

**Priscila Aparecida Costa Valadão**

**O anestésico intravenoso etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de camundongos.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Biologia Celular.

Orientador: Cristina Guatimosim Fonseca  
Co-orientador: Renato Santiago Gomez

**Belo Horizonte 2013**

*À Deus!*

*Pequena palavra que me possibilita agradecer a todas as pessoas que me amam e me ajudaram neste caminho que escolhi. Eu e vocês somos uma forma de expressar o amor de Deus!*

## **APOIO INSTITUCIONAL**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca e co-orientação do Prof. Dr. Renato Santiago Gomez (Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG) e com apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Parte dos resultados desta dissertação foi apresentado nos seguintes eventos:**

- 10th International Congress on Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. Rio de Janeiro, Brasil.
- V Simpósio de Biologia Celular da UFMG. Belo Horizonte, Brasil.
- I Simpósio Brasileiro de Sinalização de Cálcio. Belo Horizonte, Brasil.
- VI Simpósio de Neurociências da UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

*"Serás sempre Deus e sempre me amarás, não me desampararás, nem desistirás de mim. E ainda que a dor me diga que não, sei que é por amor. Estás me ensinando que sempre és Deus"*

*Serás sempre Deus- Trazendo a arca*

## AGRADECIMENTOS

Sem Deus, nada é possível, sem Deus nada tem valor e sem Deus nada faz sentido. Obrigada meu Deus! Obrigada Deus pela vida maravilhosa que me concedeu e por seu amor por mim demonstrado a cada dia. Ao meu Deus de vitória seja dada toda honra e glória, pois é D'Ele, por Ele e para Ele que são todas as coisas.

Ao Vinícius, meu companheiro de uma vida toda, meu namorado, meu marido e amigo! Vini, te agradeço por ser lá atrás a pessoa que mais me incentivou a alcançar vãos cada vez maiores, e que nunca me deixou sozinha e sem rumo nos meus sonhos. Te agradeço pela compreensão, pelos conselhos certos nas horas certas, por me amar, assim desta forma tão leve e intensa, o que me permite andar por mim mesma, mas sabendo que sempre te tenho comigo. Obrigada por me conduzir sem mandar em mim. No fim disso tudo, seremos só eu, você e Deus. Eu te amo!

Aos meus pais, Tinico e Aparecida, que por razões que desconheço, não puderam compartilhar comigo em terra, deste período da minha vida, mas sei que assim como em tudo na minha vida, vocês sempre estarão presentes seja em um olhar, em uma expressão ou gesto que parte de mim e reflete vocês. E guardo sempre em mim estas palavras: Se um dia, eu já feita mulher realizada, sentir que a terra cede aos meus pés, que minhas obras desmoronam, que não há ninguém à minha volta para me estender a mão, esquecerei minha maturidade, passarei pela minha mocidade, voltarei à minha infância e balbuciarei entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre me restarão na alma: minha mãe, meu pai!  
Obrigada e amo vocês!!!

Aos meu irmão Anderson, que mesmo à distancia torce pela irmã que só quer saber de estudar rsrs, sei que mesmo não entendendo por que tanto estudo, você torce para que eu chegue onde eu sonho. Obrigada!

À Ana e Enéias Valadão, meus sogros maravilhosos, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui. Seja pela persistência da Ana ou pela ajuda sempre bondosa do Enéias. Obrigada por me fazerem acreditar que eu poderia ser quem eu quisesse.

A Mariana e Liliane, minhas cunhadas-irmãs que ajudaram a cuidar de mim e que sempre estão a disposição para me escutar. Obrigada cunhadinhas pela presença e pelo carinho que você me dedicam todos estes anos. Agradeço também ao Bruno e ao Gú pela força.

A minha orientadora Cristina Guatimosim, por me receber como aluna, por me incentivar a buscar o conhecimento, por me mostrar o caminho da serenidade. Por estar sempre por perto, por ser exemplo de ser humano responsável e por não medir esforços para que eu continuasse.

Ao meu co-orientador Renato pelo apoio e por sempre ter uma boa solução para os obstáculos.

Aos professores Lígia Araújo e Christopher Kushimerick pela acolhida no laboratório de Eletrofisiologia para que eu pudesse concluir os dados e pela paciência nos ensinamentos.

Ao meu grande amigo e mais que irmão de alma Matheus de Castro por ser um amigo e irmão científico, por ter me passado tudo o que era necessário para que eu concluísse esta etapa. Por me socorrer nos momento mais tensos desta jornada. Os passos dele foram os primeiros que segui no laboratório. E extrapolando a barreira do trabalho, obrigada por ser meu querido amigo, obrigada pelas conversas, pela amizade, pela cumplicidade que me faz tão bem, pela sua simplicidade e complexidade que se somam à minha. Obrigada por me mostrar que mesmo sendo um gênio, você é gente, que ama e se preocupa, uma pessoa maravilhosa, gentil, generosa e alegre que fez do meu Mestrado algo muito mais divertido. Obrigada Theus!

Ao Hermann, "o Magate" que também não poupou esforços pra me ensinar e passar tudo o que sabia e sempre com bom-humor peculiar e que deixava o dia-a-dia bem mais leve. Obrigada Magate!

Aos amigos de longas horas diárias do laboratório Bárbara e Matheus Proença. Somos o que podemos chamar de "galera das 8 às 20h", mas o melhor é que com vocês as horas eram apenas um detalhe. Obrigada pelo carinho!

Aos amigos do LabNeuro Rubens, Rayara, Marina e Luana por me ouvir e por estar sempre comigo. Obrigada!

A professora Janice que mais que uma professora é uma amiga. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e por me mostrar que a simplicidade é o caminho.

Aos amigos do departamento em especial à Marcela que sem a qual teria sido muito mais difícil o início desta caminhada. Ao Marcos, Heder, Juliana, Gisele, Vanessa, Roberta e Natália pela presença, preocupação e sorrisos.

Aos Professores José Carlos, José Dias e Antônio Carlos por terem me acolhido no início de tudo. Obrigada Professores!

À amiga Maíra pela fiel amizade, pelo companheirismo, pelo apoio, pelas orações, por me fazer acreditar não em mim, mas num Deus que capacita.

Ao meu Dog Manolo por me desconcentrar e desestressar, e por me fazer sorrir ao chegar em casa!

Aos meus familiares em especial à minha avó Amélia e aos meus tios Ângela e Percy pelas orações, pelo carinho, por fazerem me sentir tão importante na família.

