preocupação de minimizar, ao máximo, o número de animais utilizados ao longo do projeto.

3.3 Equipamentos.

- Agitador Vortex para tubos Quimis Aparelhos Científicos Ltda.
Modelo: Q220
- Balança eletrônica de precisão decimal Indústria e Comércio Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda.
Modelo BG 2000
- Banho - Maria microprocessado com agitação e temperatura regulável Quimis Aparelhos Científicos Ltda.
Modelo: Q215M1
- Câmara de Perfusão Brandel.
Modelo: SF-120
- Centrífuga refrigerada Hitachi.
Modelo: HIMAC CR20B2
- Espectrofotômetro de cintilação líquida PerkinElmer.
Modelo: Tri-Carb 2810TR
- Espectrofotômetro para dosagem de proteínas Hitachi.
Modelo: U-1100
- Espectrofotômetro de Fluorescência, VARIAN.
Modelo: Cary Eclipsev

- Guilhotina para decapitação Insight® Pesquisa e Ensino Ltda.
Modelo: EB-271
- Homogenizador de tecidos Marconi.
Modelo MA099
- pHmêtro de bancada Quimis Aparelhos Científicos Ltda.
Modelo: Q400AS
- Agitador de Solução Corning.
Modelo: PC420

3.4 Determinação da liberação de cloreto de [³H metil]- Ch em sinaptosomas de hipocampo de ratos.

3.4.1 Sacrifício dos animais e dissecação dos hipocampos.

Para cada experimento foram sacrificados dois ratos, sempre de mesmo sexo e de peso similar. Os animais foram sacrificados por decapitação utilizando guilhotina. O cérebro foi removido rapidamente, os dois hemisférios foram separados e os hipocampos foram dissecados sob uma placa de petri coberta com papel de filtro umedecido com solução de sacarose 0,32M. Depois de dissecados os hipocampos foram colocados em um tubo falcon, envolvido por gelo, contendo 10 mL de solução de sacarose 0,32M gelada. Sequencialmente os hipocampos foram transferidos para um tubo potter e macerados com auxílio de pistilo e homogenizador automático.

3.4.2 Preparação dos sinaptosomas de hipocampo de ratos.

Após macerados os hipocampos foram centrifugados a 4°C, por 2 minutos na velocidade de 3000g para retirada do excesso de mielina e sangue ainda presentes no material. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo de centrífuga já contendo 10 mL de solução de sacarose 0,8M gelada. Nessa etapa criou-se um gradiente de concentração bifásico composto na parte inferior pela sacarose 0,8M e na parte superior pelo macerado diluído na solução de sacarose 0,32M. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 4°C durante 30 minutos na velocidade de 26000g para que os sinaptosomas fossem finalmente formados.

3.4.3 Incubação do sinaptosoma com solução despolarizante.

Após o término da centrifugação de 30 minutos o sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspenso em 0,5 mL de meio de incubação e adicionado a um tubo de centrífuga já contendo 9,5 mL de solução despolarizante. Após a homogeneização esse material foi incubado no banho-maria, com agitação constante, à 37°C por 15 minutos. O estímulo despolarizante utilizado foi o KCl.

No momento em que o sinaptosoma era transferido para a solução despolarizante uma amostra de volume reduzido era retirada do mesmo, identificada e armazenada no freezer -20°C para posterior dosagem protéica. Tal procedimento era essencial para a confirmação da funcionalidade da preparação sinaptosomal naquele dia de experimento e também para a normalização dos resultados de liberação de ACh por mg de proteína.

3.4.4 Marcação do sinaptosoma com cloreto de [³H metil]- Ch.

Após a incubação com KCl o sinaptosoma era centrifugado á 4° C, por 10 minutos na velocidade de 15000g. O sobrenadante era desprezado e o pellet resuspendido em solução de Cloreto de [³H metil]- Ch diluída em meio de incubação.

Em seguida era realizada uma incubação no banho-maria, com agitação constante, á 37°C por 30 minutos, para que o sinaptosoma pudesse incorporar a Ch triciada presente no meio e consequentemente formar ACh marcada radioativamente.

Após essa etapa, o sinaptosoma era centrifugado a 4° C, por 10 minutos na velocidade de 15000g e o sobrenadante contendo o excesso de cloreto de [³H metil]- Ch era desprezado. O pellet resultante era composto pelo sinaptosoma marcado radioativamente que era resuspendido em 2,5mL de solução de sacarose 0,32M para dar continuidade ao protocolo experimental na câmara de perfusão.

3.4.5 Procedimentos na Câmara de Perfusão.

3.4.5.1 A câmara de perfusão.

A câmara de perfusão é um equipamento que permite a perfusão de amostras biológicas, tais como fatias tissulares e sinaptosomas, através da injeção automática de soluções e gases que podem fluir à temperatura e velocidade controladas, continuamente sobre as amostras. È um excelente modelo para avaliar eventos secundários tais como liberação de neurotransmissores e segundos mensageiros.

O aparato possui 12 mini-câmaras dispostas lateralmente e individualizadas onde as amostras biológicas são adicionadas e acondicionadas durante todo o experimento. Cada mini-câmara é composta de três partes: uma inferior, uma central e uma superior. A inferior (figura 9 – item 9) recebe as soluções vindas do pote (figura 9 – item 7) e falcons armazenadores (figura 9 – item 2) que escoam pelas mangueiras (figura 9 – item 11) até cada uma das mini- câmaras, representadas pela cor verde (partes superior e inferior) e rosa (parte central) no esquema abaixo. A parte central (figura 9 – item 4) é a região de acondicionamento da amostra. Cada

peça central de cada mini-câmara era revestida em ambas as extremidades por filtros discoidais de polietileno - whatman GF/B, BRANDEL, que apresentavam poros de diâmetro suficiente para permitir a passagem das soluções, mas, simultaneamente, reter os sinaptosomas nas mini-câmaras durante todo o protocolo experimental. A retenção exclusiva dos sinaptosomas era possível já que esses filtros são capazes de reter finamente membranas. Os mesmos ainda apresentam grande resistência à degradação em ambiente úmido, capacidade de retenção de partículas de tamanho superior a 1,0 μ m e resistem à velocidades altas de fluxo de soluções por serem formados pela associação de três camadas de papel filtrante.

A parte superior de cada mini-câmara (figura 9 – item 8) recolhe o excesso de solução que banha o sinaptosoma e o direciona para ser liberado nas estruturas coletoras metálicas (figura 9 – item 12) que liberam as soluções que acabaram de passar pelas amostras para o meio externo do equipamento de perfusão. As soluções liberadas podem ser eliminadas ou recolhidas e armazenadas pelo sistema de coleta automático acoplado ao aparelho.

Tal sistema torna a câmara de perfusão ainda mais interessante, pois, é composto por 12 colunas e 20 fileiras (figura 10) de tubos, sendo capaz de recolher, individualmente, efluentes liberados por cada mini-câmara, como esquematizado na figura 9 – item 5. Para realizar tal função o aparato perfusor conta com uma bandeja automatizada (figura 9- item 6) que pode deslocar em tempos pré-determinados para a esquerda ou para a direita. Cada coluna da bandeja se dispõe exatamente abaixo de cada mini-câmara. Assim a cada vez que a bandeja se desloca ela coleta frações de efluentes originados de cada mini câmara individualmente e simultaneamente. Em nosso protocolo a cada 2 minutos após o término da Série 1 (descrito no tópico 3.5.5.2) a bandeja se deslocava para a esquerda recolhendo as frações liberadas por cada mini-câmara. Eram recolhidas, de cada mini câmara, 10 frações.

O fluxo de solução pelas mini-câmaras era padronizado e equivalente a 0,5mL de solução por minuto e a cada 12 segundos as soluções em cada mini-câmara eram renovadas. Em nosso experimento utilizávamos a temperatura de 37°C que mimetiza as condições ideais corpóreas.

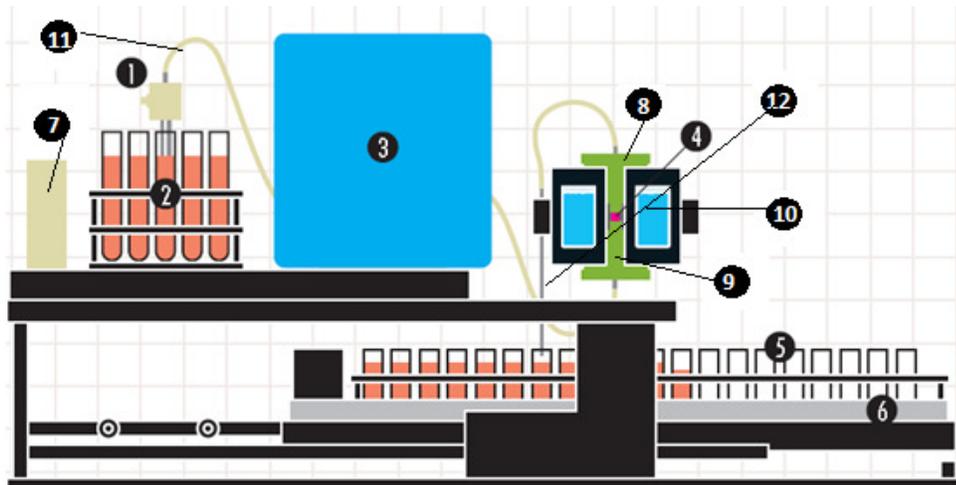


Figura 9 - Esquema da Câmara de Perfusão em vista lateral. A identificação das partes numeradas está descrita, detalhadamente, ao longo do texto.

Fileiras (1-20)

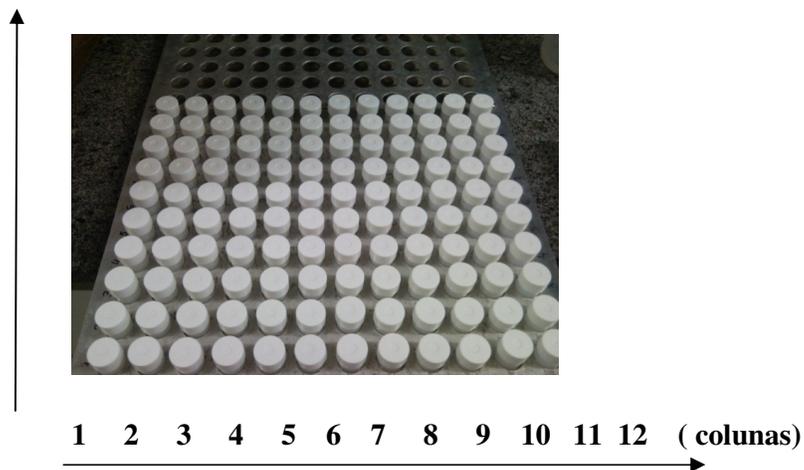


Figura 10 - Esquema da bandeja coletora de efluentes de cada mini-câmara do aparato perfusor.

3.4.5.2 Protocolo experimental na câmara de perfusão.

O primeiro passo, na câmara de perfusão, consistia na montagem da mesma. Após esse momento a câmara era ligada rapidamente para que meio de incubação fluísse pelas mangueiras demonstrando que as mesmas estavam funcionais e, caso estivessem, 200 μ L de sinaptosoma era adicionado em cada mini-câmara.

Permitia-se, então, a passagem de meio de incubação por todo o sistema até que as estruturas coletoras metálicas (figura 9 – item 12) gotejassem solução que acabara de passar

pelas amostras demonstrando que o sistema estava funcional. Neste momento o banho-maria acoplado a perfusão era ligado para que a temperatura da água contida no mesmo começasse a esquentar. Para esta fase eram contabilizados 5 minutos. Após esse tempo a circulação da água do banho para os reservatórios da câmara de perfusão era autorizada. Um intervalo de 14 minutos, mantidas as mesmas condições experimentais, era marcado. Este tempo era o necessário para que a água do reservatório da câmara atingisse a temperatura desejada de 37°C e para que a amostra biológica se recuperasse de toda a manipulação que havia passado previamente.

A partir desse instante o protocolo experimental se dividia em 5 séries sequenciais, conforme brevemente descrito abaixo:

Série 1: Incubação com drogas prévias ao estímulo despolarizante (propofol, EGTA, TTX – diluídas em meio de incubação) ou meio de incubação no caso de não haver incubação num determinado experimento. A série 1 tinha uma duração de 12 minutos. As soluções que gotejavam pelas estruturas coletoras metálicas até este momento eram desprezadas. Após esses 12 minutos o sistema de coleta automático era ligado e as frações gotejantes eram recolhidas a cada dois minutos. Dessa série era recolhida a fração 01, que apresentava baixa proporção de ACh (liberação basal) já que neste momento ainda não havia sido aplicado ao experimento nenhum estímulo para induzir a liberação do neurotransmissor.

Série 2: estímulo (Veratridina ou KCl). Essa fase durava apenas 2 minutos. A fração 2 recolhida durante esses dois minutos ainda era característica da série 1, pois, como a velocidade das soluções nas mangueiras era lenta ainda havia soluções da série 1 dispostas nas mangueiras no momento de coleta da fração 02. Assim, a liberação de ACh nessa fração também era mínima.

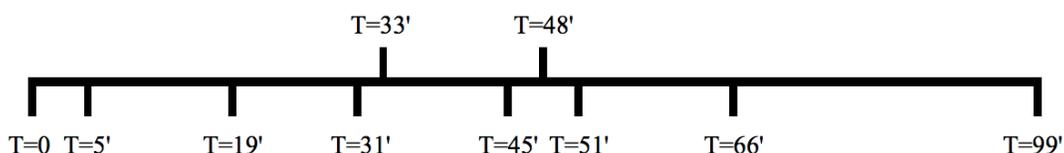
Série 3: passagem de meio de incubação. Essa fase durava 12 minutos e coletava a cada dois minutos as frações 3-8. A fração 3 apresentava uma grande proporção de liberação de ACh, pois, era consequente do estímulo despolarizante ocorrido na série 2.

Série 4: passagem de ácido perclórico durante 2 minutos na fração 9 e passagem de 1 minuto de ácido perclórico na fração 10. A intenção dessa fase era de que o ácido perclórico, com sua ação detergente, lissasse o sinaptosoma e permitisse que a ACh que ainda não tivesse sido liberada nas frações prévias por estimulação do KCl ou da veratridina fosse liberada nessa fase. Esse procedimento era importante, pois, durante a mensuração da liberação de ACh era necessário calcular a quantidade total do neurotransmissor produzido. Para atingir tal objetivo a ACh liberada entre as frações 1-8 (frações 1 e 2 com ACh basal e frações 3 a 8 com ACh

liberada estímulo) era somada com a ACh que foi produzida, mas não foi liberada mediante o estímulo (presente nas frações 9- 10). Através deste cálculo era possível mensurar a quantidade de ACh liberada individualmente em cada fração. A relação entre a ACh liberada em cada fração e o total do neurotransmissor produzido na totalidade do experimento menos a ACh já liberada nas frações anteriores fornecia a $\Delta\Sigma$ fração de liberação de ACh, princípio empregado na análise dos experimentos.

Série 5: passagem de meio de incubação até que o tubo da fração 10 se enchesse completamente.

Segue um esquema dos passos sequenciais do protocolo realizados na câmara de perfusão:



T=0 montagem da câmara de perfusão

T=5' Banho-maria era ligado. Temperatura da água aumentava. Fornecimento de meio para as mini-câmaras já contendo o sinaptosoma.

T=19' Chave de circulação do banho era ligada. Fornecimento de meio para as mini-câmaras já contendo o sinaptosoma.

T=31' Série 1 – Incubação- coleta da fração 01.

T= 33' Série 2 – Estímulo- coleta da fração 02.

T=45' Série 3- Passagem de meio de incubação. Coleta das frações 3-8.

T = 48' Série 4 - Passagem de ácido perclórico. Coleta das frações 9 e 10.

T=51' Série 5 - Passagem de meio de incubação até que a fração 10 se enchesse completamente.

T=66' Fim do experimento. Lavagem da câmara de perfusão.

T= 96' Fim da lavagem da câmara de perfusão.

Figura 11 – Diagrama de tempo do protocolo experimental, na câmara de perfusão.

3.4.6 Contagem da radioatividade das amostras.

Após o recolhimento das amostras 100 µL de cada uma delas eram pipetadas e transferidas para um eppendorf contendo 1 mL de solução de Bray. Logo em seguida eram vortexadas, limpas com kimwipes e inseridas cada uma em um vial do cintilador para que a radioatividade de cada amostra fosse ser mensurada.

3.4.7 Caracterização da [³H]-ACh liberada (kits de Ch e de ACh).

Durante a realização de nosso experimento, partimos do pressuposto que a [³H]-Ch oferecida ao nosso sistema seria incorporada pelo sinaptosoma e que com o auxílio da CHAT formaria [³H]-ACh. Dessa forma, a radioatividade que era mensurada pelo cintilador poderia ser fruto da presença tanto de [³H]-Ch como de [³H]-ACh. Com o objetivo de quantificar qual a proporção real de [³H]-ACh em nosso sistema adquirimos os kits “EnzyChrom™ Coline Assay Kit (ECHO-100)” e “EnzyChrom™ Acetylcholine Assay Kit (ECHO-100)” da empresa Genese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda., SP, Brasil.

Para a detecção da quantidade de Ch e de ACh presente nas amostras, alíquotas de 20µL das amostras experimentais recolhidas dos sinaptosomas eram colocadas em poços individuais de placas de 96wells já contendo 80µL da solução do kit de Ch. Outros 20µL das amostras experimentais recolhidas eram colocados em outros poços individuais da placa já contendo 80µL da solução do kit de ACh. Após 20 minutos da pipetagem das amostras era realizada a leitura das placas num espectrofotômetro de Fluorescência, da marca VARIAN e modelo Cary Eclipsev.

No ensaio de Ch, a dosagem da Ch livre presente nas amostras era dependente da oxidação da mesma pela enzima Ch oxidase presente no kit. Tal reação conduzia à formação dos produtos betaína e H₂O₂. O peróxido de hidrogênio, após ser imediatamente formado, reagia com um corante específico presente no kit para formar um produto de cor rosa. A intensidade da cor emitida por esta reação era diretamente proporcional à concentração de Ch na amostra.

No ensaio de ACh, a AChE presente no kit convertia toda a ACh presente na amostra em Ch. A Ch formada, por sua vez, passava pela mesma reação explicitada acima para o kit de Ch e era quantificada através da intensidade de luz emitida pela reação. Para a realização dos experimentos, a leitura no espectrofotômetro de Fluorescência foi ajustada para excitação num comprimento de onda de 530 nm e a emissão em 570 nM.

Foram feitas dosagens de quatro experimentos (n=4), em duplicata, das frações 1 até 4, tanto para amostras estimuladas com KCl 50 mM como para amostras estimuladas com

veratridina 50 μ M. Também foram feitas dosagens de amostras incubadas ou não com propofol, com o objetivo de verificar se o anestésico poderia influenciar na formação de [³H]-ACh derivada da [³H]-Ch.

3.4.8 Dosagem de proteínas.

A cada protocolo experimental amostras do sinaptosoma recém-formado eram retiradas e armazenadas a 4°C para posterior dosagem protéica e certificação da funcionalidade do sinaptosoma preparado naquele dia de experimento. A dosagem era realizada conforme descrito por Bradford, 1976. Os valores de dosagem protéica foram considerados como ideais quando estavam compreendidos entre 1,5 e 3,0 μ g/ μ L de sinaptosoma.

3.4.9 Análise estatística dos resultados.

Os experimentos foram realizados em dias independentes e foram repetidos, no mínimo, cinco vezes. Os resultados foram analisados, inicialmente, por uma tabela de Excel onde eram inseridos os valores de DPM da radioatividade emitida por cada amostra lida pelo cintilador. Com a introdução desses valores a tabela, automaticamente, calculava a quantidade total de ACh formada no sinaptosoma por meio do somatório da ACh liberada em cada fração com a ACh que não foi liberada mesmo com o estímulo e, portanto, ainda estava armazenada dentro do sinaptosoma (correspondente á fração 10). Após a obtenção do valor total de ACh formada era calculado o $\Delta\Sigma$ fração de liberação de [³H]-ACh. Em todos os experimentos realizados os valores de liberação de ACh do grupo controle eram utilizados para normalizar as demais condições experimentais.

Esse dados eram então plotados num gráfico onde era estabelecido a média de liberação de ACh por fração. Os resultados obtidos representam a média de duplicatas, de cinco experimentos realizados independentemente.

Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls, quando a análise era estabelecida entre três grupos ou mais. Quando a análise era restrita à comparação de apenas dois grupos, foi realizado o teste t não paramétrico seguido do teste de Mann Whitney. Para ambos os testes diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A quantificação e a análise estatística dos resultados foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA).