À UFMG e às entidades financiadoras CNPq, FAPEMIG, CAPES, por propiciarem uma pós-graduação de tão elevado nível no Brasil.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR.....	1
1.2 - O CICLO DE VESÍCULAS SINÁPTICAS .....	5
1.3-ANESTÉSICOS.....	10
1.4- ANESTÉSICOS INTRAVENOSOS.....	11
1.6- EFEITOS DO ETOMIDATO NO SNC .....	14
2 – OBJETIVOS .....	17
OBJETIVO GERAL .....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1- SOLUÇÕES .....	18
3.2- REAGENTES E TOXINAS: .....	18
3.3- ANIMAIS .....	19
3. 5– MARCAÇÃO E DESMARCAÇÃO DE VESÍCULAS SINÁPTICAS COM FM1-43.....	22
3.5- EXPOSIÇÃO DAS PREPARAÇÕES AO ANESTÉSICO ETOMIDATO E ÀS NEUROTOXINAS .....	22
3.6- MARCAÇÃO DOS TERMINAIS PÓS-SINÁPTICOS COM $\alpha$ - BUNGAROTOXINA ( $\alpha$ -BGT).....	23
3.9.- MEDIDAS DA LIBERAÇÃO ESPONTÂNEA (MEEPS):.....	24
3.7.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
4 - RESULTADOS.....	25
4.1 – EFEITO DO ETOMIDATO NA EXOCITOSE ESPONTÂNEA DE VESÍCULAS SINÁPTICAS .....	25
4.3- ETOMIDATO ESTIMULA A EXOCITOSE DE VESÍCULAS SINÁPTICAS POR UM MECANISMO DEPENDENTE DE $Ca^{2+}$ EXTERNO. ....	34
4.4-EFEITO DO ETOMIDATO NOS POTENCIAIS EM MINIATURA DA PLACA MOTORA (MEEPS).....	39
4.6- EFEITO DO ETOMIDATO SOBRE OS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACH .....	41

<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -BGT	Alfa-bungarotoxina
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\omega$ -Aga IVA	Omega- Agatoxina IVA
MVIIC	Omega- conotoxina MVIIC
ACh	Acetilcolina
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AChE	Acetilcolinesterase
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
$\text{Ca}^{2+}$	Íon cálcio
CCSV	Canais para cálcio sensíveis a voltagem
CSSV	Canais para sódio sensíveis a voltagem
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
EGTA	Etilenoglicol-bis- $\beta$ -aminoetil éster FM1-43
EPM	Erro padrão médio
JNM	Junção Neuromuscular
KCl	Cloreto de potássio
$\text{K}^+$	Potássio
MEPPs	Potencial de placa motora em miniatura
mV	Milivolt
$\text{MgCl}_2$	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nM	Nanomolar
$\text{Na}^+$	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato de sódio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de sódio monobásico
$\text{O}_2$	Oxigênio
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada ao sinaptosoma
T-SNARE	<i>Target SNARE</i>
TTX	Tetrodotoxina
VACHT	Transportador vesicular da acetilcolina
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
V-SNARE	<i>Vesicular SNARE</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> :Junção Neuromuscular de camundongo.....	03
<b>Figura 2</b> : Três modelos para endocitose de vesículas sinápticas.....	07
<b>Figura 3</b> :Principais etapas da neurotransmissão.....	09
<b>Figura 4</b> :O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em neurônios.....	21
<b>Figura 5</b> :Curva dose resposta da exocitose induzida pelo anestésico etomidato.....	27
<b>Figura 6</b> :Quantificação da exocitose induzida pelo anestésico etomidato.....	28
<b>Figura 7</b> :O Veículo propilenoglicol não interfere na exocitose de vesículas sinápticas.....	30
<b>Figura 8</b> :Etomidato pode estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo independente de Na <sup>+</sup> .....	33
<b>Figura 9</b> :Etomidato pode estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente de Ca <sup>2+</sup> externo.....	35
<b>Figura 10</b> :Etomidato pode estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente de canais para Ca <sup>2+</sup> do tipo P/Q .....	38
<b>Figura 11</b> :Efeitos do etomidato sobre a frequência e amplitude dos MEEPs.....	40
<b>Figura 12</b> :Etomidato pode atuar nos receptores nicotínicos de ACh.....	42

## RESUMO

Os anestésicos gerais são utilizados na prática clínica com o intuito de promover ao paciente analgesia, inconsciência, amnésia e relaxamento muscular. Ao longo de décadas esforços tem sido feitos para elucidar os possíveis mecanismos moleculares de ação destes agentes. O anestésico etomidato é utilizado na prática clínica como um dos principais agentes de indução anestésica. Ele pode causar alguns movimentos espontâneos, especialmente mioclonias que são observadas em cerca de 50-80% dos pacientes após sua administração, sugerindo assim, um possível efeito destes agentes no sistema nervoso periférico. Além disso, alguns estudos sugerem que anestésicos podem atuar em canais iônicos localizados no terminal pré-sinápticos alterando a liberação de neurotransmissores, assim como na célula muscular, desorganizando receptores nicotínicos, interferindo com o potencial de membrana desta célula. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos pré-sinápticos e pós-sinápticos do etomidato utilizando como modelo experimental a junção neuromuscular de camundongo. Preparações nervo-músculo foram isoladas e marcadas com a sonda fluorescente FM1-43 (4  $\mu\text{M}$ ), uma potente ferramenta para acompanhar exocitose e endocitose de vesículas sinápticas. Após a marcação, as preparações foram expostas a diferentes concentrações de etomidato (0,1, 1, 2, 8, 10 e 40  $\mu\text{M}$ ) e visualizadas em microscópio óptico de fluorescência. Observamos que concentrações clinicamente relevantes de etomidato estimulam a exocitose de vesículas sinápticas. Este efeito não foi inibido por tetrodotoxina (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canais para  $\text{Na}^+$  sensíveis à voltagem, demonstrando que o etomidato pode agir estimulando a exocitose de vesículas por um mecanismo independente de  $\text{Na}^+$ . Entretanto, a exocitose foi inibida por  $\omega$ -conotoxina MVIIC (50  $\mu\text{M}$ ) um bloqueador inespecífico de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem e pelo bloqueador de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo P/Q  $\omega$ -AGA IVA (200 nM). Utilizando o mesmo modelo experimental investigamos através da técnica de eletrofisiologia possíveis alterações no padrão de frequência e amplitude dos MEEPs na presença do etomidato. A análise dos resultados relativos à frequência e amplitude dos MEEPs demonstrou que na presença do etomidato não houve alteração destes parâmetros. Investigamos também se este anestésico poderia atuar de alguma forma nos receptores nicotínicos para acetilcolina marcados com  $\alpha$ -bungarotoxina-Alexa 594 (12  $\mu\text{M}$ ), que foram visualizados ao microscópio óptico de fluorescência. Nossos dados sugerem que o etomidato pode atuar de algum modo sobre os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Em conclusão, nossos dados indicam que o etomidato exerce um efeito pré-sináptico na junção neuromuscular, provavelmente, através da ativação de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes do tipo P/Q e que este anestésico pode também interferir com a organização dos receptores nicotínicos para acetilcolina.

## ABSTRACT

The general anesthetics are used in clinical practice in order to induce analgesia, unconsciousness, amnesia and muscle relaxation. For decades efforts have been made to elucidate the possible molecular mechanisms of action of these agents. Etomidate is used in clinical practice as one of the main agents to induce anesthesia. It can cause some spontaneous movements, especially myoclonus in approximately 50-80% of patients after administration, thus suggesting a possible effect of these agents in the peripheral nervous system. Furthermore, some studies suggest that anesthetics may act on ion channels located on presynaptic terminal by changing the release of neurotransmitters, changing the organization of nicotinic receptors of the muscle cells as well changing its membrane potentials. Thus, the aim of this study was to investigate the presynaptic and postsynaptic effects of etomidate at the mouse neuromuscular junction. Nerve-muscle preparations were isolated and labeled with the fluorescent probe FM1-43 (4  $\mu\text{M}$ ), a powerful tool to monitor exocytosis and endocytosis of synaptic vesicles. The nerve-muscle preparations were then exposed to different concentrations of etomidate (0.1, 1, 2, 8, 10, and 40  $\mu\text{M}$ ) and were subsequently visualized using a fluorescence optical microscope. We found that clinically relevant concentrations of etomidate stimulates exocytosis of synaptic vesicles. This effect was not inhibited by tetrodotoxin (1  $\mu\text{M}$ ), a channel blocker for voltage-sensitive  $\text{Na}^+$ , demonstrating that etomidate may act by stimulating exocytosis of vesicle by a mechanism independent of  $\text{Na}^+$ . However, exocytosis was inhibited by  $\omega$ -conotoxin MVIIC (50  $\mu\text{M}$ ) a blocking nonspecific channels for  $\text{Ca}^{2+}$  and voltage sensitive channels by blocking voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -type P / Q  $\omega$ -AGA-IVA (200nM). Using electrophysiology, we searched for putative alterations in the frequency and amplitude of MEEPs in the presence of etomidate. Concerning frequency and amplitude of MEEPs, we demonstrated that etomidate did not change these parameters. We also investigated whether this drug could act in some way to nicotinic acetylcholine receptors labeled with  $\alpha$ -bungarotoxin-Alexa 594 (12  $\mu\text{M}$ ) and we observed that etomidate, can act in any way on the postsynaptic nicotinic receptors. In conclusion, the results presented here show that etomidate exerts a presynaptic at the neuromuscular junction, likely through activation channels for  $\text{Ca}^{2+}$  voltage dependent on the type P / Q, and that this drug can also act at the postsynaptic membrane interfering with the nicotinic acetylcholine receptors. These results may help to understand some of the clinical effects of this agent on neuromuscular function.

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1 - A Junção neuromuscular**

As sinapses são especializações encontradas nos contatos célula-célula onde os sinais são seguramente transmitidos de um neurônio para a sua célula-alvo de forma regulada. De acordo com a literatura, existem dois tipos de sinapses: a sinapse elétrica e a sinapse química (ZHAI & BELLEN, 2004).

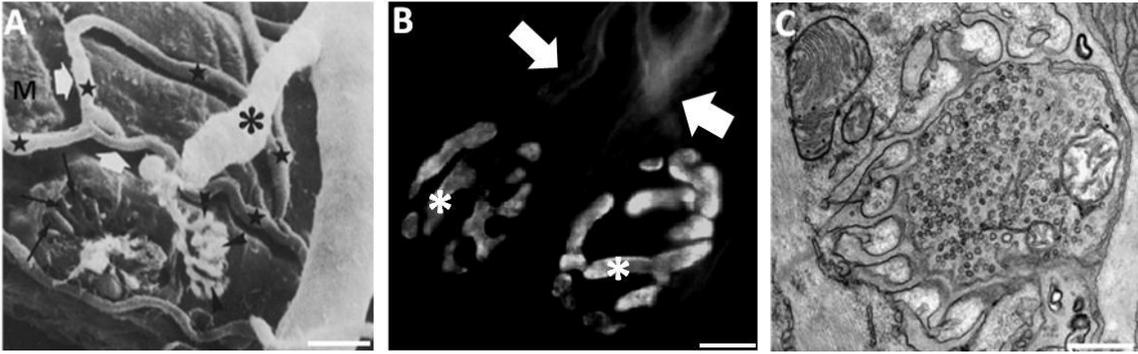
Em mamíferos, o tipo de sinapse mais abundante é a química, porém existe também uma forma mais simples chamada de sinapse elétrica, que se encontra em locais com especializações denominadas junções comunicantes. Estas junções formam canais, os quais permitem a passagem de íons de uma célula para a outra (BENNETT, 1997). Os componentes estruturais de canais de junções comunicantes no sistema nervoso são as proteínas conexinas e, como foi recentemente identificado, também por proteínas panexinas (MEIER & DERMIETZEL, 2006).

Nas sinapses químicas, o sinal elétrico resultante da propagação de correntes iônicas é convertido em um sinal químico, representado pela liberação de neurotransmissores que irão atuar sobre a célula alvo (KATZ, 1966; revisado por ZHAI & BELLEN, 2004).

Uma das sinapses químicas é a junção neuromuscular (JNM), que consiste em uma sinapse colinérgica cuja função é transferir impulsos de uma terminação motora de tamanho relativamente pequeno para uma fibra muscular ampla, para então desencadear os mecanismos que culminarão na contração muscular (KATZ, 1966).