IV. Resultados

4.0 Efeito do propofol na liberação espontânea de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos.

A neurotransmissão sináptica inicia-se com a geração do potencial de ação no axônio do neurônio pré-sináptico que envolve mudanças nas concentrações Na^+ e K^+ . Esse potencial se propaga ao longo do terminal e promove a abertura de canais para Ca^{2+} regulados por voltagem. O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular induz a exocitose de vesículas sinápticas com conseqüente liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Tal mecanismo pode ser um alvo de ação dos anestésicos, uma vez em que uma das possíveis maneiras de atuação de tais agentes consiste na alteração da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (Griffiths R, Norman RI, 1993). Dessa forma, avaliamos, inicialmente o efeito do propofol na liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Assim, para testar se o anestésico seria capaz de alterar a liberação deste neurotransmissor, alíquotas de $200\mu\text{L}$ de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras da câmara e perfundidas com diferentes soluções de propofol. As concentrações testadas foram: propofol $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ e $1000\mu\text{M}$.

Os resultados apresentados na figura 12 demonstram que a liberação basal de ACh pelos sinaptosomas de hipocampo de ratos é muito baixa ($\Delta\Sigma$ fração de liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ média de 0,0057) e que o propofol apresentou uma tendência a inibir a liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ espontânea em todas as concentrações testadas do anestésico.

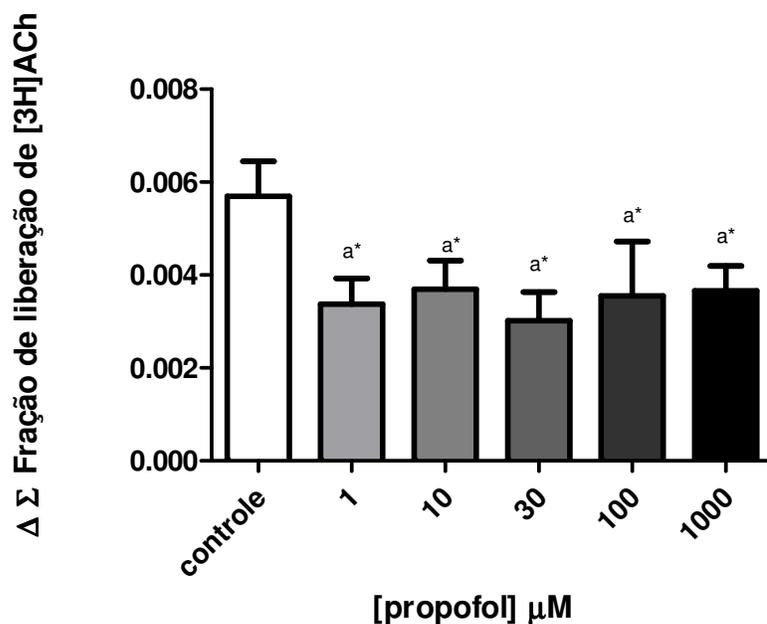


Figura 12 - O propofol reduz a liberação espontânea de [³H]- ACh. Alíquotas de 200µL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com soluções de propofol em diferentes concentrações de forma ininterrupta, assim com na Série 2, uma vez em que o estímulo para a liberação de [³H]-ACh era o próprio anestésico. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. a: estatisticamente diferente do controle, P <0,05. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

4.1 Avaliação do efeito da veratridina na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos.

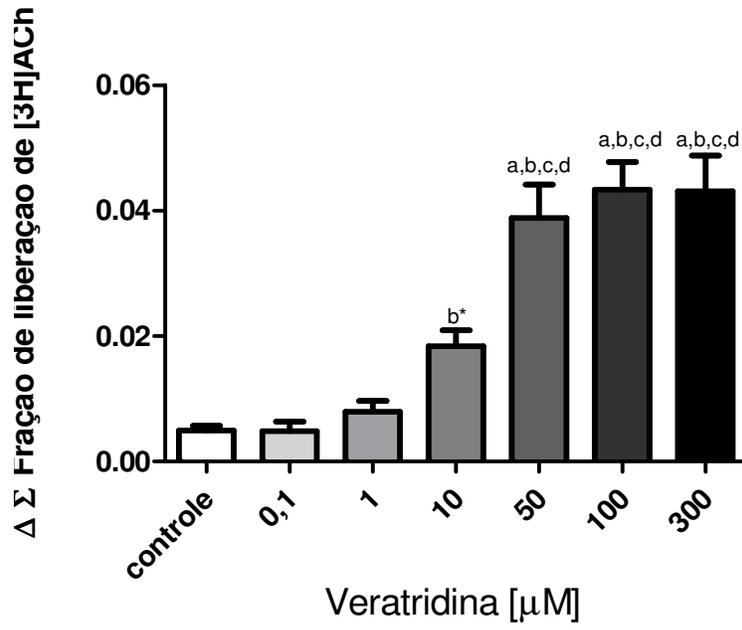
Após a observação de que o propofol apresentou tendência a inibir a liberação de [³H]-ACh espontânea em sinaptosomas de hipocampo de ratos decidimos avaliar se o anestésico era capaz de apresentar efeito semelhante quando a liberação de [³H]-ACh era evocada por veratridina.

A veratridina é uma toxina lipossolúvel que tem como alvo canais para Na⁺. Ela liga-se preferencialmente ao canal para Na⁺ no seu estado ativado, no sítio 2 do mesmo, causando persistente ativação deste através de um mecanismo alostérico que leva ao bloqueio da inativação e, mudança da dependência de voltagem do canal para um potencial de membrana mais negativo. A veratridina mantém estes canais CSSV ativados, o que leva ao influxo deste íon e conseqüente despolarização do terminal nervoso e influxo de Ca²⁺ através de CCSV. Assim, a despolarização causada pela veratridina é decorrente da participação CSSV, e secundariamente, do influxo de Ca²⁺.

A figura 13 demonstra que a veratridina é capaz de induzir a liberação de [³H]-ACh, de forma dose dependente, em todas as concentrações testadas: 0,1 µM; 1 µM; 10 µM; 50 µM; 100 µM e 300µM. Conforme indicado na figura 13 (A) não existe diferença estatística significativa (p>0,05) na liberação de [³H]-ACh induzida pela veratridina nas concentrações de 50 µM; 100 µM e 300µM. Assim, a partir de 50µM a liberação máxima de [³H]-ACh induzida pela veratridina atingiu um platô. Logo, a concentração que passamos a utilizar em nossos experimentos foi de 50µM que apresentou uma fração de liberação de [³H]-ACh de 0,0388478 e provocou um aumento de 1564,91% em relação ao controle (fração de liberação de [³H]-ACh de 0,00248243).

O EC₅₀, que é a concentração efetiva capaz de evocar 50% da liberação máxima de [³H]-ACh foi de 16,93µM, conforme calculado na figura 13 (B).

(A)



(B)

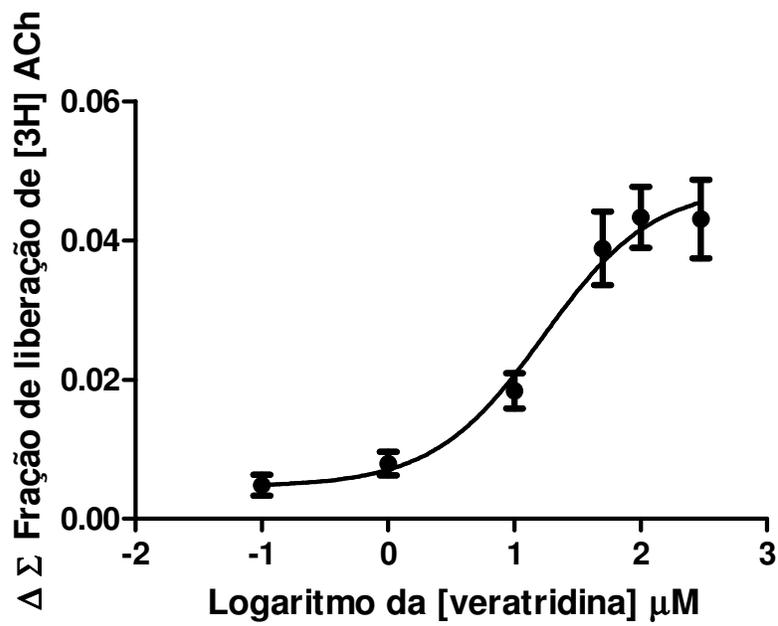


Figura 13 - A veratridina evoca a liberação de [³H]-ACh de forma dose dependente. (A): Gráfico de barras de liberação de [³H]-ACh evocada pela veratridina. (B): Curva dose resposta de veratridina. Alíquotas de 200µL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação; na Série 2 foram estimulados com as seguintes concentrações de veratridina: 0,1 µM; 1 µM; 10 µM; 50 µM; 100 µM e 300µM. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle P<0,05; b: estatisticamente diferente da veratridina 0,1mM P<0,05; c: estatisticamente diferente da veratridina 1mM P<0,05; d: estatisticamente diferente da veratridina 10mM P<0,05. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

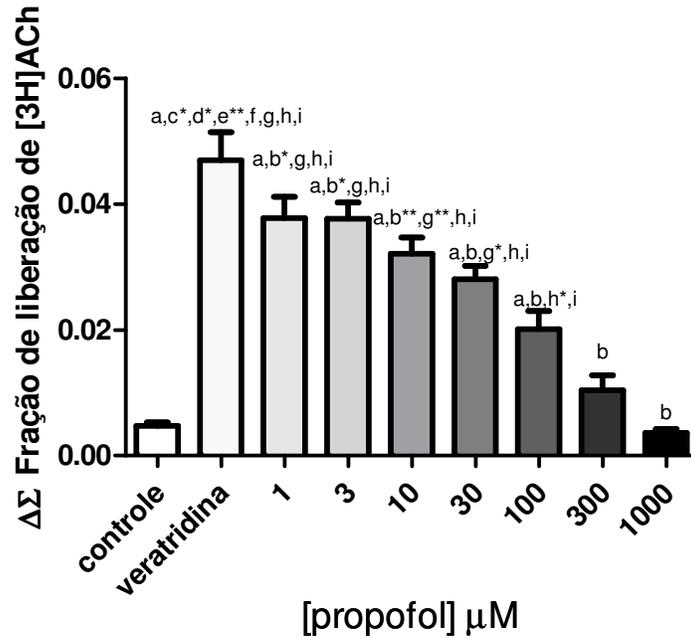
4.2 Avaliação do efeito do propofol na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos, evocada por veratridina.

Para avaliar o efeito do propofol na liberação de [³H]-ACh evocada por veratridina, alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com propofol em diferentes concentrações na Série 1 e na Série 2 foram perfundidas simultaneamente com propofol em diferentes concentrações e com veratridina 50µM, valor que evocava a liberação máxima de [³H]-ACh em nosso modelo. A escolha deste valor para a realização dos experimentos em detrimento do valor de EC₅₀ ocorreu, pois, foi objetivo otimizar a avaliação do eventual efeito inibitório do propofol. As concentrações de propofol testadas foram 1µM, 3µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM e 1000µM.

A figura 14 (A) demonstra que o propofol é capaz de inibir a liberação de [³H]-ACh induzida por veratridina. Todas as concentrações testadas de propofol foram capazes de reduzir a liberação de [³H]-ACh de maneira dose dependente.

O IC₅₀, que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de [³H]-ACh foi de 100µM, conforme calculado na figura 14 (B).

(A)



(B)

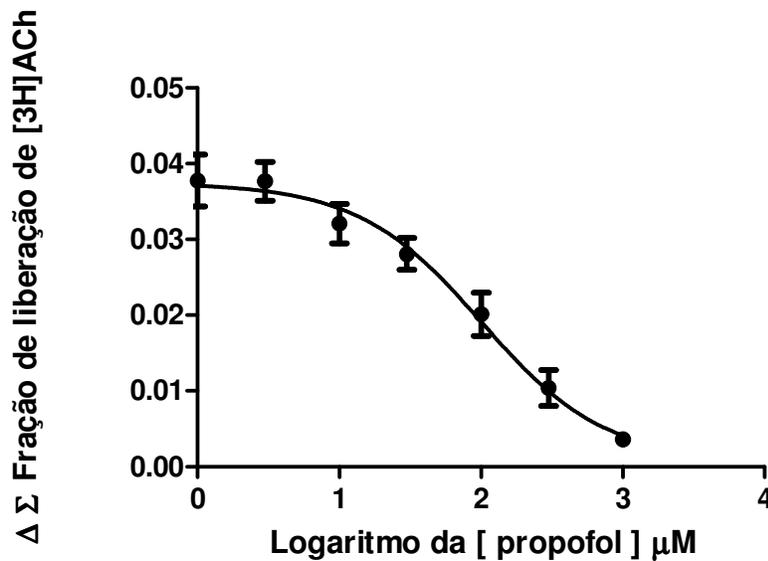


Figura 11 - O propofol inibe a liberação de ACh evocada por veratridina, de maneira dose dependente.(A): Gráfico de barras de inibição da liberação de $[^3\text{H}]\text{-ACh}$, evocada pela veratridina, na presença do propofol. (B): Curva dose resposta de propofol mediante estímulo com veratridina $50\mu\text{M}$. Aliquotas de $200\mu\text{L}$ de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com propofol em diferentes concentrações. As concentrações de propofol testadas foram $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $300\mu\text{M}$ e $1000\mu\text{M}$. Na Série 2 foram

estimuladas simultaneamente com propofol em diferentes concentrações e com veratridina 50 μ M, valor que evocava a estimulação máxima de liberação de [3 H]-ACh em nosso modelo. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle P<0,05; b: estatisticamente diferente da veratridina 50 μ M P<0,05, c: estatisticamente diferente de propofol 1 μ M P<0,05; d: estatisticamente diferente de propofol 3 μ M P<0,05; e: estatisticamente diferente de propofol 10 μ M P<0,05; f: estatisticamente diferente de propofol 30 μ M P<0,05; g: estatisticamente diferente de propofol 100 μ M P<0,05, h: estatisticamente diferente de propofol 300 μ M P<0,05 e i: estatisticamente diferente de propofol 1000 μ M P<0,05. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

4.3 Avaliações do mecanismo de ação do propofol.

Nas últimas décadas, os canais iônicos têm sido considerados os principais alvos de ação dos anestésicos no SNC de mamíferos, uma vez que estes desempenham um importante papel na transmissão neuronal. Dentre os canais iônicos, destacam-se os canais para K $^+$, Na $^+$ e Ca $^{2+}$. Dentre a família de canais de K $^+$ apenas os do tipo TREK-1 são modulados por anestésicos gerais voláteis e gasosos (Eric Honoré, 2007) e não intravenosos. Assim, o foco de nosso trabalho consistiu na avaliação do mecanismo de ação do propofol nos canais iônicos de Na $^+$ e Ca $^{2+}$.

4.3.1 Avaliação da participação dos canais de Na $^+$ sensíveis à voltagem.

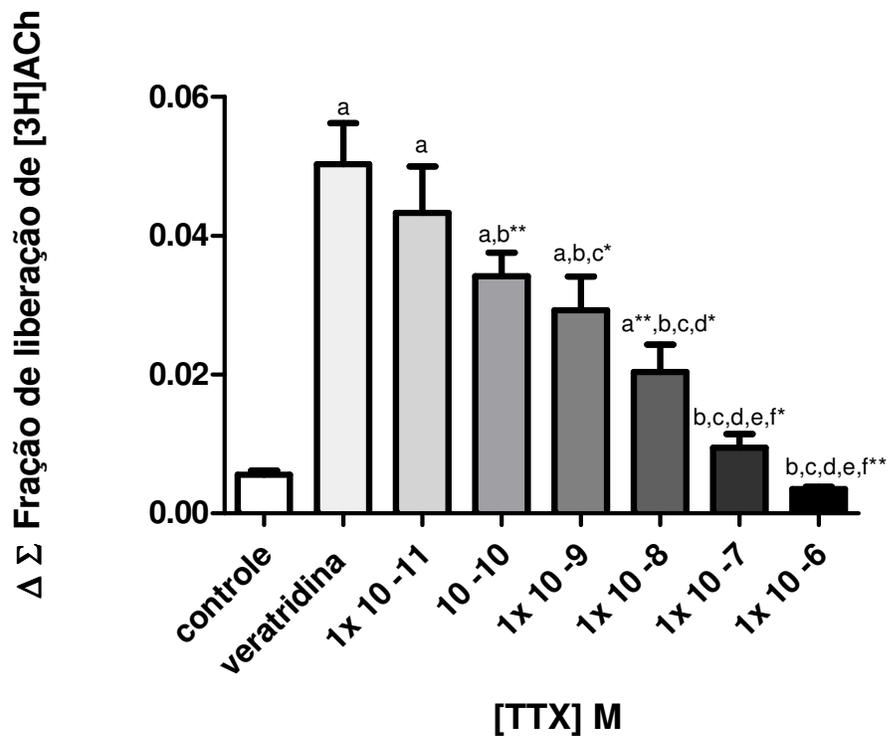
A liberação de [3 H]-ACh evocada por veratridina, conforme explicitado no item 4.2 é dependente, prioritariamente, do íon Na $^+$ e, como demonstrado nos resultados anteriores a veratridina foi capaz de ocasionar liberação maciça de [3 H]-ACh. Os dados apresentados previamente demonstraram também que na presença de propofol a liberação do neurotransmissor foi reduzida. Assim, foi de interesse avaliar se o mecanismo de ação do anestésico era dependente CSSV. Para a realização de tais experimentos foi utilizado TTX um bloqueador do CSSV (Catteral ,1980; Hille e cols., 1987).

Foi realizada uma curva dose resposta de TTX para que fosse possível determinar uma concentração que ocasionasse uma redução da liberação de [3 H]-ACh em 50% possibilitando assim a avaliação de um provável efeito aditivo destes agentes.

A figura 15 (A) demonstra que a liberação de [3 H]-ACh induzida por veratridina é reduzida na presença de TTX, ou seja, que a liberação do neurotransmissor é dependente da participação dos CSSV. Para a construção da curva foram utilizadas as seguintes concentrações de TTX: 1X10 $^{-11}$ M; 1X10 $^{-10}$ M; 1X10 $^{-9}$ M; 1X10 $^{-8}$ M; 1X10 $^{-7}$ M e 1X10 $^{-6}$ M.

O IC_{50} , que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de $[^3H]$ -ACh foi de $7,097 \times 10^{-9} M$ de TTX, conforme calculado na figura 15 (B).

(A)



(B)

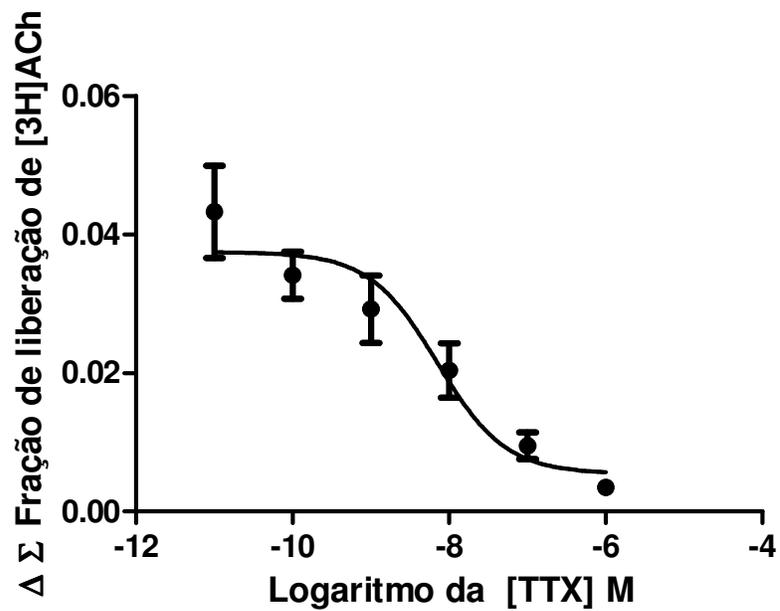


Figura 15 - Efeito da TTX na liberação de [³H]-ACh evocada por veratridina. A): Gráfico de barras de inibição da liberação de [³H]-ACh, evocada pela veratridina, em presença de TTX. (B): Curva dose resposta de TTX. Alíquotas de 200µL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação e TTX em diferentes concentrações. As concentrações testadas de TTX foram: 1X10⁻¹¹M; 1X10⁻¹⁰M; 1X10⁻⁹M; 1X10⁻⁸M; 1X10⁻⁷M e 1X10⁻⁶M. Na série 2 as câmaras foram estimuladas simultaneamente com veratridina 50µM e TTX em diferentes concentrações. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle P<0,05; b: estatisticamente diferente veratridina 50 µM P<0,05, c: estatisticamente diferente da TTX 1 x 10⁻¹¹ P<0,05, d: estatisticamente diferente da TTX 1 x 10⁻¹⁰ <0,05; e: estatisticamente diferente da TTX 1 x 10⁻⁹ P<0,05; f: estatisticamente diferente da TTX 1 x 10⁻⁸ P<0,05. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

Após a determinação da concentração de TTX a ser utilizada em nosso trabalho, alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com propofol na concentração de 100µM (IC₅₀ do propofol mediante estímulo com veratridina 50µM) simultaneamente á incubação com TTX na concentração de IC₅₀ (7,097 X10⁻⁹M de TTX).