A sinapse neuromuscular de camundongos possui aspecto circunscrito e formato “arborizado” (Figura 1A e Figura 1B) e é composta por três regiões distintas: o terminal neuronal pré-sináptico, contendo muitas vesículas sinápticas e mitocôndrias; a fenda sináptica e a membrana pós-sináptica da célula muscular, apresentando diversas dobras juncionais, nas cristas das quais se concentram aglomerados de receptores nicotínicos para a acetilcolina (ACh) (Figura 1C).

O elemento pré-sináptico corresponde à região distal do axônio motor formada por um conjunto de terminações nervosas não mielinizadas. Ao longo de todo o curso da terminação, é possível observar, no plano ultraestrutural, regiões de aspecto eletrondenso denominadas zonas ativas, que marcam os sítios subcelulares da transmissão sináptica. Cada zona ativa pode ser identificada pela associação com aglomerados de vesículas sinápticas pequenas de tamanhos de aproximadamente 50 nm de diâmetro que armazenam o neurotransmissor ACh em seu interior. Além das vesículas sinápticas pequenas eletrólucidas, a terminação pré-sináptica apresenta também vesículas eletrondensas que armazenam peptídeos envolvidos com a modulação da transmissão, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (revisado por HALL & SANES, 1993 e BURNS & AUGUSTINE, 1995).



**Figura 1: Junção Neuromuscular de camundongo.** (A) Micrografia eletrônica de varredura de junção neuromuscular de camundongo. Nota-se a presença de um terminal axonal (cabeças de setas) disposto de forma circular sobre uma célula muscular estriada esquelética (M), que apresenta na membrana pós-sináptica diversas dobras juncionais, nas cristas das quais concentram-se aglomerados de receptores para acetilcolina (setas pretas) (TORREJAIS *et al.*, 2002). Sob os terminais axonais existem áreas de contato sináptico como evidenciado em “C” (Barra de escala: 10  $\mu$ m). (B) Imagem de microscopia de fluorescência de junção neuromuscular de camundongo (Priscila Valadão). Observa-se o axônio mielinizado (setas) e o terminal pré-sináptico de aspecto circunscrito (asteriscos) (Barra de escala: 10  $\mu$ m). (C) Micrografia eletrônica de transmissão de uma junção neuromuscular de camundongo (Hermann A. Rodrigues). O componente pré-sináptico apresenta diversas vesículas sinápticas e algumas mitocôndrias. A célula muscular, pós-sináptica, apresenta em sua membrana dobras juncionais. Os elementos pré e pós-sinápticos são separados por uma estreita fenda sináptica (Barra de escala: 1  $\mu$ m).

É bem descrito na literatura que, para ocorrer a transmissão química, são necessários canais iônicos que permitirão, em um mecanismo orquestrado, a liberação do neurotransmissor. Desta forma, compondo o elemento pré-sináptico estão presentes canais para cálcio sensíveis à voltagem (CCSV), dispostos em fileiras e intimamente associados à zona ativa, e que se encontram bem próximos aos aglomerados vesiculares (HARLOW *et al.*, 2001). Esta disposição garante um rápido pico na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nos sítios de exocitose durante o disparo da liberação vesicular, conferindo sincronia ao processo (ROBITAILLE; ADLER; CHARLTON, 1990; revisado por ZHAI & BELLEN, 2004). Além disso, sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  age de forma orquestrada e estão intimamente relacionados à liberação dos neurotransmissores (KATZ & MILEDI, 1965).

A fenda sináptica é a região entre os elementos pré e pós-sinápticos, onde os neurotransmissores, no caso da JNM de mamíferos, a ACh, será lançado. Oposto à fenda sináptica encontra-se o elemento pós-sináptico constituído por receptores nicotínicos para a ACh. Estes receptores não estão uniformemente distribuídos pela membrana, pois formam agrupamentos no ápice das dobras da membrana pós-sináptica, atingindo nesses locais, uma densidade que pode chegar a mais de 10.000 por mm. Esse arranjo é de suma importância para transmissão nervosa, pois permite aos receptores detectar de forma rápida e eficiente a ACh liberada durante a exocitose (revisado por HALL, 1992 e HALL & SANES, 1993).

Mediante ao exposto, a JNM de mamíferos tem sido um dos modelos de sinapses mais bem estudados e melhor compreendidos pois possui dimensões amplas quando comparada as outras localizadas no SNC, bem como sua simplicidade estrutural e acessibilidade (KUMMER *et al.*, 2006). Além disso, trata-se de um modelo experimental que proporciona uma excelente integração entre o sistema nervoso e as células musculares fornecendo subsídios para o estudo das funções sinápticas (revisado por SANES & LICHTMAN, 2001).

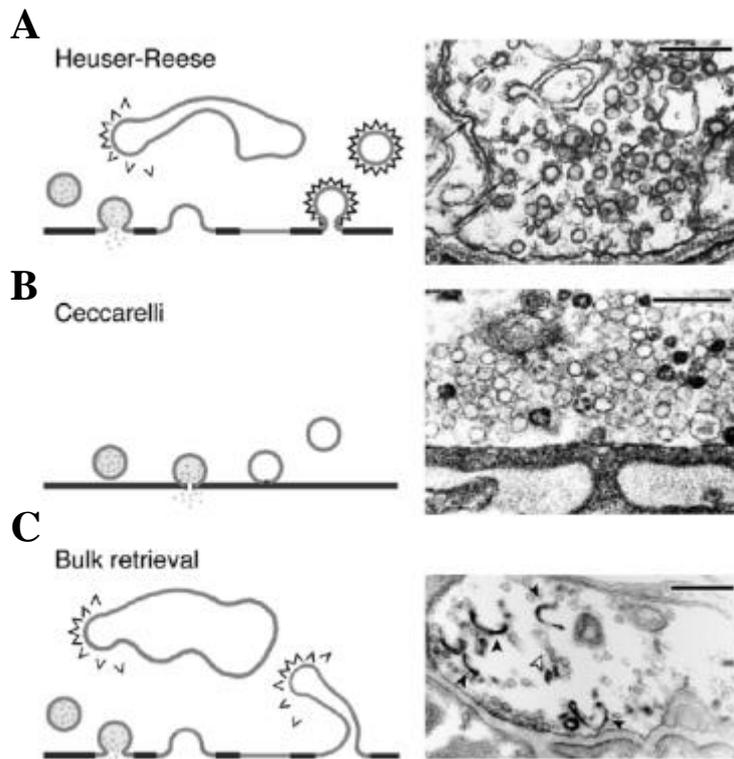
## 1.2 - O ciclo de vesículas sinápticas

Segundo Schweizer & Ryan (2006), para que transmissão sináptica ocorra, é preciso haver disponibilidade de vesículas sinápticas preenchidas com uma alta concentração de neurotransmissores. Os chamados neurotransmissores clássicos são sintetizados na própria terminação axonal, armazenados no interior de vesículas e liberados na fenda sináptica, próximo aos seus receptores (KATZ, 1966). No caso da JNM, seu neurotransmissor, a ACh, é sintetizada no terminal pré-sináptico por uma enzima denominada colina acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e do acetil-CoA. Após sua síntese, a ACh é armazenada no interior das vesículas através do seu transportador vesicular, o VAChT, uma proteína com 12 domínios transmembrana que para transportar ACh, utiliza um gradiente eletroquímico gerado por bombas de prótons presentes na membrana vesicular, as  $VH^{+-}ATPases$  (NGUYEN *et al.*, 1998; revisado por PRADO *et al.*, 2002 e BRAVO & PARSONS, 2002).

Outro fator importante a ser considerado é a organização das vesículas presentes na JNM. Sabe-se que existem três agrupamentos de vesículas, os chamados *pools* ou aglomerados vesiculares: O primeiro é o aglomerado de liberação rápida ou prontamente liberável (Ready Releasable Pool), que como o nome indica, é um grupo de vesículas disponíveis para exocitose imediata e liberação rápida e, geralmente, suas vesículas estão ancoradas na zona ativa preparadas para a liberação. O segundo agrupamento chama-se aglomerado de reciclagem (Recycling Pool), responsável por manter a liberação de neurotransmissores em estimulação fisiológica moderada. Já o terceiro agrupamento, é o aglomerado de reserva (Reserve Pool), que atua como um depósito de vesículas sinápticas cuja liberação ocorre mediante intensa estimulação (revisado por RIZZOLI & BETZ, 2005).

De uma maneira geral, a neurotransmissão inicia-se quando um potencial de ação dispara a liberação de neurotransmissores a partir de um terminal nervoso pré-sináptico. Um potencial de ação induz a abertura de CCSV e o aumento transiente da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  estimula a exocitose de vesículas sinápticas (KATZ, 1966). Após a exocitose, novas vesículas sinápticas são formadas por endocitose compensatória, são recicladas e preenchidas com neurotransmissores para permitir um

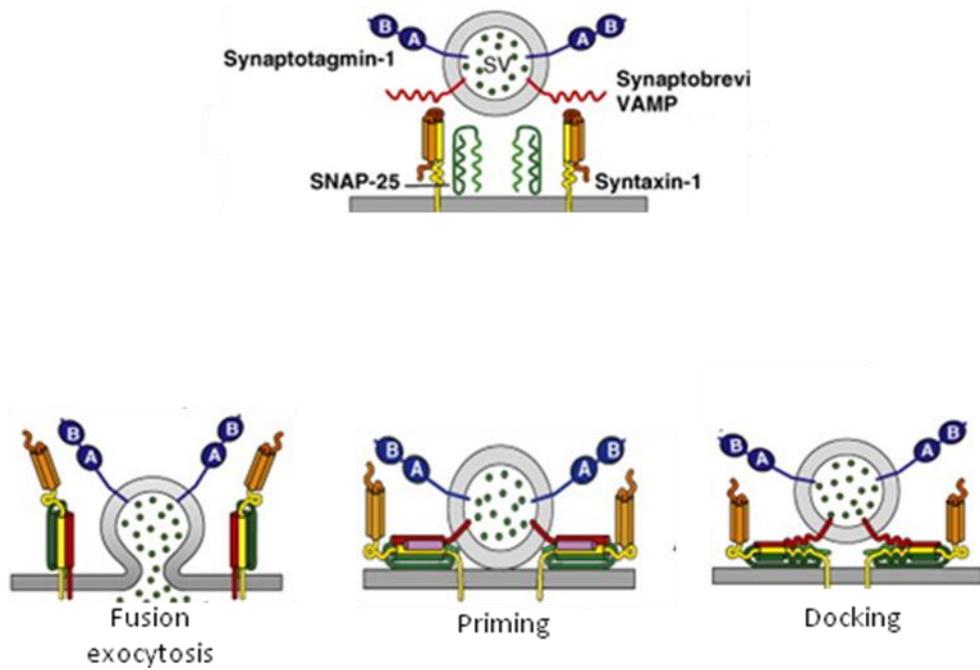
novo ciclo. É descrito que as vesículas sofrem endocitose e reciclagem por uma de três vias alternativas (Figura 2): (a) endocitose mediada por capa de clatrina (HEUSE & REESE, 1973; RICHARDS *et al.*, 2000); (b) endocitose por meio de amplas invaginações de membrana e formação de cisternas (TAKEI *et al.*, 1996; RICHARDS *et al.*, 2001); (c) endocitose designada como “Kiss and Run” na qual vesículas liberam seu conteúdo sem se integrarem completamente à membrana pré-sináptica, sendo localmente reacidificadas e novamente preenchidas com neurotransmissores (CECCARELLI, *et al.*, 1973; PYLE *et al.*, 2000; GANDHI & STEVENS, 2003).



**Figura 2: Três modelos para endocitose de vesículas sinápticas.** (A) Endocitose mediada por capa de clatrina. Modelo proposto por Heuser & Reese no qual as vesículas sinápticas são completamente integradas à membrana da zona ativa durante a exocitose e são recicladas por meio de endocitose mediada por capa de clatrina. Micrografia eletrônica (à direita) demonstrando a presença de depressões de membrana e vesículas cobertas por capa de clatrina (setas) em terminação motora submetida a estímulo elétrico. É possível observar também a presença de cisternas "c". (B) Modelo de *kiss and run* (à esquerda) proposto por Ceccarelli no qual, durante a liberação de neurotransmissores, as vesículas abrem um poro de fusão transitório, mas não se fundem completamente a membrana pré-sináptica, sendo recicladas localmente. Micrografia eletrônica (à direita) de terminação motora submetida a estímulo elétrico de baixa frequência por duas horas. Destaca-se a ausência de vesículas cobertas por capa de clatrina e de cisternas. (C) Diagrama representando endocitose via grandes invaginações de membrana (à esquerda) após liberação vesicular. Micrografia eletrônica (à direita) indicando invaginações de membrana contendo FM1-43 fotoconvertido (setas negras) ou desprovidas do marcador (seta clara) (TAKEI *et al.*, 1996, RICHARDS *et al.*, 2001) (revisado por ROYLE & LAGNADO, 2003).