A figura 16 demonstra que não houve efeito aditivo do propofol com a TTX, pois, não houve diferença estatística significativa (p >0,05) na liberação de [³H]-ACh entre o grupo propofol + TTX (liberação média de [³H]-ACh de 59,6742%) com o grupo propofol (liberação média de [³H]-ACh de 49,3326%) e entre o grupo propofol + TTX com o grupo TTX (liberação média de [³H]-ACh de 57,1948%). Este resultado sugere que o mecanismo de atuação do propofol envolve a participação dos CSSV.

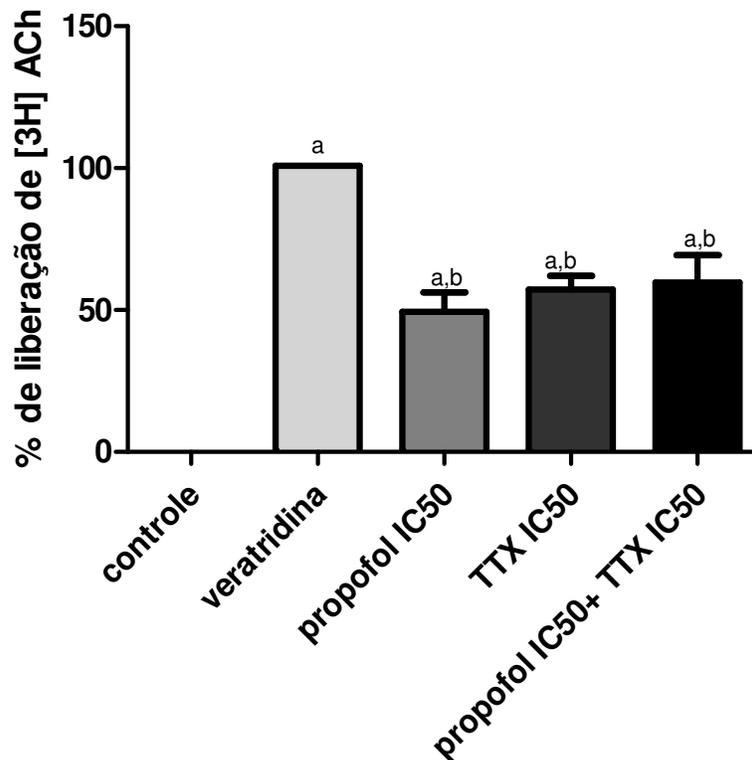


Figura 12 - O mecanismo de atuação do propofol está relacionado aos canais de Na⁺ sensíveis á voltagem. Alíquotas de 200µL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação (câmaras 1-2), com propofol 100µM (câmaras 3-4), com meio de incubação e TTX 7,097 X10⁻⁹M (câmaras 5-6) ou com propofol 100µM + TTX 7,097 X10⁻⁹M. Na série dois as câmaras foram estimuladas com veratridina50µM (câmaras 1-2), com veratridina 50µM + propofol 100µM (câmaras 3-4), com veratridina 50µM + TTX 7,097 X10⁻⁹M (câmaras 5-6) ou com veratridina 50µM + propofol 100µM + TTX 7,097 X10⁻⁹M (câmaras 7-8). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. a: estatisticamente diferente do controle; b: estatisticamente diferente da veratridina. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico. Todos os dados foram normalizados pelo controle do dia experimental.

4.3.2 Avaliação da participação do Ca²⁺ extracelular.

A liberação de [³H]-ACh evocada por veratridina, conforme explicitado no item 4.2 é dependente, prioritariamente, do íon Na⁺ e secundariamente dependente dos íons Ca²⁺, pois, a veratridina mantém os CSSV ativados por mais tempo, o que leva a um maior influxo de Na⁺,

despolarização do terminal nervoso e, conseqüente, influxo de Ca^{2+} através de CSSV. Assim, nosso primeiro questionamento consistiu na avaliação da participação dos CSSV no mecanismo de ação do propofol, uma vez em que na presença de estímulo com veratridina, o anestésico reduzia a liberação de [^3H]-ACh. Em tal experimento encontramos resultado positivo e conseqüentemente á sua realização, questionamos, se os íons Ca^{2+} presentes no meio extracelular também não seriam essenciais para o mecanismo de atuação do propofol. Para a realização de tais experimentos foi utilizado EGTA, um quelante de Ca^{2+} extracelular.

O valor de IC_{50} de EGTA, que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de [^3H]-ACh utilizado em nossos experimentos foi de 0,2287mM, valor determinado através de uma curva dose resposta, conforme demonstrado na figura 22.

Após a determinação da concentração de EGTA a ser utilizada em nosso trabalho, alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com propofol na concentração de 100 μM (IC_{50} do propofol mediante estímulo com veratridina 50 μM) simultaneamente á incubação com EGTA na concentração de IC_{50} .

A figura 17 demonstra que não houve efeito aditivo do propofol com o EGTA, pois, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na liberação de [^3H]-ACh entre o grupo propofol + EGTA (liberação média de [^3H]-ACh de 65,5814%) com o grupo propofol (liberação média de [^3H]-ACh de 65,969 %) e entre o grupo propofol + EGTA com o grupo EGTA (liberação média de [^3H]-ACh de 64,6582%). Este resultado sugere que o mecanismo de atuação do propofol é similar ao do EGTA, ou seja, que o propofol, além do bloqueio dos CSSV, estaria interferindo com o influxo de Ca^{2+} extracelular para exercer seu mecanismo de ação. Por outro lado, a não ocorrência de efeito aditivo entre EGTA e propofol poderia ser interpretada como uma independência dos íons Ca^{2+} extracelular pelo anestésico, uma vez em que estando 50% dos CSSV bloqueados pelo propofol ao se quelar 50% dos íons Ca^{2+} extracelular não foi observado nenhum efeito somatório na liberação de [^3H]-ACh. Dessa forma, o experimento realizado não foi conclusivo.

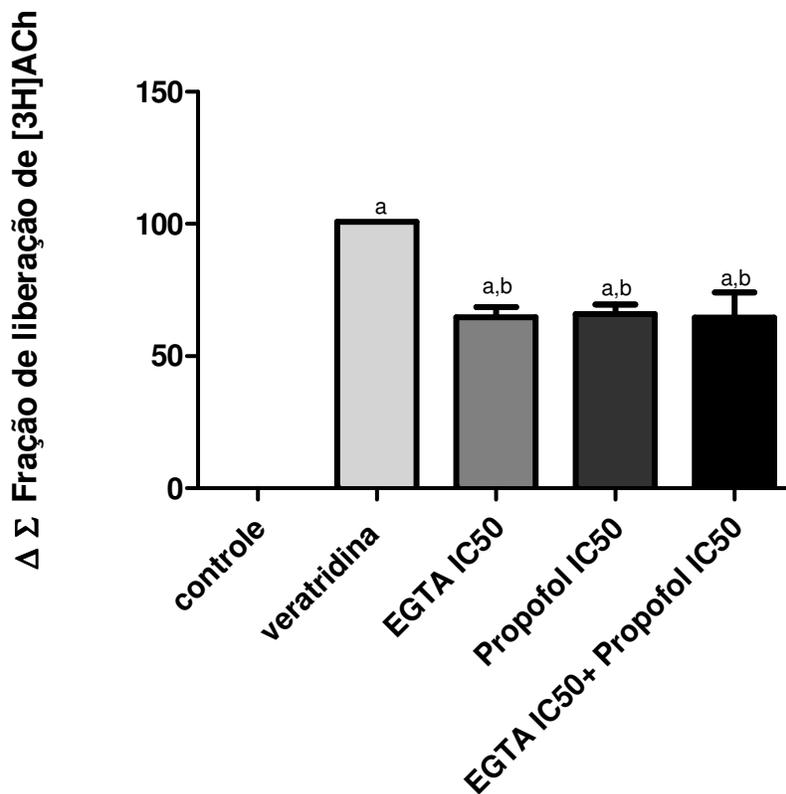


Figura 17 – Avaliação da participação do Ca^{2+} extracelular no mecanismo de atuação do propofol. Alíquotas de 200 μ L de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 minicâmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação (câmaras 1-4), com meio de incubação + EGTA 0,2287mM (câmaras 5-6), com propofol 100 μ M (câmaras 7-8), com meio de incubação e EGTA 0,2287mM (câmaras 9-10). Na série 2 as câmaras foram incubadas com meio de incubação (câmaras 1-2); com veratridina 50 μ M (câmaras 3-4), com veratridina 50 μ M + EGTA 0,2287mM (câmaras 5-6), com veratridina 50 μ M + propofol 100 μ M (câmaras 7-8), com veratridina 50 μ M + EGTA 0,2287mM + propofol 100 μ M (câmaras 9-10). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. a: estatisticamente diferente do controle; b: estatisticamente diferente da veratridina. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico. Todos os dados foram normalizados pelo controle do dia experimental.

4.3.3 Avaliação da participação do Ca^{2+} intracelular.

O íon Ca^{2+} , conhecidamente, desempenha um importante papel na regulação de uma grande variedade de processos neuronais e é sabido que os neurônios utilizam fontes extra e intracelular deste íon. Conforme já descrito, o influxo de Ca^{2+} através dos canais operados por voltagem é essencial para a liberação de neurotransmissores (Katz, 1969). Assim, foi questionado se os íons Ca^{2+} intracelular também estariam envolvidos no mecanismo de ação do propofol.

Para a realização de tais experimentos foi utilizado BAPTA-AM, um quelante de Ca^{2+} intracelular. O valor de IC_{50} de BAPTA-AM, que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$, a ser utilizado em nossos experimentos foi de $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ valor determinado através de uma curva dose resposta, conforme demonstrado na figura 24.

Para a realização de tais experimentos foi necessário descobrir se o mecanismo de ação da veratridina recrutava os íons Ca^{2+} intracelular. Se a veratridina recrutasse a participação desses íons seria possível avaliar ao efeito do anestésico em reduzir ou inibir a liberação dos íons Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Caso contrário, a análise da participação dos íons Ca^{2+} intracelular no mecanismo de ação do propofol seria impossibilitada de ser avaliada mediante estímulo com veratridina. Foram então realizados experimentos com o BAPTA-AM IC_{50} mediante estímulo com veratridina.

A figura 18 demonstra que o Ca^{2+} intracelular é recrutado pela veratridina, pois, ao incubarmos as alíquotas de sinaptosoma com o BAPTA-AM houve redução da liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 43,728%).

A figura 18 também demonstra que não houve efeito aditivo entre os grupos TTX IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 52,8148%), BAPTA-AM IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 43,728%) e BAPTA-AM IC_{50} + TTX IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 38,2952%). O resultado encontrado é contrário ao esperado, mas sugere que através do emprego da TTX IC_{50} houve uma brusca redução do influxo de íons Na^+ e dos íons Ca^{2+} extracelular para o terminal e, com isso, reduziu-se o principal estímulo para haver o recrutamento do Ca^{2+} intracelular. Assim, o resultado encontrado no grupo TTX + BAPTA-AM parece demonstrar apenas o efeito de TTX, uma vez em que se o Ca^{2+} intracelular não foi recrutado, não seria possível perceber a atuação do BAPTA-AM e consequentemente, observar qualquer efeito aditivo.

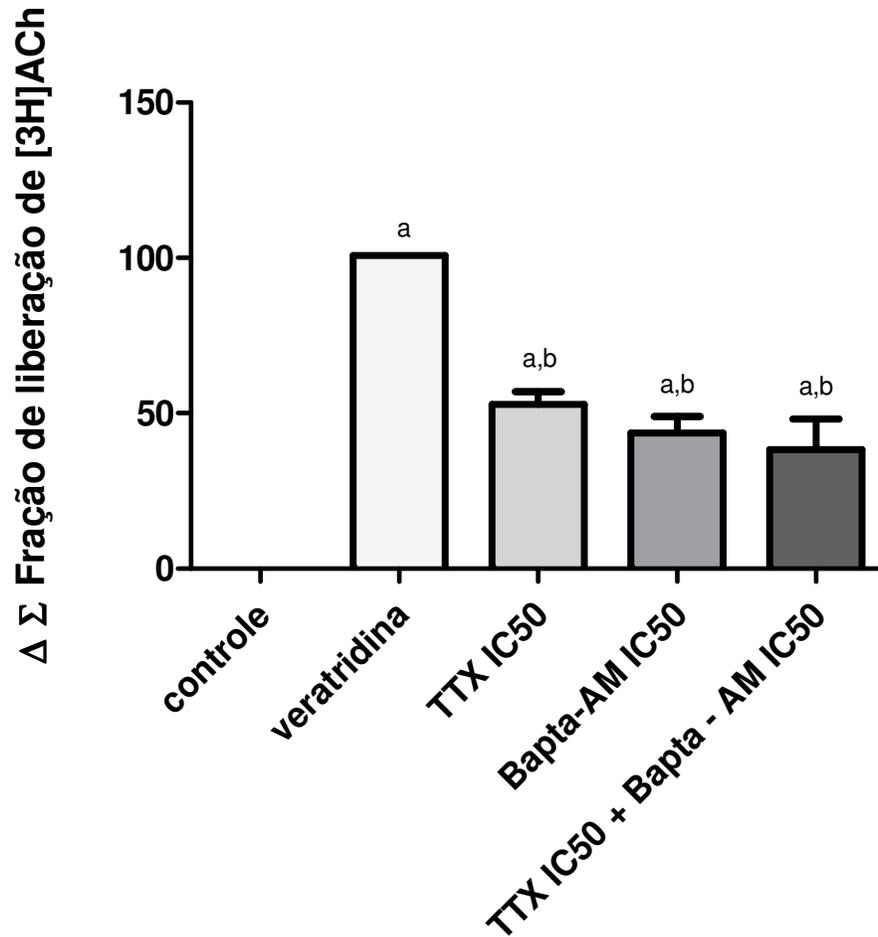


Figura 18 - O mecanismo de atuação da veratridina envolve os íons Ca^{2+} intracelular. Aliquotas de 200 μ L de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação (controle e veratridina 50 μ M), com meio de incubação + TTX 7,097 X10⁻⁹M (TTX IC₅₀), com meio de incubação + BAPTA-AM 9,109 X 10⁻⁶M (BAPTA IC₅₀) e com meio de incubação + TTX 7,097 X10⁻⁹M+ BAPTA-AM 9,109 X 10⁻⁶M (TTX+ BAPTA). Na série 2 as câmaras foram incubadas com meio de incubação (controle); com meio de incubação + veratridina 50 μ M (veratridina 50 μ M), com meio de incubação + veratridina 50 μ M + TTX 7,097 X10⁻⁹M (TTX IC₅₀), com meio de incubação + veratridina 50 μ M + BAPTA-AM 9,109 X 10⁻⁶M (BAPTA IC₅₀) e com meio de incubação + veratridina 50 μ M + TTX 7,097 X10⁻⁹M+ BAPTA-AM 9,109 X 10⁻⁶M (TTX+ BAPTA). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. a: estatisticamente diferente do controle; b: estatisticamente diferente da veratridina. c: estatisticamente diferente de BAPTA + propofol. Todas as diferenças estatísticas compreendem,

***, exceto as representadas no gráfico. Todos os dados foram normalizados pelo controle do dia experimental.

Com a descoberta que a veratridina recruta os íons Ca^{2+} intracelular foi possível avaliar se os íons Ca^{2+} intracelular participam do mecanismo de ação do propofol, mediante estímulo com veratridina. Foram então realizados experimentos de efeito aditivo entre propofol na concentração de $100\mu\text{M}$ (IC_{50} do propofol mediante estímulo com veratridina $50\mu\text{M}$), com TTX IC_{50} e com BAPTA-AM IC_{50} e experimentos de BAPTA-AM IC_{50} + Propofol IC_{50} .

Os resultados dispostos na figura 19 demonstram que houve efeito aditivo entre o grupo BAPTA-AM IC_{50} + Propofol IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 31,545%) com o Propofol IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 58,6599%), mas não com o grupo BAPTA-AM IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 43,728%). Como o efeito aditivo não foi observado entre o grupo BAPTA-AM + Propofol com ambos os grupos em separado exclui-se o efeito somatório de ambos reagentes. Esse dado sugere que o propofol o mecanismo de ação do propofol é similar ao BAPTA-AM, ou seja, depende dos íons Ca^{2+} intracelular.

No entanto, nossos resultados iniciais nos demonstram que o propofol atua bloqueando os CSSV assim como a TTX. Com isso, pode-se concluir que ao atuar nos CSSV o propofol bloqueou em 50% o influxo de íons Na^+ e dos íons Ca^{2+} extracelular para o terminal e, com isso, reduziu-se o principal estímulo para haver o recrutamento do Ca^{2+} intracelular. Assim, o resultado encontrado no grupo BAPTA-AM IC_{50} + propofol IC_{50} demonstra apenas o efeito do propofol, uma vez em que se o Ca^{2+} intracelular não foi recrutado, não seria possível perceber a atuação do BAPTA-AM e consequentemente, observar efeito aditivo. Nesse caso, não foi possível concluir se o mecanismo de ação do propofol é dependente ou não do Ca^{2+} intracelular. O grupo TTX IC_{50} + BAPTA-AM IC_{50} + propofol IC_{50} , (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 48,433%) que também não apresentou efeito aditivo em relação aos grupos TTX IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 52,8148%), BAPTA-AM IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 43,728%) e propofol IC_{50} (porcentagem de liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 58,6599%) separadamente, reforça a análise feita, pois, o resultado demonstra que o anestésico atua como a TTX e que a adição de BAPTA-AM não potencializou a inibição da liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ devido ao não recrutamento dos íons Ca^{2+} intracelular. Foi então necessário empregar um estímulo de liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ que independesse de Na^+ e dependesse, exclusivamente dos íons Ca^{2+} . O estímulo escolhido foi o KCl.

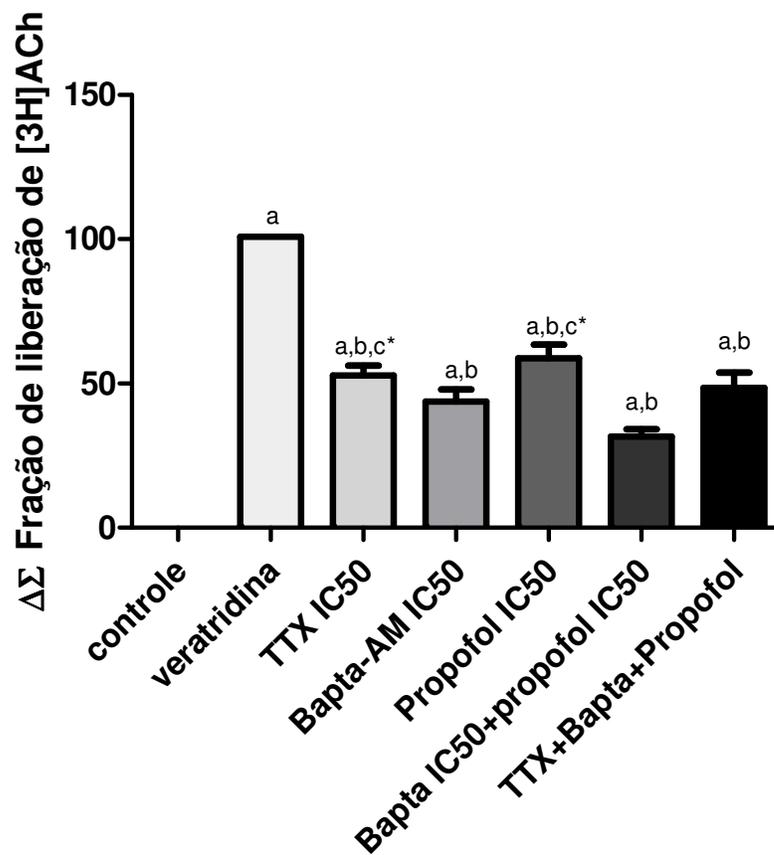


Figura 19 - Avaliação da participação do Ca^{2+} intracelular no mecanismo de atuação do propofol. Alíquotas de $200\mu\text{L}$ de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação (controle e veratridina $50\mu\text{M}$), com meio de incubação + TTX $7,097 \times 10^{-9}\text{M}$ (TTX IC₅₀), com meio de incubação + BAPTA-AM $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ (BAPTA IC₅₀), com meio de incubação + propofol IC₅₀, com propofol IC₅₀ + BAPTA-AM $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ (BAPTA IC₅₀) e com propofol IC₅₀ + BAPTA-AM $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ (BAPTA IC₅₀) + TTX $7,097 \times 10^{-9}\text{M}$ (TTX IC₅₀). Na série 2 as câmaras foram incubadas com meio de incubação (controle); com meio de incubação + veratridina $50\mu\text{M}$ (veratridina $50\mu\text{M}$), com meio de incubação + veratridina $50\mu\text{M}$ + TTX $7,097 \times 10^{-9}\text{M}$ (TTX IC₅₀), com meio de incubação + veratridina $50\mu\text{M}$ + BAPTA-AM $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ (BAPTA IC₅₀), com propofol IC₅₀ + veratridina $50\mu\text{M}$, com propofol IC₅₀ + veratridina $50\mu\text{M}$ + BAPTA-AM $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ (Propofol + BAPTA) e com propofol IC₅₀ + veratridina $50\mu\text{M}$ + BAPTA-AM $9,109 \times 10^{-6}\text{M}$ + TTX $7,097 \times 10^{-9}\text{M}$ (TTX IC₅₀), (Propofol + BAPTA + TTX). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. a: estatisticamente diferente do controle; b: estatisticamente diferente da veratridina. c: estatisticamente diferente de BAPTA + propofol. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico. Todos os dados foram normalizados pelo controle do dia experimental.

4.4 Avaliação do efeito do KCl na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos.

O aumento da concentração de K^+ no meio externo é rotineiramente utilizado *in vitro* para mimetizar o efeito despolarizante de um potencial de ação sobre a liberação de ACh e outros neurotransmissores. A despolarização por KCl consiste no aumento exacerbado de íons K^+ na região extracelular, o que induz o influxo deste íon devido á concentração diferenciada entre os meios intracelular e extracelular. Tal acontecimento leva á alteração do potencial de membrana celular que culmina com a abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis á voltagem. Com isso, tem-se um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Esta aumenta tanto pelo influxo deste íon como também pela liberação de Ca^{2+} de estoques internos e por inibição do efluxo ou seqüestro do mesmo. Dessa forma, ao utilizarmos o KCl como estímulo despolarizante em nosso modelo experimental buscamos avaliar a liberação de [3 H]-ACh ocasionada de maneira dependente do íon Ca^{2+} .

No intuito de verificar a magnitude da liberação de [3 H]-ACh induzida pelo KCl, realizamos uma curva dose resposta de liberação de [3 H]-ACh na presença de concentrações diferenciadas deste sal.

As alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com meio de incubação na Série 1 e na Série 2 foram estimuladas com diferentes concentrações de KCl. As concentrações de KCl testadas foram 0,1mM; 1mM; 15mM; 30mM; 50mM; 100mM e 140mM, realizadas em duplicata. Apenas as concentrações de 15mM; 30mM; 50mM e 100mM estão apresentadas na figura abaixo, uma vez em que os valores de 0,1 e 1mM não apresentaram diferença estatística significativa ($p>0,05$) na liberação de [3 H]-ACh em relação á concentração de 15mM e que a concentração de 140mM também não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) na liberação de [3 H]-ACh em relação á concentração de 50 e de 100mM.

A figura 20 demonstra que a liberação de [3 H]-ACh induzida por KCl é dose dependente e atingiu platô na concentração de 50mM. Assim, a partir desse valor a liberação máxima de [3 H]-ACh induzida pelo KCl foi atingida, não havendo diferença estatística ($p>0,05$) na liberação de [3 H]-ACh evocada por KCl 50mM ou por KCl 100mM, conforme sugerido pela figura 20 (A). Logo, a concentração que passamos a utilizar em nossos experimentos foi de 50 mM que apresentou uma fração de liberação de [3 H]-ACh de 0,059905 e provocou um aumento de 1069,73% em relação ao controle (fração de liberação de [3 H]-ACh de 0,0056).

O EC_{50} , que é a concentração efetiva capaz de evocar 50% da liberação máxima de [3 H]-ACh foi de 32mM, conforme calculado na figura 20 (B).

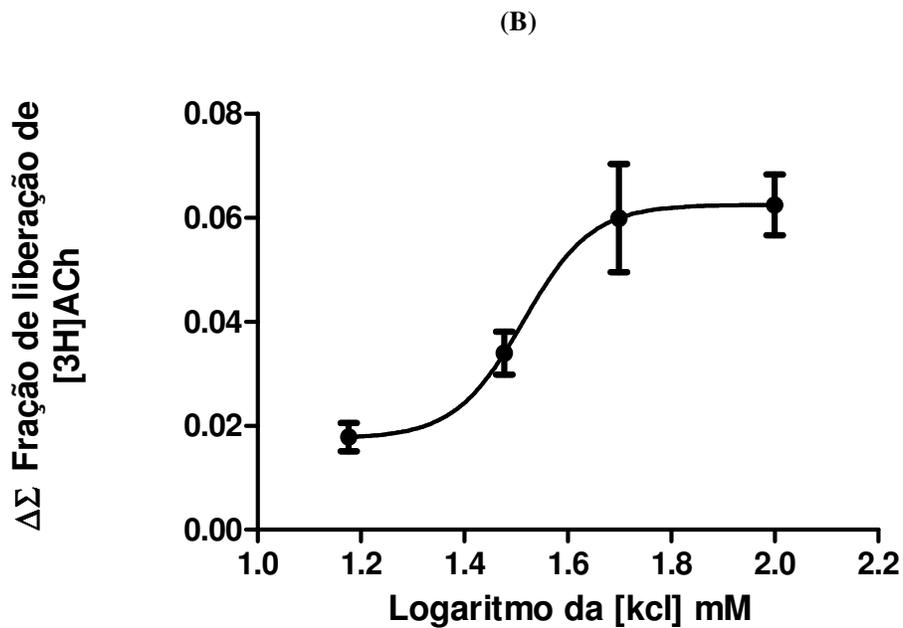
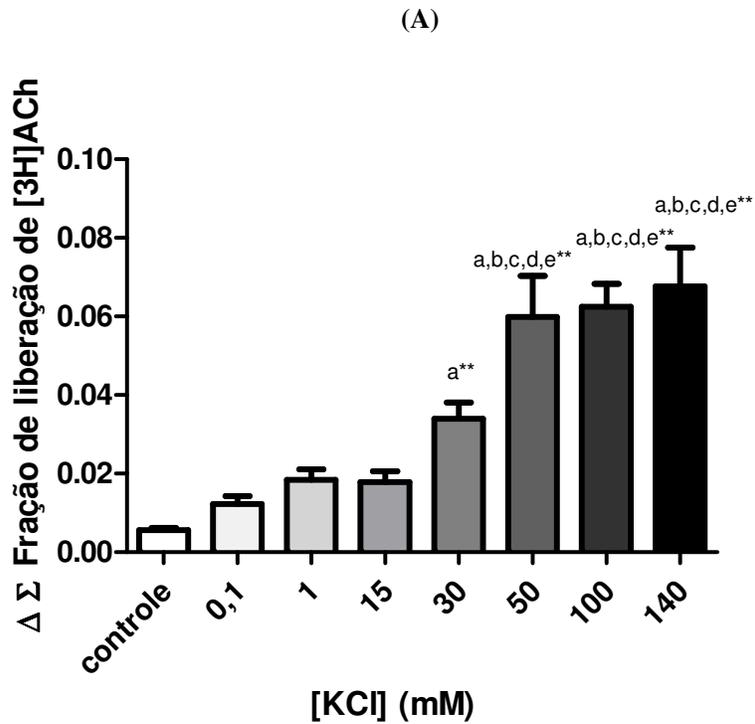


Figura 20 - O KCl evoca a liberação de $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ de forma dose dependente. A): Gráfico de barras de liberação de $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ evocada pelo KCl. (B): Curva dose resposta de KCl. Aliquotas de $200\mu\text{L}$ de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação; na Série 2 foram estimulados com as seguintes concentrações de KCl: 0,1mM; 1mM; 15mM; 30mM; 50mM; 100mM e 140mM. Apenas as concentrações de 15mM; 30mM;

50mM e 100mM estão apresentadas na figura 20 (B). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle, $P < 0,05$; b: estatisticamente diferente do KCl 0,1mM $P < 0,05$; c: estatisticamente diferente do KCl 1mM $P < 0,05$; d: estatisticamente diferente do KCl 15mM $P < 0,05$; e: estatisticamente diferente do KCl 30mM $P < 0,05$. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

4.5 Avaliação do efeito do propofol na liberação de ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos, evocada por KCl.

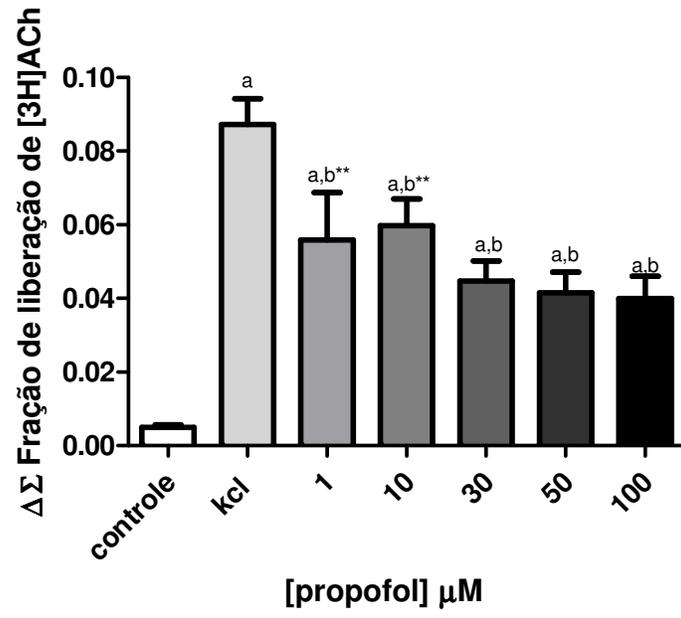
Após a comprovação de que o KCl era capaz de evocar a liberação de [3 H]-ACh foram realizados experimentos para avaliar o efeito do propofol na liberação de [3 H]-ACh evocada por KCl.

As alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com propofol em diferentes concentrações na Série 1 e na Série 2 foram estimuladas com concentrações diferenciadas de propofol simultaneamente com KCl 50mM, valor que evocava a estimulação máxima de liberação de [3 H]-ACh em nosso modelo. A escolha deste valor para a realização dos experimentos em detrimento do valor de EC_{50} ocorreu, pois, foi objetivo de nosso trabalho otimizar a resolução de nosso sistema. As concentrações de propofol testadas foram 1 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M e 100 μ M, realizadas em duplicata.

A figura 21 (A) demonstra que o propofol é capaz de inibir a liberação de [3 H]-ACh induzida por KCl. Todas as concentrações testadas de propofol foram capazes de reduzir a liberação de [3 H]-ACh, no entanto, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na liberação de [3 H]-ACh mediante as diferentes concentrações do anestésico.

O IC_{50} , que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de [3 H]-ACh foi de 25,41 μ M, conforme calculado na figura 21 (B).

(A)



(B)

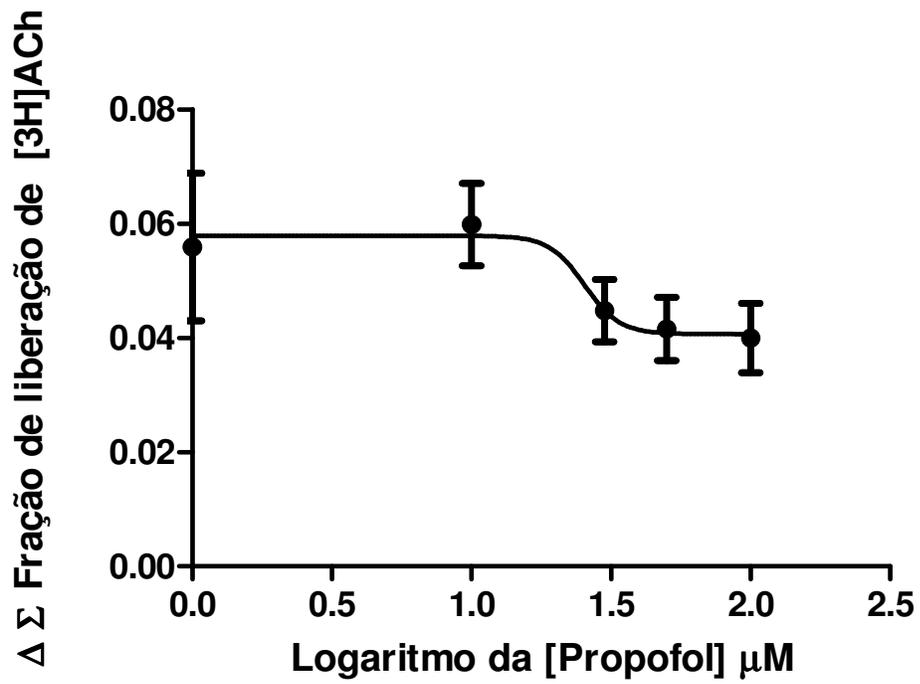


Figura 21 - O propofol inibe a liberação de ACh evocada por KCl. . (A): Gráfico de barras de inibição da liberação de [³H]-ACh, evocada pelo KCl, pelo propofol. (B): Curva dose resposta de propofol mediante estímulo de KCl 50 mM. Alíquotas de 200µL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com propofol em diferentes concentrações. As concentrações de propofol testadas foram 1µM, 10 µM, 30 µM, 50 µM e 100 µM. Na Série 2 foram estimuladas com concentrações diferenciadas de propofol simultaneamente com KCl 50 mM, valor que evocava a estimulação máxima de liberação de [³H]-ACh em nosso modelo. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle P<0,05; b: estatisticamente diferente do KCl 50mM P<0,05 Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

4.6 Avaliação do mecanismo de ação do propofol

Após a comprovação de que o propofol era capaz de reduzir a liberação de [³H]-ACh, evocada por KCl, em sinaptosomas de hipocampo de ratos, avaliamos se o íon Ca²⁺ presente no meio extra e no meio intracelular estaria envolvido nesse processo.

4.6.1 Avaliação da participação dos íons Ca²⁺ extracelular

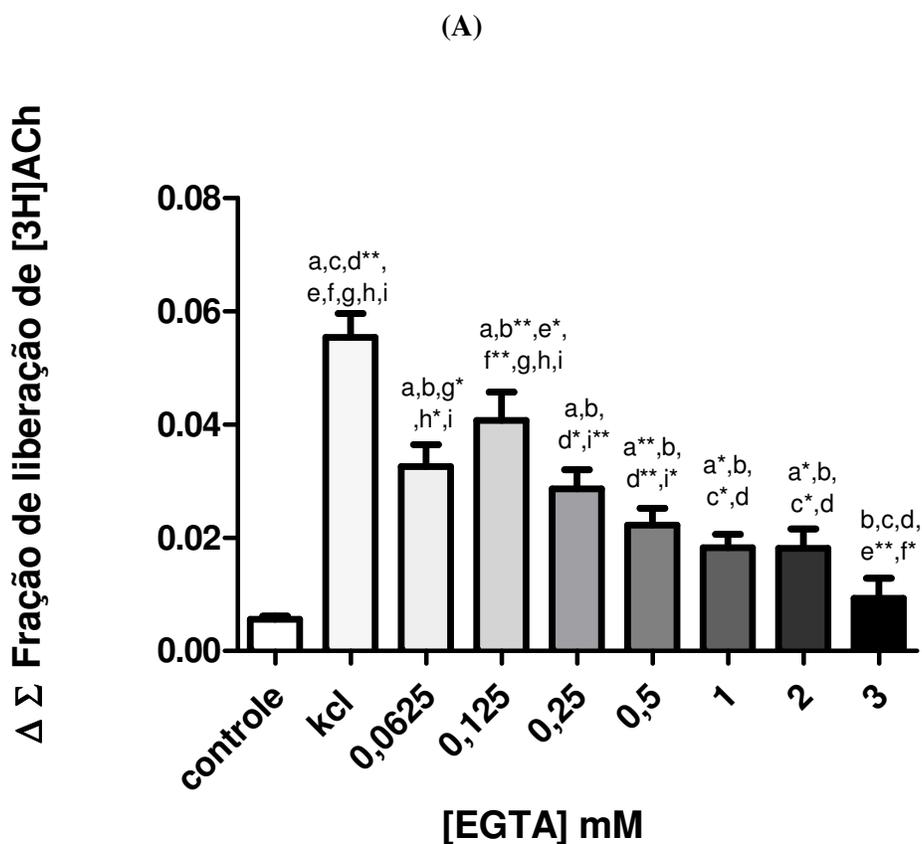
A liberação de [³H]-ACh evocada por KCl, conforme explicitado no item 4.5 é dependente do íon Ca²⁺. Como demonstrado nos resultados anteriores a despolarização com KCl 50mM induziu aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular e estimulou a liberação de [³H]-ACh. Os dados apresentados previamente demonstraram que na presença de propofol a liberação do neurotransmissor foi reduzida. Assim, foi de interesse avaliar se o mecanismo de ação do anestésico para reduzir a liberação de [³H]-ACh era dependente do Ca²⁺ extracelular. Para a realização de tais experimentos foi utilizado EGTA, um quelante de Ca²⁺ extracelular.

Inicialmente foi feita uma curva dose resposta de EGTA com o objetivo de determinarmos a melhor concentração desse reagente a ser utilizada em nosso modelo experimental. A necessidade da realização de tais experimentos ocorreu em função de não existir na literatura protocolos que empregassem o EGTA em modelos de sinaptosomas de hipocampo submetidos á perfusão em câmaras tais como utilizado por nosso grupo. Além disso, a concentração de EGTA sugerida na literatura para utilização em sinaptosomas, que é de 2mM (Helton J. REIS e colaboradores, 1999) foi testada em nosso modelo e gerou efeito inibitório quase total sobre a liberação de neurotransmissores. Assim, foi necessária a realização de uma curva dose resposta de EGTA para escolhermos uma concentração de trabalho a ser usada em nosso modelo que ocasionasse uma redução da liberação de [³H]-ACh em 50% para que quando o propofol fosse adicionado aditivamente ao EGTA fosse

possível avaliar se ambos reagentes, conjuntamente, gerariam maior redução na liberação de [³H]-ACh ou não.

A figura 22 (A) demonstra que a liberação de [³H]-ACh induzida por KCl é reduzida na presença de EGTA, ou seja, que a liberação do neurotransmissor é dependente de Ca²⁺ extracelular. Para a construção da curva foram utilizadas as seguintes concentrações de EGTA: 0,0625mM; 0,125mM; 0,25mM; 0,5mM; 1mM; 2mM e 3mM. A concentração de EGTA 3mM não apresentou diferença estatística significativa (p>0,05) na liberação de [³H]-ACh em relação ao controle, apresentando a inibição total da liberação de neurotransmissores.

O IC₅₀, que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de [³H]-ACh foi de 0,2287mM de EGTA, conforme calculado na figura 22 (B).