Todos estes passos do ciclo das vesículas sinápticas só são possíveis graças a interações proteicas, e entre elas, é fundamental a participação do complexo SNARE e da sinaptotagmina I. Para a exocitose de vesículas sinápticas as proteínas SNAREs mais relevantes são: i) a sinaptobrevina/VAMP, localizada na membrana da vesícula e também chamada de v-SNARE (*vesicular SNARE*); ii) syntaxina e SNAP-25, situadas na membrana plasmática do terminal pré-sináptico e por esta razão chamadas de t-SNARE (*target SNARE*) (Figura 3) (SÖLLNER *et al.*, 1993). A fusão de membranas que possibilita a liberação dos neurotransmissores é regida pelo entrelaçamento progressivo entre SNAREs de vesícula e de membrana do terminal. A sinaptotagmina I é uma proteína integral da membrana da vesícula sináptica que funciona como um sensor de  $Ca^{2+}$ , ligando-se a este íon, bem como às proteínas SNAREs e aos fosfolípidos da membrana plasmática (MURTHY & DE CAMILLI, 2003; CHAPMAN, 2008). Além destas proteínas supracitadas, outras proteínas acessórias são também necessárias para acelerar, aperfeiçoar e permitir o processo de fusão de vesículas sinápticas (RIZO & SUDHOF, 2002).

Após a exocitose e liberação do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorre a ativação dos receptores nicotínicos presentes na membrana pós-sináptica. Posteriormente, a ACh é então hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, convertendo o neurotransmissor em moléculas de colina e acetato. A colina é recaptada para o interior do terminal por meio de seu transportador de membrana de alta afinidade (CHT1) e será utilizada para a síntese de nova ACh, iniciando desta forma, um novo ciclo (revisado por RIBEIRO *et al.*, 2006).



**Figura 3. Principais etapas do ciclo de vesículas sinápticas.** Após a despolarização, ocorre a abertura de CSSV, assim íons  $\text{Ca}^{2+}$  penetram no terminal pré-sináptico, levando a um aumento da concentração intraterminal deste cátion. Vesículas sinápticas contendo neurotransmissores se acumulam nas adjacências das zonas ativas, sítios subcelulares da liberação vesicular. As vesículas que se ancoram na zona ativa (docking) sofrem uma reação de amadurecimento (priming) que as tornam competentes para a abertura de um poro de fusão (fusion) e exocitose dos neurotransmissores. (Modificado de PANG and SUDHOF. *Cell biology of  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered exocytosis*. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 22, Issue 4, August 2010, Pages 496–505.

### 1.3-Anestésicos

Os anestésicos podem ser conceituados como substâncias que têm a capacidade de tornar o paciente inconsciente e insensível à dor. Por apresentar estas características, esses fármacos foram responsáveis por enormes avanços nas técnicas cirúrgicas. A utilização de anestésicos para fins cirúrgicos tiveram seus primeiros registros em 1840 quando Crawford Long utilizou pela primeira vez éter para realizar procedimentos cirúrgicos (FRANKS, 2006).

Dentre os anestésicos, existem os denominados anestésicos gerais, que promovem inconsciência, analgesia e relaxamento muscular, o que facilita a realização de intervenções cirúrgicas. Os anestésicos gerais podem ser agrupados em: i) inalatórios como o halotano, isoflurano e sevoflurano; ii) intravenosos como o tiopental, etomidato e propofol; iii) gases inorgânicos como o óxido nitroso e xenônio (FRANKS, 2006). Desta forma, por exibir diversidade química extraordinária, que vai desde simples gases inertes quimicamente a barbitúricos complexos, os mecanismos celulares e moleculares de ação destas drogas não foram completamente elucidados.

Meyer e Overton foram os primeiros a propor um mecanismo molecular de ação dos anestésicos, através da formulação da “hipótese lipídica”, que foi aceita por mais de 60 anos. De acordo com a mesma, o mecanismo de ação dos anestésicos relaciona-se intimamente com a propriedade destes agentes de se dissolverem na bicamada lipídica, causando mudanças críticas nas propriedades físico-químicas da membrana celular (MILLER *et al.* , 1961; POHORILLE *et al.*, 1998).

Posteriormente, Franks e Lieb (1984), propuseram outra hipótese de ação dos anestésicos. Realizando estudos pioneiros, estes pesquisadores observaram que vários anestésicos modulavam a atividade da proteína luciferase do pirilampo (vaga-lume), sugerindo que os anestésicos se ligariam a um domínio hidrofóbico desta proteína inibindo sua função de emissão de luz (FRANKS & LIEB, 1984). Estes dados levaram à conclusão de que, ao invés de interagir com a bicamada lipídica, os anestésicos gerais atuariam diretamente nas proteínas da membrana celular. Essa hipótese foi reforçada através da descoberta de que estereoisômeros de anestésicos, igualmente solúveis em lipídios, poderiam atuar de uma forma particular e induzir diferentes graus de anestesia

(FRANKS & LIEB, 1991; HARRIS *et al.* , 1992; revisto por FRANKS, 2006). Por conseguinte, sugeriu-se que provavelmente ocorreria uma ligação destes agentes a domínios específicos das proteínas de membrana, especialmente canais proteicos (FRANKS & LIEB, 1994).

Todas estas hipóteses surgiram na tentativa de explicar como compostos tão diversos podem produzir o mesmo efeito global. Similarmente, estudos recentes demonstram que diferentes classes de anestésicos gerais atuam por vias diferentes, em distintos alvos e enfatizam a existência de múltiplos sítios e mecanismos de ação destas drogas (SOLT & FORMAN, 2007).

#### **1.4- Anestésicos intravenosos**

A anestesia intravenosa expandiu por todo o mundo a partir da introdução do hexabarbital por Hemult Wesse e do tiopental por Jonh Lundy. Desde então houve avanços no uso deste método anestésico, sendo considerado hoje em dia, o método mais comum utilizado para indução da anestesia geral em procedimentos cirúrgicos (JARMAN, 1946).

Os anestésicos intravenosos são lipossolúveis e se ligam reversivelmente a proteínas plasmáticas, em especial à albumina (ALLOMEN; ZIEGLER; WATERKEYN, 1981). A importância farmacocinética da ligação proteica resulta do fato de que somente a fração livre é capaz de se difundir através de membranas biológicas e, conseqüentemente, se distribuir pelo organismo e alcançar os receptores onde deve exercer sua atividade farmacológica (WOOD, 1986).