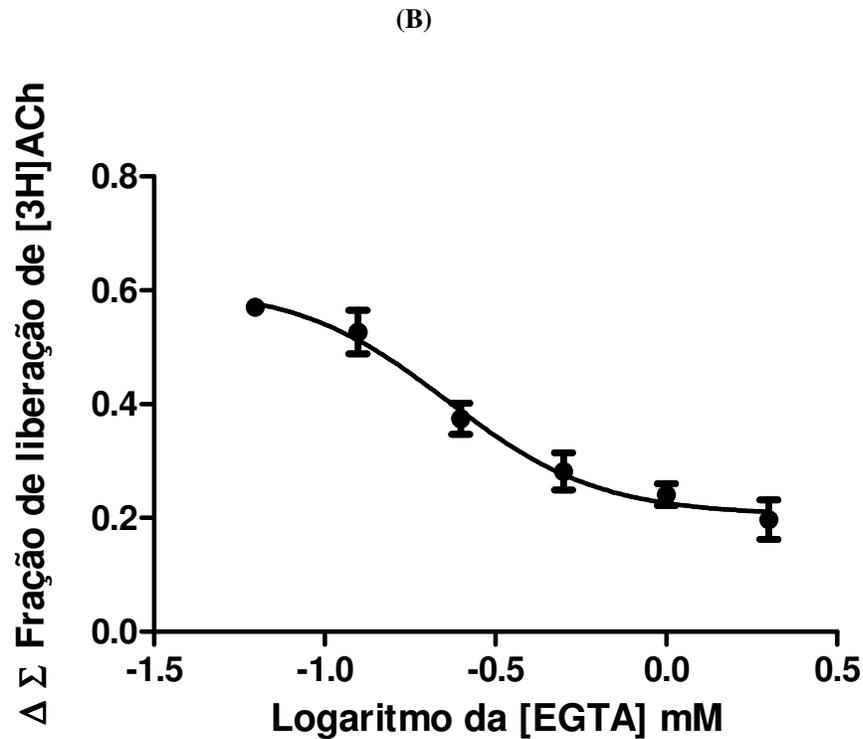


Figura 22 - O EGTA inibe a liberação de ACh evocada por KCl. (A): Gráfico de barras de inibição da liberação de $[^3\text{H}]\text{-ACh}$, evocada pelo KCl, em presença de EGTA. (B): Curva dose resposta de EGTA. Alíquotas de $200\mu\text{L}$ de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com EGTA em diferentes concentrações. As concentrações de EGTA testadas foram $0,0625\text{mM}$; $0,125\text{mM}$; $0,25\text{mM}$; $0,5\text{mM}$; 1mM ; 2mM e 3mM . Apenas as concentrações de $0,0625\text{mM}$; $0,125\text{mM}$; $0,25\text{mM}$; $0,5\text{mM}$; 1mM e 2mM estão apresentadas na figura 22 (B). Na Série 2 as alíquotas foram estimuladas simultaneamente com KCl 50mM , valor que evocava a estimulação máxima de liberação de $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ em nosso modelo e as diferentes concentrações de EGTA. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle $P<0,05$; b: estatisticamente diferente de KCl 50mM $P<0,05$, c: estatisticamente diferente de EGTA $0,0625\text{mM}$ $P<0,05$; d: estatisticamente diferente de EGTA $0,125\text{mM}$ $P<0,05$; e: estatisticamente diferente de EGTA $0,25\text{mM}$ $P<0,05$; f: estatisticamente diferente de EGTA $0,5\text{mM}$ $P<0,05$; g: estatisticamente diferente de EGTA 1mM $P<0,05$, h: estatisticamente diferente de EGTA 2mM $P<0,05$ e i: estatisticamente diferente de EGTA 3mM $P<0,05$. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

Após a determinação da concentração de EGTA a ser utilizada em nosso trabalho, alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com propofol na concentração de $25,41\mu\text{M}$ (IC_{50} do propofol mediante estímulo com KCl 50mM) simultaneamente á incubação com

EGTA na concentração de IC₅₀ (0,2287mM) na Série 1. Na Série 2 os sinaptosomas foram estimulados com KCl150mM e propofol na concentração de 25,41 μM, simultaneamente.

A figura 23 demonstra que houve efeito aditivo do propofol com o EGTA, pois, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na liberação de [³H]-ACh entre o grupo propofol + EGTA (porcentagem de inibição da liberação de [³H]-ACh de 40,5804%) com o grupo propofol (porcentagem de inibição da liberação de [³H]-ACh de 62,2167%) e entre o grupo propofol + EGTA (porcentagem de inibição da liberação de [³H]-ACh de 40,5804%) com o grupo EGTA (porcentagem de inibição da liberação de [³H]-ACh de 59,3469%). Este resultado sugere que o mecanismo de atuação do propofol envolve outro sítio de ação diferente do Ca²⁺ extracelular.

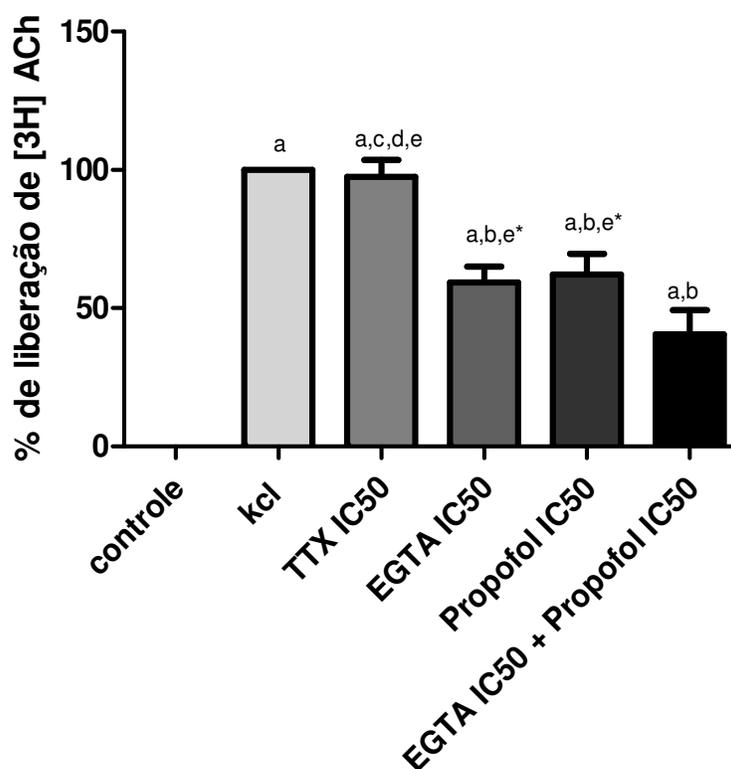


Figura 23 - O mecanismo de atuação do propofol não está relacionado ao Ca²⁺ extracelular. Alíquotas de 200μL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação (câmaras 1-2), com meio de incubação e EGTA 0,2287mM (câmaras 3-4 e câmaras 7-8) ou com propofol 25,41 μM (câmaras 5-6). Na série 2 foram estimuladas simultaneamente com KCl 50mM, valor que evocava a estimulação máxima de liberação de [³H]-ACh em nosso modelo (câmaras 1-4 e 7-8), com KCl150mM + propofol 25,41μM (câmaras 5-6). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do

controle. $P < 0,05$; b: estatisticamente diferente de KCl 50mM; $P < 0,05$ c: estatisticamente diferente do EGTA; $P < 0,05$ d: estatisticamente diferente de propofol IC 50; $P < 0,05$ e: estatisticamente diferente do EGTA + Propofol $P < 0,05$. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico. Todos os dados foram normalizados pelo controle do dia experimental.

4.6.2 Avaliação da participação dos íons Ca^{2+} intracelular.

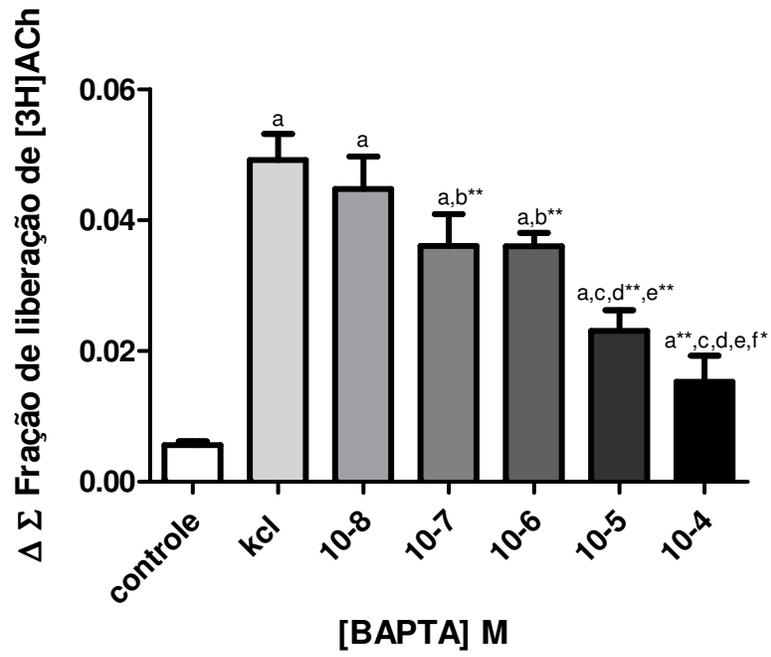
Após a comprovação de que o mecanismo de atuação do propofol na neurotransmissão colinérgica, mediante estímulo com KCl, era independente do Ca^{2+} extracelular, foi de interesse avaliar a participação do Ca^{2+} intracelular neste processo. Para a realização de tais experimentos foi utilizado o BAPTA-AM, um quelante de Ca^{2+} intracelular.

Inicialmente foi feita uma curva dose resposta de BAPTA-AM com o objetivo de determinarmos a melhor concentração desse reagente a ser utilizada em nosso modelo experimental. A necessidade da realização de tais experimentos ocorreu em função de não existir na literatura protocolos que empregassem o BAPTA-AM em modelos de sinaptosomas de hipocampo submetidos à perfusão em câmaras tais como utilizado por nosso grupo. Assim, foi necessária a realização de uma curva dose resposta de BAPTA-AM para escolhermos uma concentração de trabalho a ser usada em nosso modelo que ocasionasse uma redução da liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ em 50% para que quando o propofol fosse adicionado aditivamente ao BAPTA-AM fosse possível avaliar se ambos reagentes, conjuntamente, gerariam maior redução na liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ ou não.

A figura 24 (A) demonstra que a liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ induzida por KCl é reduzida na presença de BAPTA-AM, ou seja, que a liberação do neurotransmissor é dependente dos íons Ca^{2+} intracelular. Para a construção da curva foram utilizadas as seguintes concentrações de BAPTA-AM: 10^{-8}M ; 10^{-7}M ; 10^{-6}M ; 10^{-5}M ; 10^{-4}M . O controle induziu uma liberação basal média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ 0,0056 e o KCl 50mM de 0,0491818. O BAPTA-AM 10^{-8}M apresentou uma inibição da liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 9,027 % (liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 0,0447419); o BAPTA-AM 10^{-7}M inibiu a liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ em 26,73 % (liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 0,0360336); o BAPTA-AM 10^{-6}M inibiu a liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ em 26,80 % (liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 0,0359969); o BAPTA-AM 10^{-5}M inibiu a liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ em 53,13 % (liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 0,0230507) e o BAPTA-AM 10^{-4}M inibiu a liberação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ em 68,93 % (liberação média de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ de 0,0152794).

O IC_{50} , que é a concentração efetiva capaz de inibir 50% da liberação máxima de $[\text{}^3\text{H}]\text{-ACh}$ foi de $6,37 \times 10^{-6}\text{M}$ de BAPTA-AM, conforme calculado na figura 24 (B).

(A)



(B)

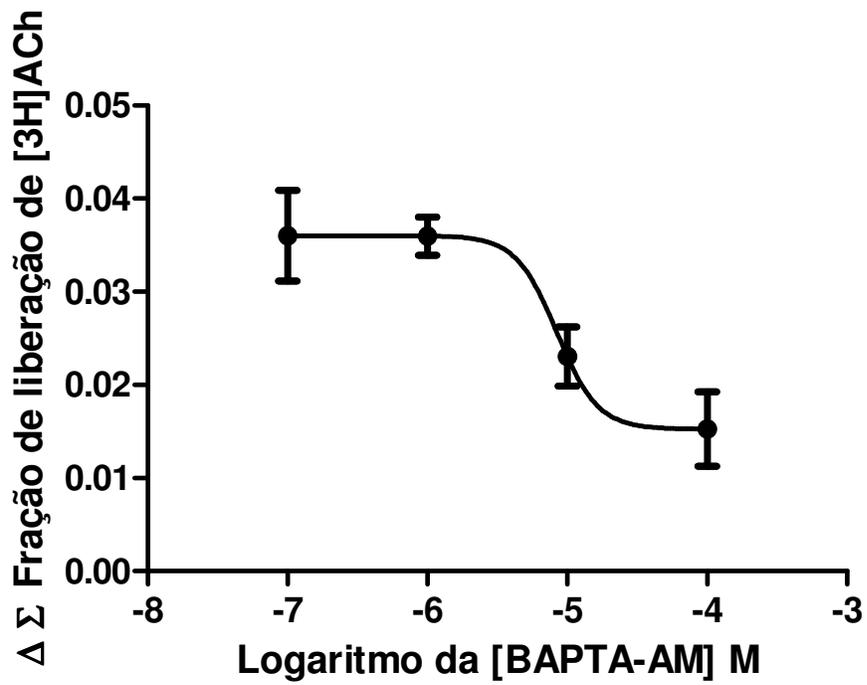


Figura 24 - Efeito do BAPTA-AM na liberação de [3H]-ACh evocada por KCl. (A): Gráfico de barras de inibição da liberação de [3H]-ACh, evocada pelo KCl, em presença de BAPTA-AM. (B): Curva dose resposta de BAPTA-AM. Alíquotas de 200µL de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com BAPTA-AM em diferentes concentrações. As concentrações de BAPTA-AM testadas foram 10⁻⁸M; 10⁻⁷ M; 10⁻⁶ M; 10⁻⁵ M; 10⁻⁴ M. Apenas as concentrações de 10⁻⁷ M; 10⁻⁶ M; 10⁻⁵ M e 10⁻⁴ M estão apresentadas na figura 24 (B). Na Série 2 as alíquotas foram estimuladas simultaneamente com KCl 50mM, valor que evocava a estimulação máxima de liberação de [3H]-ACh em nosso modelo e as diferentes concentrações de BAPTA-AM. As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle P<0,05; b: estatisticamente diferente de KCl 50mM P<0,05, c: estatisticamente diferente do BAPTA-AM 10⁻⁸M P<0,05; d: estatisticamente diferente do BAPTA-AM 10⁻⁷M P<0,05; e: estatisticamente diferente do BAPTA-AM 10⁻⁶M P<0,05; f: estatisticamente diferente do BAPTA-AM 10⁻⁵M P<0,05. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico.

Após a determinação da concentração de BAPTA-AM a ser utilizada em nosso trabalho, alíquotas do sinaptosoma foram submetidas á incubação com propofol na concentração de 25,41 µM (IC₅₀ do propofol mediante estímulo com KCl 50mM) simultaneamente á incubação com BAPTA-AM na concentração de IC₅₀ (6,37 X 10⁻⁶ M) na Série 1. Na Série 2 os sinaptosomas foram estimulados com KCl 50 mM, propofol na concentração de 25,41 µM e BAPTA-AM na concentração de IC₅₀ (6,37 X 10⁻⁶ M) simultaneamente.

A figura 25 demonstra que não houve efeito aditivo entre os grupos propofol + BAPTA-AM (porcentagem de inibição da liberação de [3H]-ACh de 40,4608%) com o grupo propofol (porcentagem de inibição da liberação de [3H]-ACh de 53,0471%) e nem entre o grupo propofol + BAPTA-AM (porcentagem de inibição da liberação de [3H]-ACh de 40,4608%) com o grupo BAPTA-AM (porcentagem de inibição da liberação de [3H]-ACh de 53,4929%). Este resultado sugere que o mecanismo de atuação do propofol envolve a participação dos íons Ca²⁺ intracelular.

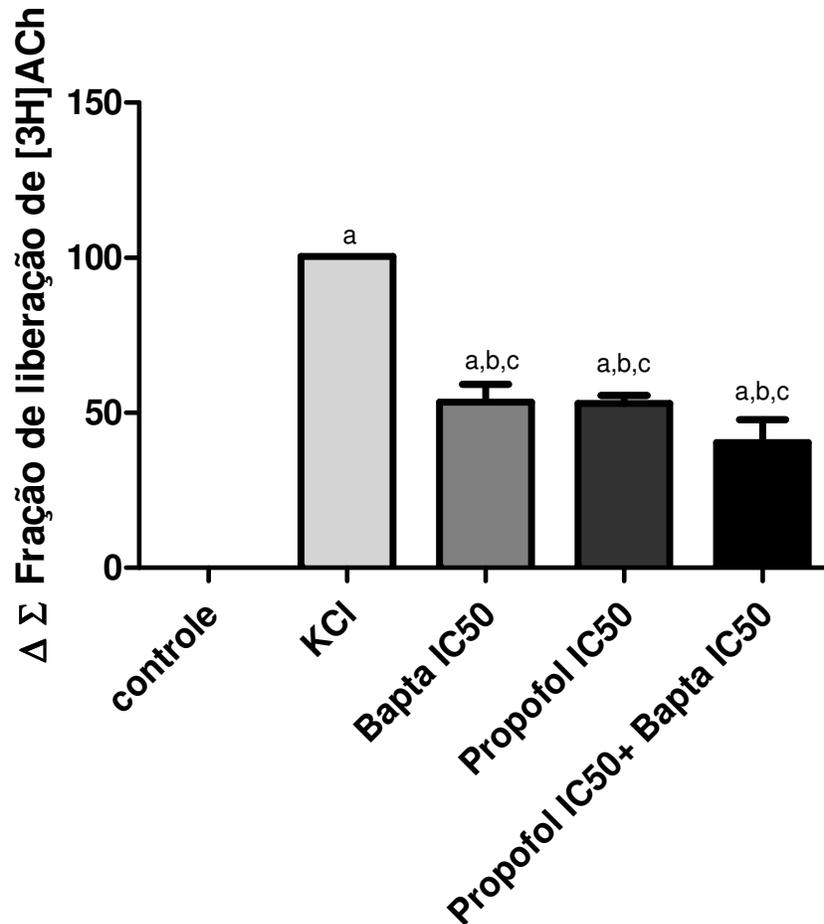


Figura 25 - O mecanismo de atuação do propofol está relacionado ao Ca^{2+} intracelular.

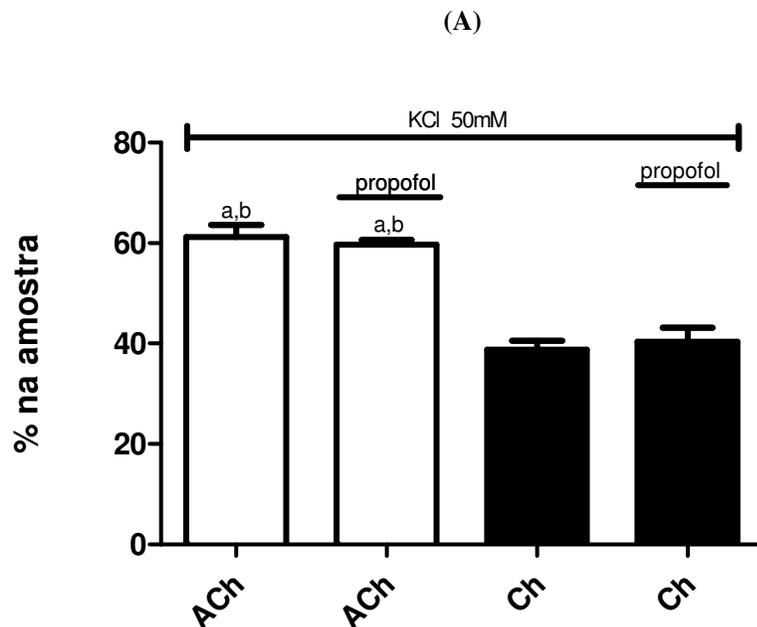
Alíquotas de 200 μ L de sinaptosoma foram acondicionadas em cada uma das 12 mini-câmaras do aparelho de perfusão. Durante a Série 1 os sinaptosomas foram incubados com meio de incubação (câmaras 1-2); com meio de incubação e KCl 5mM (câmaras 3-4); com meio de incubação e TTX 7,097 X10⁻⁹M (TTX IC₅₀) (câmaras 5-6); com BAPTA-AM 6,37 X 10⁻⁶ M (BAPTA-AM IC₅₀) (câmaras 7-8); com propofol 25,41 μ M (câmaras 9-10) e com propofol 25,41 μ M + BAPTA-AM 6,37 X 10⁻⁶ M (BAPTA-AM IC₅₀) (câmaras 11-12). Na série 2 foram estimuladas simultaneamente com KCl 50mM, valor que evocava a estimulação máxima de liberação de [³H]-ACh em nosso modelo (câmaras 1-4), com KCl 50 mM + TTX 7,097 X10⁻⁹M (TTX IC₅₀) (câmaras 5-6); com KCl 50 mM + BAPTA-AM 6,37 X 10⁻⁶ M (BAPTA-AM IC₅₀) (câmaras 7-8); com KCl 50 mM + propofol 25,41 μ M (câmaras 9-10) e com KCl 50 mM + propofol 25,41 μ M+ BAPTA-AM 6,37 X 10⁻⁶ M (BAPTA-AM IC₅₀) (câmaras 11-12). As séries 3, 4 e 5 corresponderam, respectivamente, a meio de incubação, ácido perclórico e meio de incubação. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em duplicatas. (A) a: estatisticamente diferente do controle P<0,05; b: estatisticamente diferente de KCl 50 mM P<0,05; c: estatisticamente diferente de TTX IC₅₀ P<0,05. Todas as diferenças estatísticas compreendem, ***, exceto as representadas no gráfico. Todos os dados foram normalizados pelo controle do dia experimental.