A maioria dos anestésicos intravenosos exerce sua ação farmacológica sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) principalmente através dos receptores para o ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $GABA_A$ ), porém nenhum deles, com a exceção da cetamina, promove efeito analgésico (DUARTE, 1994). Em relação à sua distribuição, que é definida como a passagem do fármaco da corrente sanguínea para os tecidos, estes agentes são considerados como tendo alta taxa de distribuição. Já a biotransformação destes anestésicos ocorre na maioria das vezes por oxidação, e o fígado é o principal local onde ocorre este processo (WHITE, 1988).

Atualmente os anestésicos intravenosos representam uma ampla classe de medicamentos (FRANKS, 2006). No grupo destes agentes encontramos os agentes tiopental, cetamina, , midazolam, propofol e etomidato (DUARTE. 1994).

O tiopental foi introduzido na clínica em 1934 e tem sido utilizado como agente de indução, sendo que seu efeito é classificado como de ultra curta duração e não recomenda-se seu uso prolongado (WHITE, 1990).

A cetamina foi inicialmente utilizada para fins clínicos em 1965. Este anestésico é utilizado como hipnótico e diferente dos demais intravenosos, possui efeito analgésico. Ela é classificada como um anestésico dissociativo (WHITE, 1982) e seu mecanismo de ação tem sido atribuído a sua interferência nos níveis de monoaminas cerebrais (GILSSON; EL-ETR; BLOOR, 1976), ao bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios (TAKEYASU; HARADA; OKAMURA, 1990), e à estimulação de receptores opióides (SMITH; WESTFALL ; ADAMS, 1980).

O midazolam é uma droga solúvel em água, com ação ansiolítica e anticonvulsivante. Ele tem efeitos tais como hipnose, sedação, amnésia, relaxamento muscular, possui baixa toxicidade e não altera a frequência cardíaca, porém não pode ser usado sozinho para anestesia (BIENZLE & BOYD, 1992). Além disso, comporta-se como todos os benzodiazepínicos quanto aos seus efeitos sobre os receptores gabaérgicos, pois atuam como inibidores no SNC (ZAKKO; SEIFERT ; GROSS, 1999).

O propofol foi introduzido na prática clínica em 1977 para uso exclusivo em anestesia como agente indutor por via venosa (BRAY, 2002). É uma droga que apresenta curta duração de ação possibilitando o uso em infusão contínua e com poucos efeitos colaterais (GLEN, 1980; GLEN & HUNTER, 1984). Apresenta efeito sedativo, hipnótico e amnésico que são atribuídos à interação do propofol com o sítio alostérico do receptor GABA<sub>A</sub>, o que potencializa correntes evocadas por baixas concentrações de GABA, aumentando a eficácia do agonista. Em concentrações maiores, o propofol é capaz de abrir diretamente o canal do receptor GABA permitindo a entrada de Cl<sup>-</sup> na ausência de GABA (CONCAS *et al.* , 1991; ORSER *et al.*, 1994). É importante ressaltar que este agente também está relacionado à inibição da liberação de glutamato através de mecanismos pré-sinápticos (RATNAKUMARI & HEMMINGS, 1997).

### 1.5- O anestésico etomidato

O etomidato é um anestésico intravenoso utilizado com o intuito de causar efeito anestésico de curta duração e baixo risco cardiovascular, sendo, portanto menos provável causar uma queda significativa na pressão arterial quando comparado aos outros agentes de indução. Além disso, a dose letal é cerca de 30 vezes maior do que a dose terapêutica, tornando-o um agente extremamente seguro (ZED; MABASA.; SLAVIK, 2006).

Este anestésico está incluído no Grupo 1 dos anestésicos gerais e os efeitos causados por agentes pertencentes a este grupo são mediados por receptores GABA<sub>A</sub>, aumentando por exemplo, a atividade destes receptores, levando assim à diminuição da excitabilidade neuronal (SOLT & FORMAN, 2007).

O etomidato foi introduzido na prática clínica em 1972 (MORGAN *et al.*, 1975). Como se tratava de um agente novo, as publicações acadêmicas sobre os efeitos do anestésico cresceram continuamente até o ano de 1983. A partir desta data, e do conhecimento adquirido até aquele momento, o número de publicações enfocando o etomidato praticamente dobrou e este aumento deveu-se à descoberta da toxicidade adrenal que o anestésico produzia quando administrado em infusões contínuas. Após este período, o número de trabalhos publicados enfocando o etomidato sofreu declínio, bem como a sua utilização em salas de cirurgia (FORMAM, 2011).

A partir do ano 2000, o interesse neste anestésico tem sido renovado, o que pode ser reflexo da sua utilização como um agente de indução anestésica. Este interesse em publicações sobre o etomidato também se deve ao progresso científico na compreensão da farmacologia molecular deste anestésico (FORMAM, 2011).

O etomidato possui pKa de 4,2 e é muito hidrofóbico ao pH fisiológico, desta forma, para aumentar sua solubilidade, ele é formulado como uma solução de 0,2% em um solvente, que pode ser propilenoglicol 35% (amidato; Hospira, Inc., Lake Forest, Illinois, EUA) ou em emulsão lipídica (etomidato-Lipuro; B. Braun, Melsungen, Alemanha) (DOENICKE *et al.*, 1997).

Experimentos pré-clínicos em mamíferos demonstraram que a injeção do etomidato foi associado com o mínimo de alterações hemodinâmicas ou depressão respiratória,

características que são importantes para traçar seu perfil de segurança excepcionalmente favorável (JANSSEN; NIEMEGEREERS.; MARSBOOM, 1975).

Devido aos seus efeitos hemodinâmicos notavelmente benignos, o etomidato tem se tornado uma ferramenta útil para a indução da anestesia geral em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e naqueles com função cardíaca deficiente (BOVILL , 2006).

O etomidato, assim como qualquer fármaco possui efeitos secundários desfavoráveis , incluindo a dor durante a injeção e os movimentos mioclônicos durante a indução da anestesia geral (KAY & ROLLY, 1977). A dor durante a injeção foi exacerbada quando o anestésico foi preparado em soluções aquosas, em comparação com a formulação em 35% propilenoglicol (ZACHARIAS *et al.*, 1978). Formulação em meio contendo lipídios ou ciclodextrinas parece diminuir ainda mais a incidência de dor (NYMAN *et al.*, 2006). Outro efeito adverso do etomidato são as mioclônias, e tem sido demonstrado que este fenômeno aumenta com a dose do anestésico (DOENICKE *et al.*, 1999).