4.7 Dosagem de Ch e de ACh presente nas amostras.

Através da utilização dos kits “EnzyChrom™ Coline Assay Kit (ECHO-100)” e “EnzyChrom™ Acetylcholine Assay Kit (ECHO-100)” foi possível quantificar a proporção de [^3H] - Ch e de [^3H] - ACh presente em nossas amostras biológicas através de um método ultrasensível, simples, direto e de alto rendimento.

A proporção de Ch e de ACh encontrada nas amostras foi de 38,76% e 61,24% respectivamente, quando utilizado o estímulo com KCl 50 mM e de 49,585% e 50,415% quando usado o estímulo com veratridina 50 μM , sem a presença do anestésico. A presença de propofol não apresentou diferença estatística na proporção de [^3H] - Ch e de [^3H] - ACh, para todas as condições experimentais.

Mediante estímulo com KCl 50 mM, na presença de propofol, a porcentagem de Ch e de ACh na amostra foi de 40,35% e 59,65%, respectivamente. Mediante o estímulo com veratridina 50 μM , na presença de propofol, a porcentagem de Ch e de ACh na amostra foi de 43,93% e 56,07%, respectivamente. Os dados previamente apresentados já foram corrigidos quando á proporção de [^3H] - Ch e de [^3H] - ACh [3H] presente nas amostras.



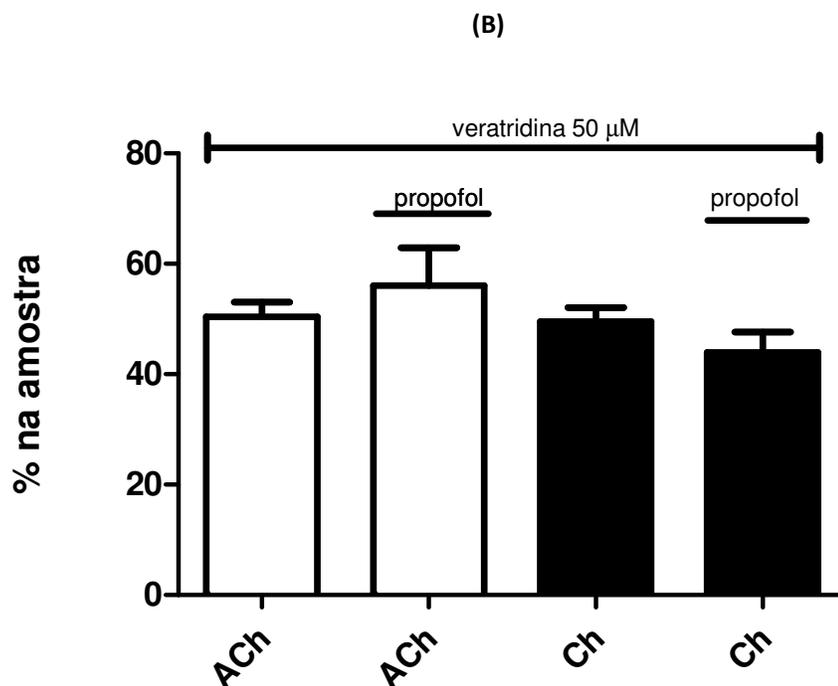


Figura 26 - Proporção de $[^3\text{H}]$ Ch e de $[^3\text{H}]$ ACh nas amostras sinaptosomais. (A): Proporção de $[^3\text{H}]$ Ch e de $[^3\text{H}]$ ACh presente nas amostras mediante estímulo com kcl 50 mM na presença e na ausência de propofol. (B): Proporção de $[^3\text{H}]$ Ch e de $[^3\text{H}]$ ACh presente nas amostras mediante estímulo com veratridina 50 μM na presença e na ausência de propofol. Para a detecção da quantidade de $[^3\text{H}]$ Ch e de $[^3\text{H}]$ ACh presente nas amostras, alíquotas de 20 μL das amostras experimentais recolhidas dos sinaptosomas eram colocadas em poços individuais de placas de 96wells já contendo 80 μL da solução do kit de Ch. Outros 20 μL das amostras experimentais recolhidas eram colocados em outros poços individuais da placa já contendo 80 μL da solução do kit de ACh. Após 20 minutos da pipetagem das amostras era realizada a leitura das placas num espectofotômetro de Fluorescência, da marca VARIAN e modelo Cary Eclipsev. Foram feitas dosagens de quatro experimentos (n=4), em duplicata, das frações 1 até 4, tanto para amostras estimuladas com KCl50mM como para amostras estimuladas com veratridina 50 μM . Também foram feitas dosagens de amostras incubadas ou não com propofol, com o objetivo de verificar se o anestésico poderia influenciar na formação de $[^3\text{H}]$ -ACh derivada da $[^3\text{H}]$ -Ch. Os resultados expressam a média \pm EPM de quatro dosagens independentes realizadas em duplicatas. a: estatisticamente diferente de Ch – KCl 50mM, sem propofol. $P < 0,05$; b: estatisticamente diferente de Ch –KCl 50mM, com propofol. $P < 0,05$. Todas as diferenças estatísticas compreendem, *, exceto as representadas no gráfico.**

V. Discussão

Os anestésicos gerais apresentam potentes efeitos na transmissão sináptica, podendo aumentar a transmissão sináptica inibitória ou deprimir a transmissão sináptica excitatória. Estes efeitos podem ser pré e/ou pós-sinápticos. A modulação positiva do receptor GABA_A, pós-sinápticamente, é um dos principais mecanismos responsáveis pelo efeito inibitório causado pelos anestésicos gerais voláteis e intravenosos, em concentrações clínicas. Já no terminal pré-sináptico, a redução da transmissão excitatória, também observada em concentrações clínicas de vários anestésicos, pode ser decorrente da diminuição da condução do potencial de ação ou da redução da liberação de neurotransmissores (Ratnakumari Lingamaneni, 2001). Apesar de sabermos disso, o mecanismo específico pelo qual os anestésicos atuam ainda não se encontra bem elucidado. Portanto, a investigação dos efeitos dos anestésicos na região pré-sináptica, tais como o efeito na liberação de neurotransmissores, pode fornecer informações adicionais em relação aos mecanismos que contribuem com as ações desses agentes durante a anestesia.

A ACh é um neurotransmissor que exerce importantes funções no SNC tais como regulação da atividade motora, consciência, memória, regulação do sono e vigília e processos cognitivos (T. Kikuchi 1998). Assim, a modulação da transmissão colinérgica pode ser um alvo de ação dos anestésicos, uma vez em que vários efeitos afetados pelos anestésicos gerais são controlados por esse neurotransmissor. Para compreendermos melhor como esses agentes podem afetar a liberação de neurotransmissores no SNC, avaliamos neste trabalho os efeitos pré-sinápticos do anestésico intravenoso propofol, na neurotransmissão colinérgica em sinaptosomas cérebro-hipocámpais de ratos. Os alvos pré-sinápticos testados foram a participação dos CSSV e a participação dos íons Ca²⁺ extra e intracelular no mecanismo de ação deste anestésico. A escolha de tais alvos se deu em decorrência da essencial participação dos mesmos nos mecanismos de neurotransmissão.

Como a maioria dos estudos dos efeitos sinápticos dos anestésicos tem focado o sítio pós-sináptico de ação dos mesmos, foi nosso objetivo avaliar o mecanismo de ação do propofol no terminal pré-sináptico e, por isso, o modelo utilizado em nosso trabalho foram sinaptosomas. Tal preparação contém terminais nervosos capazes de estocar e liberar neurotransmissores e é largamente usada como modelo para análise pré-sináptica de efeitos de várias drogas. Ao contrário das fatias cerebrais ou neurônios *in situ*, os sinaptosomas estão livres da influência de elementos de corpos celulares neuronais e gliais, como também de possíveis interações intercelulares (Dunkley e cols., 1986). Assim, experimentos que empregam como modelo as preparações sinaptosomais possuem tanto desvantagens como vantagens. Uma desvantagem consiste no fato da exocitose em sinaptosomas não poder ser evocada por potenciais de ação, já que os terminais nervosos estão isolados de seus axônios. Devido a isso, em nosso trabalho, evocamos a liberação de [³H] - ACh na fração sinaptosomal através do uso de veratridina e KCl,

substâncias que mimetizaram a ocorrência de um potencial de ação. Como vantagem, pode-se citar que o uso de sinaptosomas permite controlar melhor a intensidade da despolarização da membrana pré-sináptica e a concentração de peptídeos antagonistas além de contornar problemas de medidas de correntes sinápticas vindas de membranas pós-sinápticas (Turner and Dunlap, 1995).

Diversos estudos apontam a influência dos anestésicos gerais na neurotransmissão colinérgica, no entanto, tais pesquisas ainda são inconclusivas uma vez em que cada anestésico é capaz de gerar um efeito diferenciado em uma região cerebral. Embora existam alguns trabalhos a respeito da ação dos anestésicos gerais na liberação de ACh, não está claro como estas drogas alteram a liberação deste neurotransmissor.

Alguns estudos *in vivo* têm demonstrado uma diminuição da transmissão colinérgica na presença de halotano no corpo estriado de ratos (Bertorelli e cols, 1990). Este mesmo efeito foi observado com os anestésicos sevoflurano e isoflurano em córtex cerebral de ratos *in vivo* e confirmado em 2012 por Hui Wang e colaboradores, que demonstraram, através de microdiálises, que o isoflurano é capaz de diminuir os níveis de ACh no hipocampo de ratos. Já em outro estudo realizado em ratos anestesiados com halotano foi demonstrado um aumento da liberação de ACh a partir do núcleo interpeduncular do mesencéfalo (Taguchi e cols, 1991). Alguns estudos *in vitro* também mostraram resultados contraditórios com relação à ação dos anestésicos gerais voláteis na liberação de ACh. Em 1999 Gomez e colaboradores demonstraram que o halotano aumenta a liberação basal de ACh em fatias de córtex cerebral de ratos e em 2000 o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que o isoflurano é capaz de evocar a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares e, conseqüentemente, aumentar a liberação de [3H]-ACh em fatias de córtex de ratos. O aumento da liberação de ACh também foi observado em fatias de *striatum* de ratos na presença do halotano (Adachi e cols, 2001). No entanto, Griffiths e cols (1995), utilizando-se da mesma preparação experimental, demonstraram que o halotano diminui a liberação de ACh estimulada por KCl (Griffiths e cols, 1995). Por outro lado nenhum efeito na liberação de ACh induzida por KCl foi observado em córtex cerebral de ratos na presença de halotano, enflurano ou metoxiflurano (Bazil & Minneman, 1989).

Para os anestésicos gerais intravenosos há uma escassez ainda maior de dados sobre o efeito destes agentes na neurotransmissão colinérgica e ausência de estudos que sugiram o mecanismo de ação utilizado pelos agentes intravenosos para modificarem a liberação da ACh.

Alguns estudos *in vivo* realizados com microdiálises demonstraram uma tendência do propofol em reduzir a liberação de ACh no cérebro de ratos. Em 1998 Kikuchi e colaboradores demonstraram diminuição da liberação de ACh no córtex e no hipocampo de ratos enquanto nenhum efeito foi observado no *striatum* na presença de propofol. Em 2000 Wang Y e colaboradores corroboraram com a literatura ao demonstrarem que o propofol é capaz de reduzir

a liberação de ACh no hipocampo de ratos jovens e idosos. Neste mesmo estudo, realizado *in vivo* por microdiálise, também foi sugerido que a ketamina evoca a liberação de ACh em ratos jovens e idosos, sendo que nesses últimos o efeito foi ainda mais pronunciado.

Apesar das observações *in vivo* sugerirem que o propofol diminui a liberação de ACh em hipocampo de ratos, nenhum estudo *in vitro* a respeito da ação deste agente na liberação de ACh no SNC foi encontrado na literatura. Além disso, não foi encontrado nenhum estudo que relatasse os mecanismos de ação empregados pelo propofol para exercer seu efeito na neurotransmissão colinérgica.

No presente estudo demonstramos que o propofol *per si* nas concentrações de 1, 10, 30, 100 e 1000 μM apresentou tendência de diminuir a liberação espontânea de [^3H]-ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos ($p < 0.05$), em todas as concentrações testadas (Figura 12).

O efeito de redução da liberação de [^3H]-ACh no hipocampo ocasionado pelo propofol foi condizente com os dados de estudos *in vivo* encontrados na literatura (Kikuchi et al, 1998; Wang Y et al, 2000) e reforçaram a ideia da participação dos neurônios colinérgicos na manutenção da consciência. O anestésico em questão tem seu uso amplamente difundido, principalmente, pela conhecida característica do mesmo em gerar quadros de amnésia retrógrada nos pacientes e a literatura sugere que redução na liberação de ACh no hipocampo pode estar relacionada com déficits na formação da memória (Linda K, Gorman e colaboradores, 1994), uma vez em que esse neurotransmissor e tal área cerebral estão envolvidos no processo de formação de memória. Dessa forma, o efeito observado do propofol na neurotransmissão colinérgica pode ser um dos mecanismos que justifique o efeito fisiológico de amnésia característico desse agente.

Como a liberação basal de ACh pelos sinaptosomas de hipocampo de ratos é muito baixa ($\Delta\Sigma$ fração de liberação de [^3H]-ACh média de 0,0057) evocamos a liberação de [^3H]-ACh em nosso modelo, com veratridina e com KCl, com o objetivo de aumentarmos a resolução de nosso sistema e conseguirmos avaliar melhor o efeito aditivo dos reagentes utilizados em nossos experimentos.

Inicialmente, investigamos o efeito da veratridina, um estímulo despolarizante depende dos canais para Na^+ , na liberação de [^3H]-ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Tal toxina foi capaz de aumentar em 1564,91% a liberação de [^3H]-ACh (figura 13). O EC_{50} , que é a concentração efetiva capaz de evocar 50% da liberação máxima de [^3H]-ACh foi de 16,93 μM , conforme calculado na figura 13 (B). Apesar de calculado o EC_{50} , o valor de veratridina empregado em nossos experimentos foi de 50 μM , responsável pela liberação máxima de [^3H]-ACh e, portanto, capaz de aumentar a resolução experimental.

Uma vez mimetizada a ocorrência do potencial de ação o sinaptosoma foi incubado com diferentes concentrações do anestésico intravenoso e foi possível avaliar que tal agente era capaz de inibir a liberação de [³H]-ACh no hipocampo. Concentrações sub (1 e 3 μM), anestésicas (10-30-100μM) e supra-anestésicas (1000 μM) de propofol (Cheng –Wei Lu e colaboradores 2009) inibiram a liberação de [³H]-ACh, evocada por veratridina, de maneira dose dependente (figura 14). O IC₅₀ do propofol, mediante estímulo com veratridina, foi de 100μM.

Após a sugestão de que o anestésico reduzia a liberação de [³H]-ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos realizamos experimentos com a intenção de avaliar o mecanismo de ação empregado por esse agente para exercer seu efeito na neurotransmissão colinérgica. Foi então determinado o valor de IC₅₀ da TTX a ser empregado em nosso modelo para realizamos os experimentos de efeito aditivo (figura 17).

O primeiro resultado encontrado (figura 16) demonstra que tanto o anestésico como a TTX, individualmente, são capazes de reduzir a liberação de [³H]-ACh. A redução da liberação de [³H]-ACh causada pela TTX (porcentagem de liberação de [³H]-ACh de 57,1948%) pode ser explicada pelo bloqueio que esse agente causa nos CSSV. Buscando justificar porque o anestésico (porcentagem de liberação de [³H]-ACh de 49,3326%) também seria capaz de gerar esse efeito, realizamos experimentos de administração concomitante de TTX e propofol (porcentagem de liberação de [³H]-ACh de 59,6742 %) nas amostras sinaptosomais. Foi observado que não houve efeito potencializador de redução da liberação de [³H]-ACh nos sinaptosomas de hipocampo de ratos. Esse resultado sugere que o mecanismo de ação do propofol é similar ao mecanismo de ação da TTX. O efeito inibitório apresentado pelo propofol em nosso modelo experimental talvez possa ser explicado por sua ação no bloqueio de CSSV na forma ativada ou inativada de forma reversível (Haeseler e cols., 2003; Reckiegel e cols., 2002; Irnaten e cols., 2002). O dado obtido confirmou os dados já existentes na literatura, que sugerem que o propofol é capaz de atuar na dinâmica do Na⁺. Em 1997, Ratnakumari e Hemmings demonstraram que o propofol inibiu o aumento da concentração interna de Na⁺ sinaptosomal evocado por veratridina com IC₅₀ de 13μM. Em 2001, Ratnakumari e Hemmings sugeriram que o propofol (10-100μM) inibiu, de forma dose dependente, o influxo de Na⁺ induzido por veratridina em sinaptosomas de córtex de ratos. Ainda neste estudo, foi demonstrado que o mecanismo de ação do anestésico estaria envolvido com uma inibição dos CSSV relacionada com uma interação preferencial do anestésico com o estado inativado do canal. Em um estudo eletrofisiológico, propofol e isoflurano inibiram CSSV em terminais nervosos de ratos isolados

(Ouyang e cols., 2003). Cheng-Wei Lu e colaboradores, em 2009, realizaram experimentos em sinaptosomas de córtex de ratos, mediante estímulo com veratridina e sugeriram que o propofol, em doses subanestésicas, é capaz de aumentar a liberação de glutamato. Segundo este trabalho, o mecanismo de facilitação da liberação de glutamato pelo anestésico está relacionado ao aumento da excitabilidade da membrana e envolve a participação dos CSSV.

Após a análise da participação dos CSSV no mecanismo de ação do propofol foi avaliado a participação dos íons Ca^{2+} , importantes mediadores da neurotransmissão. A figura 17 apresenta o resultado obtido de um experimento de efeito aditivo entre EGTA e propofol mediante estímulo com veratridina. Conforme se sabe, a veratridina causa uma despolarização no terminal dependente de Na^+ e secundariamente dos íons Ca^{2+} (Ratnakumari Lingamanesi, 2001). Assim quando estimulamos o terminal com veratridina $50\mu\text{M}$ na presença de EGTA IC_{50} , houve redução de aproximadamente 50% da liberação de $[\text{H}^3]\text{-ACh}$ (porcentagem de liberação de $[\text{H}^3]\text{-ACh}$ de 64,6582%). Isso porque a veratridina manteve os CSSV abertos por mais tempo, o que levou a um maior influxo de Na^+ para o terminal e despolarização do mesmo, culminando com influxo de Ca^{2+} . Na presença de EGTA, um quelante de Ca^{2+} extracelular, 50% dos íons Ca^{2+} extracelular foram eliminados do meio externo e devido á menor concentração desse íon, houve menor influxo do mesmo o que justifica a menor liberação de $[\text{H}^3]\text{-ACh}$. Esse resultado foi coerente com o esperado, uma vez em que a exocitose é dependente do aumento da concentração de íons Ca^{2+} no meio intracelular para que haja a fusão das vesículas sinápticas contendo os neurotransmissores com a membrana do terminal.

Ainda nessa figura observamos que a incubação do sinaptosoma com o propofol $100\mu\text{M}$ (porcentagem de liberação de $[\text{H}^3]\text{-ACh}$ de 65,9069%) também foi capaz de reduzir em 50%, aproximadamente, a liberação de $[\text{H}^3]\text{-ACh}$ em sinaptosomas de hipocampo de ratos. A fim de entender de que forma o anestésico exerceu esse efeito foi feita, simultaneamente, a incubação do sinaptosoma com EGTA e propofol. Não foi observado efeito aditivo entre tais reagentes, o que nos sugere que o propofol atua de forma similar ao EGTA. Como o EGTA quela o cálcio extracelular, o resultado desse experimento nos sugere que o mecanismo de ação do anestésico é dependente do cálcio extracelular. No entanto, o resultado encontrado foi questionado ao avaliarmos que conforme desvendado nos experimentos prévios, o propofol atua bloqueando os CSSV. Assim, a não ocorrência de efeito aditivo entre EGTA e propofol poderia ser interpretada como uma independência dos íons Ca^{2+} extracelular pelo anestésico, uma vez em que estando 50% dos CSSV bloqueados pelo propofol ao se quelar 50% dos íons Ca^{2+} extracelular não foi observado nenhum efeito somatório na liberação de $[\text{H}^3]\text{-ACh}$. Dessa forma, o experimento realizado não foi conclusivo.

Após a avaliação da participação do íon Ca^{2+} extracelular no mecanismo de ação do anestésico questionamos se o Ca^{2+} intracelular não poderia também estar envolvido.

A hipótese proposta por nosso grupo foi que o propofol poderia reduzir a liberação de [^3H]-ACh através da redução ou da inibição da liberação de Ca^{2+} intracelular dos estoques e, conseqüentemente, diminuir a liberação de neurotransmissores. Nossa hipótese é fundamentada nas crescentes premissas sugerindo que a excitose pode ser regulada pelo Ca^{2+} liberado dos estoques intracelulares (Rodrigo Resende, Silvia Guatimosim e Maria de Fátima Leite, 2012). A fundamentação básica dessa linha de pesquisa é que a abertura de receptores IP_3 ou de rianodina resulta em eventos capazes de aumentar a excitose ou gerar microdomínios de alta concentração de Ca^{2+} necessários para disparar a excitose. Para esse mecanismo operar, entretanto, é necessário que algumas porções do retículo endoplasmático estejam em posições intimamente próximas à membrana plasmática, bem como associado a vesículas secretórias.

Para a realização de tais experimentos foi necessário descobrir se o mecanismo de ação da veratridina recrutava os íons Ca^{2+} intracelular. Se a veratridina recrutasse a participação desses íons seria possível avaliar ao efeito do anestésico em reduzir ou inibir a liberação dos íons Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Caso contrário, a análise da participação dos íons Ca^{2+} intracelular no mecanismo de ação do propofol seria impossibilitada de ser avaliada mediante estímulo com veratridina. Foram então realizados experimentos com o reagente BAPTA-AM (porcentagem de liberação de [^3H]-ACh de 43,728% - figura 24) em que comprovou-se que a veratridina recrutava os íons Ca^{2+} intracelular, pois, na presença de tal substância a liberação de [^3H]-ACh foi reduzida.

Os resultados dispostos na figura 19 demonstram que houve efeito aditivo entre o grupo BAPTA-AM IC_{50} + Propofol IC_{50} (liberação média de [^3H]-ACh de 31,545%) com o Propofol IC_{50} (liberação média de [^3H]-ACh de 58,6599%), mas não com o grupo BAPTA-AM IC_{50} (liberação média de [^3H]-ACh de 43,728%). Como o efeito aditivo não foi observado entre o grupo BAPTA-AM + Propofol com ambos os grupos em separado exclui-se o efeito somatório de ambos reagentes. Esse dado sugere que o mecanismo de ação do propofol é similar ao BAPTA-AM, ou seja, depende dos íons Ca^{2+} intracelular.

No entanto, como resultados prévios haviam nos demonstrado que o propofol atua bloqueando os CSSV assim como a TTX, avaliamos que ao atuar nos CSSV o propofol bloqueou em 50% a despolarização e, portanto, inibiu o estímulo necessário para o recrutamento de Ca^{2+} intracelular. Dessa forma, não seria possível concluir se o mecanismo de ação do propofol é dependente ou não do Ca^{2+} intracelular.

Somado a isso, em 1993, V Adam-Vizi, Z Deri, P Bors e L Tretter, publicaram um

artigo sugerindo que a veratridina é capaz de estimular a liberação de ACh apenas pelo aumento da concentração de Na^+ intracelular em sinaptosomas de córtex de cobaias. Neste trabalho, os sinaptosomas foram incubados com [^{14}C]-Ch e após estimulados com veratridina (5-40 μM) na ausência de íons Ca^{2+} extracelular foi observada a liberação de [^{14}C]-ACh sem alteração significativa na [Ca^{2+}]_i. Cabe ressaltar que, segundo o autor, o aumento na [Ca^{2+}]_i necessário para a ocorrência da exocitose era tão pequeno que não poderia ser detectado pela sonda empregada para avaliar variações na [Ca^{2+}]_i nos sinaptosomas. Na presença dos íons Ca^{2+} extracelular foi observada a liberação de [^{14}C]-ACh com aumento na concentração de íons Ca^{2+} intracelular. Sabendo disso, avaliamos que a análise da participação dos íons Ca^{2+} no mecanismo de ação do propofol mediante estímulo com veratridina poderia estar sendo mascarada pela atuação exclusiva do íon Na^+ , pois, independentemente da ação dos íons Ca^{2+} estaria havendo liberação de [^3H]-ACh em função do aumento interno de íons Na^+ ocasionado pela veratridina. Assim para realmente avaliar a participação dos íons Ca^{2+} no mecanismo de ação do anestésico foi necessário empregar um estímulo de liberação de [^3H]-ACh que independesse de Na^+ e dependesse, exclusivamente dos íons Ca^{2+} . O estímulo escolhido foi o KCl.

A figura 20 demonstra o efeito do KCl na liberação de [^3H]-ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Tal agente, na concentração de 50 mM, foi capaz de aumentar em 1069,73% a liberação de [^3H]-ACh em relação ao controle (fração de liberação de [^3H]-ACh de 0,0056). O EC_{50} , que é a concentração efetiva capaz de evocar 50% da liberação máxima de [^3H]-ACh foi de 32mM, conforme calculado na figura 20 (B). Apesar de calculado o EC_{50} , o valor de KCl empregado em nossos experimentos foi de 50mM, responsável pela liberação máxima de [^3H]-ACh e, portanto, capaz de aumentar a resolução experimental.

Uma vez desencadeada a despolarização do sinaptosoma o mesmo foi incubado com diferentes concentrações do anestésico intravenoso e foi possível avaliar que tal agente era capaz de inibir a liberação de [^3H]-ACh no hipocampo. Concentrações subanestésicas (1 μM) e anestésicas (10-30 -50-100 μM) (Cheng –Wei Lu e colaboradores 2009) de propofol inibiram a liberação de [^3H]-ACh, evocada por KCl, em todas as concentrações testadas, sem diferença estatística significativa (figura 20). O IC_{50} do propofol, mediante estímulo com KCl, foi de 25,41 μM .

Apesar de termos trabalhado com concentrações de KCl (50mM – liberação de [^3H]-ACh de 0,059905) e de veratridina (50 μM - liberação de [^3H]-ACh de 0,0388478) que evocavam magnitudes de liberação de [^3H]-ACh diferenciadas nos sinaptosomas, foi possível perceber que a potência do anestésico foi maior mediante estímulo com KCl 50mM (IC_{50} do

propofol foi de 25,41 μ M) do que o estímulo com veratridina 50 μ M (IC₅₀ do propofol foi de 100 μ M). Em relação ao KCl, todas as concentrações testadas de propofol geraram um mesmo efeito inibitório na liberação de [³H]- ACh enquanto que para a veratridina o efeito inibitório foi dose-dependente. O propofol, em concentrações supra-anestésicas (300 e 1000 μ M), atingiu 100% de inibição de liberação de [³H]- ACh evocada por veratridina (figura 14) enquanto que a liberação de [³H]- ACh, ao ser evocada por KCl, foi inibida pelo propofol (figura 20), em concentrações presentes dentro de uma faixa anestésica (1-100 μ M) (Cheng –Wei Lu e colaboradores 2009), sem atingir a inibição máxima e sem haver diferença estatística significativa entre nenhuma das doses empregadas. Esse dado está de acordo com os dados obtidos por Ratnakumari e colaboradores em 2001. Nesse estudo, foi avaliado o efeito do propofol na liberação de glutamato e foi observado que quando a liberação deste neurotransmissor era evocada por veratridina a inibição causada pelo anestésico era total (100%) e que quando a liberação de glutamato era evocada por KCl o anestésico somente gerou efeito inibitório até a concentração de 40 μ M, sem atingir inibição total da liberação de glutamato.

Ainda nesse estudo foi demonstrado que a potência do propofol foi maior em inibir a liberação de glutamato quando evocada por veratridina do que por KCl. Esse dado foi contrário ao encontrado por nosso grupo. Ratnakumari e colaboradores sugerem que a sensibilidade dos anestésicos gerais aos canais iônicos de Na⁺ é maior que a sensibilidade aos canais de Ca²⁺ e por isso foram encontradas tais diferenças na ação do anestésico frente aos estímulos de KCl e de veratridina. Conforme descrito pelos autores deste trabalho, apesar dessa hipótese ser plausível, não é possível eliminar a possibilidade de que a diferença na potência do anestésico seja em função da existência de distintos mecanismos de ação do KCl e da veratridina que não necessariamente se relacionam á sensibilidade do anestésico aos canais iônicos.

Sequencialmente, foram realizados experimentos para verificar se o mecanismo de ação do propofol envolvia a participação dos íons Ca²⁺. Para isso, alíquotas dos sinaptosomas de hipocampo de ratos foram estimulados com KCl 50mM e incubados com EGTA, um quelante de Ca²⁺ extracelular, no valor de IC₅₀ (0,2287mM) – figura 23.

A figura 23 representa os dados obtidos num experimento de efeito aditivo entre Propofol e EGTA. O efeito somatório desses dois agentes (porcentagem de liberação de [³H]- ACh de 40,5804%) apresentou efeito aditivo em relação ao EGTA 0,2287mM (porcentagem de liberação de [³H]- ACh de 59,3469%) e em relação ao propofol 25,41 μ M (porcentagem de liberação de [³H]- ACh de 62,2167%). A presença de efeito aditivo nos permite inferir que o anestésico atua por um mecanismo de ação além do mecanismo exercido pelo EGTA. Como o EGTA quela o Ca²⁺ extracelular, o propofol atua de forma independente desse Ca²⁺. A

independência do Ca^{2+} extracelular pelo propofol já foi relatado em outros estudos envolvendo neurotransmissão. Em 2002, Pashkov e Hemmings, demonstraram que o propofol aumenta a liberação de norepinefrina em sinaptosomas de córtex de ratos de forma independente do Ca^{2+} extracelular. Em 2009, Cheng-Wei Lu e colaboradores demonstraram que o propofol em doses subanestésicas aumenta a liberação de glutamato em sinaptosomas de córtex de ratos de maneira independente do Ca^{2+} extracelular e dependente do efluxo reverso deste neurotransmissor pelo transportador de glutamato.

Ainda na figura 23 foi realizado um experimento para confirmar o sabido dado, de que a despolarização evocada por KCl não é dependente da ativação dos CSSV. Como pode ser observado, a adição de TTX (porcentagem de liberação de [^3H]- ACh de 97,4186%) não bloqueou a liberação de [^3H]- ACh induzida por KCl (porcentagem de liberação de [^3H]- ACh de 100%). Esse dado também pode ser confirmado por Ratnakumari Lingamaneni e colaboradores, 2001.

A interpretação desse resultado nos levou a considerar a possibilidade da participação dos íons Ca^{2+} intracelular no mecanismo de ação do propofol, que foi confirmada pelos dados apresentados na figura 25. O experimento de efeito aditivo entre BAPTA-AM IC_{50} (valor de IC_{50} de $6,37 \times 10^{-6}$ M, determinado pelos gráficos apresentados na figura 23 com porcentagem de liberação de [^3H]- ACh de 53,4929%) e propofol IC_{50} (porcentagem de liberação de [^3H]- ACh de 53,0471%) não foi potencializado ao incubarmos as alíquotas de sinaptosomas com os dois agentes simultaneamente (porcentagem de liberação de [^3H]- ACh de 40,4608%). Esse dado está em concordância com os dados obtidos por Shinichi Ito e colaboradores, em 2011, em que através da análise de imagens realizadas em microscopia confocal na presença dos marcadores FM1-43 (marcação de vesículas sinápticas) e da sonda fluo3-AM (marcação de Ca^{2+}), foi analisada a variação da concentração de Ca^{2+} intracelular no terminal pré-sináptico. Foi demonstrado que a despolarização na presença de KCl ocasionou aumento na [Ca^{2+}] i. O anestésico (1-10 μM), ao ser adicionado, atuou impedindo o aumento da [Ca^{2+}] i alterando, com isso, a liberação de neurotransmissores. O trabalho conclui que possivelmente, o propofol, apresenta algum mecanismo inibitório sobre a [Ca^{2+}] i o que o permite exercer seu efeito de alterar a liberação de neurotransmissores.

Assim, nossos dados sugerem que o propofol influi na neurotransmissão colinérgica, sendo capaz de reduzir a liberação de [^3H]- ACh em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Mediante o estímulo com veratridina demonstramos que o mecanismo de ação do propofol envolve a participação dos CSSV e não foi possível descartar a participação dos íons Ca^{2+} extra e intracelular. Estimulando os sinaptosomas com KCl foi possível demonstrar que o mecanismo de ação do propofol independe dos íons Ca^{2+} extracelular e depende dos íons Ca^{2+} intracelular.

Apesar de não ter sido comprovada a participação dos íons Ca^{2+} extracelular no mecanismo de ação deste anestésico não se pode excluir totalmente a participação destes íons uma vez em que são essenciais para a ocorrência do processo de excitose.

As concentrações utilizadas de propofol em nossos experimentos compreenderam concentrações subanestésicas (1-10 μM), anestésicas (10-100 μM) e supra-anestésicas (acima de 100 μM) (Cheng –Wei Lu e colaboradores 2009). Os valores de concentração de propofol empregados nos experimentos basearam-se nas curvas de IC_{50} realizadas e compreenderam 25 μM e 100 μM mediante os estímulos com KCl e veratridina, respectivamente. Apesar de termos trabalhado com doses clínicas, é importante mencionar que embora as concentrações clinicamente relevantes de anestésicos sejam importantes para examinar as respostas integradas no animal intacto ou em humanos, a relevância em estudos *in vitro* deve ser cautelosa porque ainda não se compreende como estes sistemas se integram no modelo de anestesia (Eckenhoff e Johansson, 1999).

Este estudo demonstra, por medição de amostras radioativas, que o anestésico venoso propofol influi na neurotransmissão colinérgica, alterando a liberação de [³H]- ACh, ou seja, através de ações pré-sinápticas. Neste trabalho, demonstrou-se que:

- O propofol reduz a liberação espontânea e a evocada por veratridina e KCl de [³H]- ACh, dado que sugere que o efeito do propofol na neurotransmissão colinérgica pode justificar o efeito fisiológico de amnésia característico desse agente;
- O propofol reduz a liberação de [³H]- ACh evocada por veratridina de forma dose dependente;
- O propofol reduz a liberação de [³H]- ACh evocada por KCl;
- Mediante o estímulo com veratridina demonstramos que o mecanismo de ação do propofol envolve a participação dos CSSV , mas não foi possível descartar a participação dos íons Ca²⁺ extra e intracelular neste processo;
- Mediante estímulo com KCl foi possível demonstrar que o mecanismo de ação do propofol independe dos íons Ca²⁺ extracelular e depende dos íons Ca²⁺ intracelular.

VII. Referências Bibliográficas

1. Adachi, Y. U.; Watanabe, K.; Higuchi, H.; Satoh, T.; Zsilla, G. *Halothane enhances acetylcholine release by decreasing activity in rat striatal slices*. *Neurochemistry International*, v. 40, p. 189-193, 2001.
2. Aggleton, J.P., and Brown, M.W. *Episodic memory, amnesia and the hippocampal-anterior thalamic axis*. *Behav. Brain Sci.* 22,425–489. 1999.
3. Ahston, A.C.& Ushkaryov, Y.A. *Properties of synaptic vesicle pools in mature central nerve terminals*. *J. Biol. Chem.* 280. 37278-37288. 2005.
4. Andoh T., Furuya R., Oka K., Hattori S., Watanabe I., Kamiya Y., Okumura A. F. *Differential effects of thiopental on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and P2X purinergic receptors in PC12 cells*. *Anesthesiology*. 86:1199–1209.1997.
5. Antkowiak. *How do general anaesthetics work?* *Naturwissenschaften*. May;88(5):201-13. 2001.
6. Antognini JF, Carstens E. *In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components*. *Br J Anaesth*. Jul;89(1):156-66.2002.
7. Arias, H. R.; Blanton, M. P., *Molecular and physicochemical aspects of local anesthetics acting on nicotinic acetylcholine receptor-containing membranes*. *Mini. Rev. Med. Chem.*, v. 2, p. 385-410, 2002.
8. Balázs,R. *Subcellular fractionation of rat cerebellum: an electron microscopic and biochemical investigation. III. Isolation of large fragments of the cerebellar glomeruli*. *Brain Res.* 86, 17-30. 1975.
9. Barker LA, Dowdall MJ, Whittaker VP . *Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine*. *Biochem J* 130:1063-1075.1972.
10. Bazil, C. W.; Minneman, K. P. *Effects of clinical effective concentrations of halotane on adrenergic and colinergic synapses in rat brain in vitro*. *J. Pharmacol*, v. 248, p. 143-8, 1989.
11. Bertorelli, R.; Hallstrom, A.; Hurd, Y. L.; Karlsson, A.; Consolo, S; Ungerstedt, U. *Anaesthesia effects on in vivo acetylcholine transmission; comparisons of radioenzymatic and HPLC assays*. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 175, p. 79-83, 1990.
12. Blusztajn JK, Wurtman RJ. *Choline and Cholinergic Neurons*.*Science* 221: 614-620.1983.
13. Bradford, M. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*.*Anal. Biochem.* 72:248-254.1976.
14. Campagna, J.A.; Miller, K.W. & Forman, S.A. *Mechanisms of actions of inhaled anesthetics*. *N. Engl. J. Med*, v. 348, p. 2110-2124, 2003.

15. Catterall WA. *Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes*. Annu Rev Pharmacol Toxicol.; v.20 p15-43. 1980.
16. Catterall WA. *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. Neuron. Vol 26. 13-25, april 2000.
17. Catterall WA, Goldin, A.L, Waxman, S.G. *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels*. Pharmacol. Rev. 57, 397–409. 2005.
18. Catterall WA, Few AP. *Calcium channel regulation and presynaptic plasticity*. Neuron. Sep 25;59(6):882-901. 2008.
19. Catterall, W.A., Kalume, F; Oakley, J.C. *Nav1.1 channels and epilepsy*. J. Physiol. (Lond.) 588.11, 1849–1859. 2010.
20. Ceccarelli B, Hulburt WP, Mauro A. *Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction*. J Cell Biol. 57: 499-524. 1973.
21. Chanda, B.; Bezanilla, F. *Tracking Voltage-dependent Conformational Changes in Skeletal Muscle Sodium Channel during Activation*. J. Gen. Physiol. 120, 629–645. 2002.
22. Chapman. *Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?* Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 498-508 -July 2002.
23. Chen-Wei Lu, Tzu-Yu Lin, Han-Sun Chiang, Su-Jane Wang. *Facilitation of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminal by subanesthetic concentration propofol*. Synapse. 63, 773-781. 2009.
24. Collins, J. G.; Kendig, J. J.; Mason, P. *Anesthetic actions within the spinal cord: contributions to the state of general anesthesia*. Trends Neurosci., v.18, p. 549-553, 1995.
25. Concas A, Santoro G, Serra M, Sanna E, Biggio G. *Neurochemical action of the general anaesthetic propofol on the chloride ion channel coupled with GABAA receptors*. Brain Res. Mar 1;542(2):225-32. 1991.
26. Coates K.M., Flood P. *Ketamine and its preservative, benzethonium chloride, both inhibit human recombinant $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors in Xenopus oocytes*. Br. J. Pharmacol. 134:871–879. 2001.
27. Coates K.M., Mather L.E., Johnson R., Flood P. *Thiopental is a competitive inhibitor of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor*. Anesth. Analg. 92:930–933. 2001.
28. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. *Neurobiology of butyrylcholinesterase*. Nature Reviews Neuroscience 4: 131-138. 2003.

29. Dobransky T, Rylett RJ. *A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation*. Journal of Neurochemistry 95: 305-313.2005.
30. Dolphin. *A short history of voltage-gated calcium channels*. British Journal of Pharmacology.147, S56–S62. 2006.
31. Downie D.L., Franks N.P., Lieb W.R. *Effects of thiopental on optical isomers on nicotinic acetylcholine receptors*. Anesthesiology.93:774–783. 2000.
32. Dunkley, P.R. & Robinson, P.J. *Depolarisation-dependent protein phosphorylation in synaptosomes: mechanisms and significance*. Prog. Brain Res. 69, 273-293.1986.
33. Dunkley, P.R. *The preparation and use of synaptosomes for studying secretion of catecholamines*. In the Secretory Process Vol. 3 39-328 1987.
34. Dunkley, P.R. et al. *A rapid percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes*. Nature protocols. Vol 3, N.11, 1718-1728. 2008.
35. Eckenhoff, R.G., Johansson, J.S. *On the relevance of "clinically relevant concentrations" of inhaled anesthetics in in vitro experiments*. Anesthesiology 91, 856-860.1999.
36. Eichenbaum, H., and Cohen, N.J. *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain* . New York: Oxford University Press.2001.
37. Fernstrom JD. *Effects of Precursors on Brain Neurotransmitter Synthesis and Brain Functions*. Diabetologia 20: 281-289. 1981.
38. Firestone L. L.; Sauter, J. F.; Braswell, L. M.; Miller, K. W. *Actions of general anesthetics on acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo californica*. Anesthesiology, v. 64, p. 694-702, 1986.
39. Flood, P.; Role, L.W. *Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulation by general anesthetics*. Toxicol. Lett, v. 100-101, p. 149-153, 1998.
40. Flood P., Krasowski M.D. *Intravenous anesthetics differentially modulate ligand-gated ion channels*. Anesthesiology. 92:1418–1425. 2000.
41. Fodale V., Monaca E. *Propofol Infusion Syndrome: an overview of a perplexing disease*. Drug Safety; 31(4): 293-303. 2008.
42. Franks NP, Lieb WR. *Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors*. Nature. 310:599-601.1984.
43. Franks NP, Lieb WR. *Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels*. Science. 254:427-430.1991.
44. Franks NP, Lieb WR. *Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia*. Nature. 367:607-614.1994.
45. Franks, J. J.; Wamil, A. W.; Janicki, P. K.; Horn, J. L.; Franks, W. T.; Janson, V. E.; Vanaman, T. C.; Brandt, P. C. *Anesthetic-induced alteration of Ca²⁺ homeostasis in*

- neural cells: a temperature-sensitive process that is enhanced by blockade of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms.* Anesthesiology, v. 89, p.149-164, 1998.
46. Frenkel C, Urban BW. *Human brain sodium channels as one of the molecular target sites for the new intravenous anaesthetic propofol (2,6-diisopropylphenol).* Eur J Pharmacol; 208: 75–9. 1991.
 47. Frenkel C, Duch DS, Urban BW. *Effects of iv anaesthetics on human brain sodium channels.* Br J Anaesth; 71: 15–24. 1993.
 48. Galimberti E.S., Michael H. Gollob, Dawood Darbar. *Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology and related channelopathies.* Frontiers in pharmacology. Vol 3. Article 124. July 2012.
 49. Gill, S. K., M. Bhattacharya, S. S. Ferguson e R. J. Rylett. *Identification of a novel nuclear localization signal common to 69- and 82-kDa human choline acetyltransferase.* J Biol Chem, v.278, n.22, May 30, p.20217-24. 2003.
 50. Griffiths R, Norman RI. *Effects of anaesthetics on uptake, synthesis and release of transmitters.* Br J Anaesth. V. 71(1) p96-107. 1993.
 51. Griffiths, R.; Elton, C. D.; Rowbotham, D. J.; Norman, R. I. *Inhibition by halothane of potassium-stimulated acetylcholine release from rat cortical slices.* Br. J. Pharmacol., v. 116, p. 2310-2314, 1995.
 52. Gold PE. *Acetylcholine: Cognitive and brain functions.* Neurobiology of Learning and Memory 80: 177.2003.
 53. Gomez, R. S.; Gomez, M. V.; Prado, M. A. M. *The effect of isoflurane on the release of [3H]-acetylcholine from rat brain cortical slices.* Brain Res., v. 52, p. 263-267, 2000.
 54. Gomez RS, Prado MA, Carazza F, Gomez MV. *Halothane enhances exocytosis of [3H]-acetylcholine without increasing calcium influx in rat brain cortical slices.* Br J Pharmacol. Jun;127(3):679-84.1999.
 55. Gorman L., Kevin Pang, Karyn M. Frick, Ben Givens, David S. Olton. *Acetylcholine release in the hippocampus: effects of cholinergic and GABAergic compounds in the medial septal area.* Neuroscience letters. 166, 199-22. 1994.
 56. Haeseler G, Tetzlaff D, Bufler J, Dengler R, Münte S, Hecker H, Leuwer M. *Blockade of voltage-operated neuronal and skeletal muscle sodium channels by S(+)- and R(-)-ketamine.* Anesth Analg. Apr;96(4):1019-26. 2003.
 57. Hales, B.A; Brewer. *Activity in the hippocampus and neocortical working memory regions predicts successful associative memory for temporally-discontiguous events.* Neuropsychologia. September; 48(11): 3351–3359. 2011.

58. Hara M, Kai Y, Ikemoto Y. *Propofol activates GABAA receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat*. *Anesthesiol*; 79: 781-788.1993.
59. Harris B, Moody E, Skolnick P. *Isoflurane anesthesia is stereoselective*. *Eur J Pharmacol*. 217: 215-216.1992.
60. Helton J. Reis, Marco A. M. PRADO, Evanguedes Kalapothakis, Marta N. Cordeiro, Carlos R. Diniz, Luiz A. De Marco, Marcus V. Gomez and Marco A. Romano-Silva. *Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider Phoneutria nigriventer* *Biochem. J*. 343 (413–418).1999.
61. Hille B, Leibowitz MD, Sutro JB, Schwarz JR, Holan G. *State-dependent modification of sodium channels by lipid-soluble agonists*. *Soc Gen Physiol Ser.*;v 41.p109-24. 1987.
62. Hemmings, H.C., Myles H. Akabas, Peter A. Goldstein, James R.Trudell, Beverley A. Orser and Neil L. Harrison. *Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action*. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol 26(10) 2005.
63. Heuser JE & Reese TS. *Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction*. *J Cell Biol*. 57:315-44.1973.
64. Hoffman, B.B. & Taylor, P. Goodman and Gilman's. *The pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York 2001.
65. Honoré. *The neuronal background K2p channels: focus on TREK-1*. *Nature Reviews*. April: v.8 p251-261. 2007.
66. Hui Wang, Zhipeng Xu, Chunsheng Feng, Yun Wang, Xingyuan Jia, Anshi Wu, Yun Yue. *Changes of learning and memory in aged rats after isoflurane inhalational anaesthesia correlated with hippocampal acetylcholine level*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. Volume31, issue 3, e61-e66, março 2012.
67. Irnaten M, Wang J, Chang KS, Andresen MC, Mendelowitz D. *Ketamine inhibits sodium currents in identified cardiac parasympathetic neurons in nucleus ambiguus*. *Anesthesiology*. Mar;96(3):659-66.2002.
68. Infarmed. *Resumo das Características do Medicamento, Diprivan 1%, Astra Zeneca*. 2002.
69. Inoue Y, Shibuya I, Kabashima N, Noguchi J, Harayama N, Ueta Y, *et al*. *The mechanism of inhibitory actions of propofol on rat supraoptic neurons*. *Anesthesiology*. 91: 167-78.1999
70. Isom, L. L. *Beta subunits: players in neuronal hyperexcitability?* *Novartis Found Symp* 241: 124-138.2002.
71. Jarrard,L.E. *Selective Hippocampal lesions and behavior*. *Physiological Psychology*. 198-206. 1980

72. Kamiya Y., Andoh T., Watanabe I., Higashi T., Itoh H. *Inhibitory effects of barbiturates on nicotinic acetylcholine receptors in rat central nervous system neurons.* *Anesthesiology.* 2001;94:694–704. 2001.
73. Katz, B.; Miledi, R. *The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals.* *Proc R Soc Lond B Biol Sci,* v. 161, p. 496-503, 1965.
74. Katz, B.; Miledi, R. *Ionic requirements of synaptic transmitter release.* *Nature,* v. 215, p. 651, 1967.
75. Katz B. *The release of neural transmitter substances.* pp 1-55, C.C Thomas, Springfield. 1969.
76. Kikuchi, Wang, Sato e Okumura. *In vivo effects of propofol on acetylcholine release from the frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats.* *British journal of Anaesthesia,*80: 644-648. 1998.
77. Koh, A. Yamamoto, A. Inoue, Y. Inoue and K. Akagawa, *et al. Immunoelectron microscopic localization of the HPC-1 antigen in rat cerebellum.* *Journal of Neurocytology,* Volume 22, Number 11, Pages 995-1005. 1993
78. Krasowski M.D., Harrison N.L. *General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels.* *Cell Mol. Life Sci.*55:1278–1303. 1999.
79. Kuhar, M. J. e L. C. Murrin. *Sodium-dependent, high affinity choline uptake.* *J Neurochem,* v.30, n.1, Jan, p.15-21. 1978.
80. Leite L.F., Gomez R.S., Fonseca M.C., Gomez M.V, Guatimosim C.. *Effect of intravenous anesthetic propofol on synaptic vesicle exocytosis at the frog neuromuscular junction.* *Acta pharmacologica Sinica.* 32: 31-37. 2011.
81. Lingamaneni R, Hemmings HC Jr. *Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA(A) receptors.* *Br J Anaesth ;* 90: 199–211.2003.
82. Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. *Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system.* *Trends Neurosci.* Sep;15(9):351-5. 1992.
83. Marks, Maxfield. *Preparation of Solutions with Free Calcium Concentration in the Nanomolar Range Using 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N',N',N'-tetraacetic Acid.* *Analytical Biochemistry.* 193, 61-71. 1991
84. Martella G, De Persis C, Bonsi P, Natoli S, Cuomo D, Bernardi G, *et al. Inhibition of persistent sodium current fraction and voltage-gated L-type calcium current by propofol in cortical neurons: implications for its antiepileptic activity.* *Epilepsia;* 46: 624–35.2005.

85. Mcgaugh, J. L.; Izquierdo, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 21, p. 208-210, 2000.
86. Meyer, E. M.; Engek, D. A.; Cooper, J. R. *Acetylation and phosphorylation of choline fowling high and low affinity uptake by cortical synaptosomes*. *Neurochem.* v. 7, p.749-759, 1982.
87. Morgan IG. Synaptosomes and cell separation. *Neuroscience*. 1976 Jun;1(3):159-65.1976.
88. Morgan, D. W. T.; Legge, K. *Clinical evaluation of propofol as an intravenous agent in cats and dogs*. *The Veterinary Record*, London, v. 124, n. 2, p. 31-33, 1989.
89. Neher, E. *Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release*. *Neuron*, v. 20, p. 389-399, 1998.
90. Neto F.R.; Enrique José Cobos; Miguel Ángel Tejada; Cristina Sánchez-Fernández; Rafael González Cano; Cruz Miguel Cendán. *Tetrodotoxin (TTX) as a Therapeutic Agent for pain*. *Marine Drugs*. V.10; 281-305. 2012.
91. Nguyen, M. L.; Cox, G. D.; Parsons, S. M. *Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine*. *Biochemistry*, v. 37, p. 13400-13410, 1998.
92. Nicholls DG. *The glutamatergic nerve terminal*. *Eur J Biochem*. 1993 Mar 15;212(3):613-31. 1993.
93. Oda, Y. *Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system*. *Pathol Int*, v.49, n.11, Nov,p.921-37. 1999.
94. Orser B. A., Bertlik M., Wang TY, MacDonald J.F. *Inhibition by propofol (2,6 diisopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurons*. *British Journal of Pharmacology*; 116(2): 1761-8. 1995.
95. Ouyang W, Wang G, Hemmings HC Jr. *Isoflurane and propofol inhibit voltage-gated sodium channels in isolated rat neurohypophysial nerve terminals*. *Mol Pharmacol*. Aug;64(2):373-81.2003.
96. Paddleford, R. R. Drogas pré-anestésicas. In: PADDLEFORD, R. R. *Manual de anestesia em pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Roca,. cap. 2, p. 15-35. 2001a.
97. Paddleford, R. R. Drogas anestésicas. In: PADDLEFORD, R. R. *Manual de anestesia em pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 3, p. 37-88. 2001b.
98. Parsons, S. M.; Bahr, B. A.; Rogers, G. A.; Clarkson, E. D.; Noremborg, K.; Hicks, B. W. *Acetylcholine transporter--vesamicol receptor pharmacology and structure*. *Prog. Brain Res.*, v. 98, p. 175-181, 1993.

99. Parsons, S. M. *Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage*. *FASEB J.*, v. 14, p. 2423-2434, 2000.
100. Pashkov VN, Hemmings HC Jr. *The effects of general anesthetics on norepinephrine release from isolated rat cortical nerve terminals*. *Anesth Analg.* Nov;95(5):1274-81.2002.
101. Patino,G.A. Isom,L.L. *Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease*. *Neurosci.Lett.* 486, 53–59.2010.
102. Patton, D.E.; Isom, L.L.; Catterall, W.A.; Goldin A.L. *The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits*. *J Biol Chem* 269 (26): 17649-55.1994.
103. 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, pp 265-82.2003.
104. Polosa, P.L. & Attardi, G. *Distinctive pattern and translational control of mitochondrial protein synthesis in rat brain synaptic endings*. *J. Biol. Chem.* 266, 10011-10017. 1991
105. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. *Fundamental Neuroscience*. 2^a Edição. Elsevier. 2001.
106. Rada, E. M.; Tharakan, E. C.; Flood, P. *Volatile anesthetics reduce agonist affinity at nicotinic acetylcholine receptors in the brain*. *Anesth. Analg.*, v. 96, p. 108-11, table, 2003.
107. Raines, D. E.; Claycomb, R. J.; Forman, S. A. *Nonhalogenated anesthetic alkanes and perhalogenated nonimmobilizing alkanes inhibit alpha(4)beta(2) neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. *Anesth. Analg.*, v. 95, p. 573-7, table, 2002.
108. Raines, D. E.; Claycomb, R. J.; Forman, S. A. *Modulation of GABA(A) receptor function by nonhalogenated alkane anesthetics: the effects on agonist enhancement, direct activation, and inhibition*. *Anesth. Analg.*, v. 96, p. 112-8, table, 2003.
109. Ramon y Cajal S. *Histologie du Système Nerveus de l'Homme & des Vertébrés*, Vol. 2. L Azoulay (transl). Paris: Maloine; 1955. Reprint. Madrid: Instituto Ramón y Cajal. 1911.
110. Ratnakumari L,Martin L. Birch, Hugh C. Hemmings. *Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol*. *Anesthesiology*. 95. 1460-6. 2001.
111. Ratnakumari L, Hemmings HC Jr. *Effects of propofol on sodium channel-dependent sodium influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes*. *Anesthesiology*. Feb;86(2):428-39.1997.

112. Reckziegel G, Friederich P, Urban BW. *Ketamine effects on human neuronal Na⁺ channels*. Eur J Anaesthesiol. Sep;19(9):634-40.2002.
113. Ribeiro, F. M., S. A. Black, V. F. Prado, R. J. Rylett, S. S. Ferguson e M.A. Prado. *The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1*. J Neurochem, v.97, n.1, Apr, p.1-12. 2006.
114. Richards CD. Anesthetic modulation of synaptic transmission in the mammalian CNS. British Journal of Anaesthesia. 89 (1). 79-90. 2002.
115. Rizo; Rosenmund. *Synaptic vesicle fusion*. Nature structural and molecular biology. V. 15, N.7, 2008.
116. Rodrigo R.Resende, Silvia Guatimosim, Maria de Fátima Leite. *Sinalização de Ca²⁺: Bioquímica e Fisiologia Celulares*. Editora Sarvier. 2012.
117. Rudolph, Antkowiak. *Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics*. Nature Reviews- Neuroscience. V.5 709-720. 2004.
118. Ryan TA. *A pre-synaptic to-do list for coupling exocytosis to endocytosis*. Curr Opin Cell Biol 18:416-421. 2006.
119. Sarter M, Parikh V. *Choline transporters, cholinergic transmission and cognition*. Nature Reviews Neuroscience 6: 48-56. 2005.
120. Scoville; Milner. *Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 12:1. 1957.
121. Shinichi Ito, Hitomi Sugiyama, Seiko Kitahara, Yoshimi Ikemoto, Takeshi Yokoyoma. *Effect of propofol and pentobarbital on calcium concentration in presynaptic boutons on a rat hippocampal neuron*. J. Anesth. 25: 727-733. 2011.
122. Shirasaka T, Yoshimura Y, Qiu DL, Takasaki M. *The effects of propofol on hypothalamic paraventricular nucleus neurons in the rat*. Anesth Analg; 98: 1017-23.2004.
123. Silman I, Sussman JL. *Acetylcholinesterase: 'classical' and 'nonclassical' functions and pharmacology*. Current Opinion in Pharmacology 5: 293-302. 2005.
124. Sonner, Joseph F. Antognini, Robert C. Dutton, Pamela Flood, Andrew T. Gray, R. Adron Harris, Gregg E. Homanics, Joan Kendig, Beverley Orser, Douglas E. Raines, James Trudell, Bryce Vissel, Edmond I Eger II. *Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration*. September vol. 97 no. 3 718-740. 2003

125. Squire, L.R., Stark, C.E.L., and Clark, R.E.. *The medial temporal lobe*. Annu. Rev. Neurosci. 27, 279–306.2004.
126. Südhof. *The Synaptic Vesicle Cycle*. Annu. Rev. Neurosci. 27:509–47. 2004.
127. Stühmer, W.; Conti, F.; Suzuki, H.; Wang, X.; Noda, M.; Yahagi, N.; Kubo, H.; Numa, S. *Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel*. Nature 339, 597-603.1989.
128. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Gronborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brugger B, Ringler P, Muller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. *Molecular anatomy of a trafficking organelle*. Cell 127:831-846.2006.
129. Taguchi, K.; Andresen, M. J.; Hentall, I. D. *Acetylcholine release from the midbrain interpeduncular nucleus during anesthesia*. Neuroreport, v. 2, p. 789-792, 1991.
130. Taylor, Joan Heller Brown. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. American Society for Neurochemistry. Elsevier,185-210.2006.
131. Tomlin, Andrew Jenkins, William R. Lieb, Nicholas P. Franks. *Stereoselective effects of etomidate optical isomers on Gamma-aminobutyric Acid Type A receptors and animals*. Anesthesiology. 88: 708-717.1998.
132. Turner TJ, Dunlap K. *Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion*. Neuropharmacology 34:1469-1478.1995.
133. V. Adam-Vizi, Z Deri, P Bors, L. Tretter. *Lack of involvement of [Ca²⁺] in the external Ca²⁺- independent release of acetylcholine evoked by veratridine, ouabain and α -latrotoxin: Possible role of [Na⁺]_i*. J Physiology . 87, 43-50. 1993.
134. Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS. *Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian ventral neurons*. Physiol Rev. Oct; 88 (4): 1407-47.2008.
135. Veselis R.A. et al. *Thiopental and propofol affect different regions of the brain at similar pharmacologic effects*. Anesth. Analg. 99, 399-984. 2004.
136. Violet, J. M.; Downie, D. L.; Nakisa, R. C.; Lieb,W. R.; Franks, N. P. *Differential sensitivities of mammalian neuronal and muscle nicotinic acetylcholine receptors to general anesthetics*. Anesthesiology, v. 86, p. 866-874, 1997.
137. Wang, Kikuchi, Sakai, Sato, Okumura. *Age-related modifications of effects of ketamine and propofol on rat hippocampus acetylcholine release studied by in vivo brain microdialysis*.Acta Anaesthesiol Scand. 44:112-117. 2000.
138. Weber M, Motin L, Gaul S, Beker F, Fink RH, Adams DJ. *Intravenous anaesthetics inhibit nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents and Ca²⁺ transients in rat intracardiac ganglion neurons*. Br J Pharmacol. Jan;144(1):98-107.2005.

139. Whittaker, V.P. *The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation.* J Anat. 96. 79-88. 1962.
140. Whittaker, V.P; Michaelson, I.A. & Kirkland, R.J. *The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ("synaptosomes").* Biochem. J. 90. 293-303. 1964.
141. Yamamura, H. I. e S. H. Snyder. *High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain.* J Neurochem, v.21, n.6, Dec, p.1355-74. 1973.
142. Yamakura T., Chavez – Noriega L.E., Harris R.A. *Subunit-dependent inhibition of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors and other ligand-gated ion channels by dissociative anesthetics ketamine and dizocilpine.* Anesthesiology. 92:1144–1153.2000.
143. Yamakura T., Bertaccini E., Trudell J.R., Harris R.A. *Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.;41:23–51.2001.
144. Yu,F.H. Catterall,W.A. *Overview of the voltage-gated sodium channel family.* Genome Biol. 4, 207.2003.
145. Zeisel SH. *Dietary Choline - Biochemistry, Physiology, and Pharmacology.* Annual Review of Nutrition 1: 95-121.1981.
146. Zimmerman, S. A.; Jones, M. V.; Harrison, N. L. *Potentiation of gamma-aminobutyric acidA receptor Cl- current correlates with in vivo anesthetic potency.* J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 270, p. 987-991, 1994.