### **1.6- Efeitos do etomidato no SNC**

Ao ser disponibilizado para uso na prática clínica, observou-se que o etomidato possuía efeitos semelhantes ao neurotransmissor GABA no SNC, ou seja, o etomidato teria propriedades inibitórias (EVANS & HILL, 1978). Assim, com o passar dos anos e o estudo mais detalhado deste anestésico, sabe-se hoje, que o mecanismo pelo qual o etomidato exerce seus efeitos anestésicos é pela ação sobre os receptores GABA<sub>A</sub> (CARLSON *et al.*,1998).

Tem sido descrito que o etomidato atua exercendo dois efeitos sobre os receptores GABA<sub>A</sub>. Em concentrações clinicamente relevantes (1 a 8 µM), o etomidato modula a ativação do receptor. Em outras palavras, quando etomidato está presente, receptores GABA<sub>A</sub> são ativados por concentrações mais baixas de GABA do que o exigido em condições normais (GIESE & STANLEY, 1983; YANG & UCHIDA, 1996 ; BELELLI *et al.*,1999 ). Por outro lado, em concentrações supra-clínicas, o etomidato pode atuar diretamente nos canais de receptores GABA<sub>A</sub> ativando-os na ausência do neurotransmissor GABA, caracterizando uma ação direta conhecida também como efeito GABA-mimético ou agonismo alostérico (RUSCH *et al.* , 2004; YANG , 1996).

Sabe-se também que anestésicos intravenosos, como o etomidato e propofol, são capazes de suprimir a atividade neuronal por meio de potencialização de receptores GABA<sub>A</sub>. No entanto, alguns estudos sugerem que os anestésicos intravenosos inibem a liberação de neurotransmissores agindo sobre um ou mais mecanismos pré-sinápticos (RATNAKUMARI & HEMMINGS, 1997; BUGGY *et al.*, 2000; WESTPHALEN & HEMMINGS, 2003). Além disso, evidências recentes mostram que estes anestésicos atuam tanto em alvos pré-sinápticos, quanto em alvos pós-sinápticos (FRANKS, 2006).

Apesar da literatura ainda não ser extensa, alguns trabalhos já apontam a possibilidade de que os anestésicos intravenosos sejam capazes de inibir a liberação de glutamato pré-sináptico (KENDALL & MINCHIN, 1982; BUGGY *et al.*, 2000 ; WESTPHALEN & HEMMINGS, 2003). Por exemplo, concentrações clinicamente relevantes do anestésico intravenoso propofol inibiram de uma forma dose-dependente, a liberação de glutamato evocada por 4-aminopiridina (4-AP) em sinaptosomas cerebrocorticais de ratos (WESTPHALEN & HEMMINGS, 2003). Embora estes dados sugiram um sitio pré-sináptico de ação para um tipo de anestésico intravenoso, os alvos pré-sinápticos destas substâncias não são totalmente conhecidos.

Herring e cols., (2011), demonstraram que concentrações clinicamente relevantes dos anestésicos intravenosos etomidato e propofol inibem a liberação do neurotransmissor glutamato em cultura de células PC12, em neurônios do hipocampo e em células cromafins. Os resultados encontrados por este grupo sugerem ainda que tanto o etomidato quanto o propofol, inibem a liberação de neurotransmissores por uma interação direta com proteínas SNARES e/ou com proteínas que estejam associadas à SNARE, mas o fazem em diferentes locais.

Percebe-se assim que os conhecimentos acerca de como os anestésicos intravenosos influenciam a liberação de neurotransmissores vem despertando cada vez mais o interesse da comunidade científica, porém poucos estudos têm sido voltados para elucidar os efeitos destes anestésicos em sinapses neuromusculares. Desta forma, com o intuito de investigar estes efeitos, o nosso grupo de pesquisa realizou um estudo no qual observou-se que o anestésico intravenoso propofol atua de uma maneira dose-dependente em sinapses motoras. Em baixas concentrações (10  $\mu$ M – 25  $\mu$ M), este agente induziu a exocitose de vesículas sinápticas de uma maneira independente de Na<sup>+</sup>. Por outro lado, concentrações mais elevadas de propofol (50, 100 e 200  $\mu$ M), inibiram

a excitose induzida pelo agente despolarizante 4-AP, que induz, indiretamente, a abertura de canais para  $\text{Na}^+$ . Estes dados sugerem então, que altas concentrações de propofol bloqueiam canais para  $\text{Na}^+$ , evitando a onda de despolarização do neurônio que levaria a abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  e a excitose de vesículas sinápticas (LEITE *et al.*, 2011). Porém os estudos sobre os possíveis efeitos de outros anestésicos intravenosos como o etomidato nas sinapses neuromusculares ainda não foram realizados.

## **2 – OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos pré-sinápticos do anestésico venoso etomidato na transmissão sináptica neuromuscular de camundongos

### **Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar o efeito do anestésico venoso etomidato na exocitose espontânea de vesículas sinápticas.
- 2) Investigar a participação do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  no efeito do etomidato na exocitose de vesículas sinápticas.
- 3) Avaliar os efeitos do etomidato nos potenciais em miniatura da placa motora (MEEPs).

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Soluções

##### -Solução Ringer

Composição: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4.

##### - Solução Ringer modificada (sem Ca<sup>+2</sup>)

Composição: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4.

##### - Solução Ringer Alto Potássio (60 mM):

Composição: 80 mM NaCl, 60 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4.

#### 3.2- Reagentes e toxinas:

- Toxina d-tubocurarine (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- $\alpha$ -bungarotoxina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA);
- FM1-43 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA);
- 4-aminopiridina (4AP) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- Tetrodotoxina (TTX) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- $\omega$ -Agatoxina IVA (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- $\omega$ -Conotoxina MVIIC (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- EGTA (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA),
- Propilenoglicol (Laboratório Cristália -São Paulo);
- Etomidato (2 mg/ml) (Laboratório Cristália -São Paulo).

### 3.3- Animais

Neste estudo utilizamos camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* com idade média de 7 semanas. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBio) da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 3.4– Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas utilizando o marcador fluorescente FM1-43

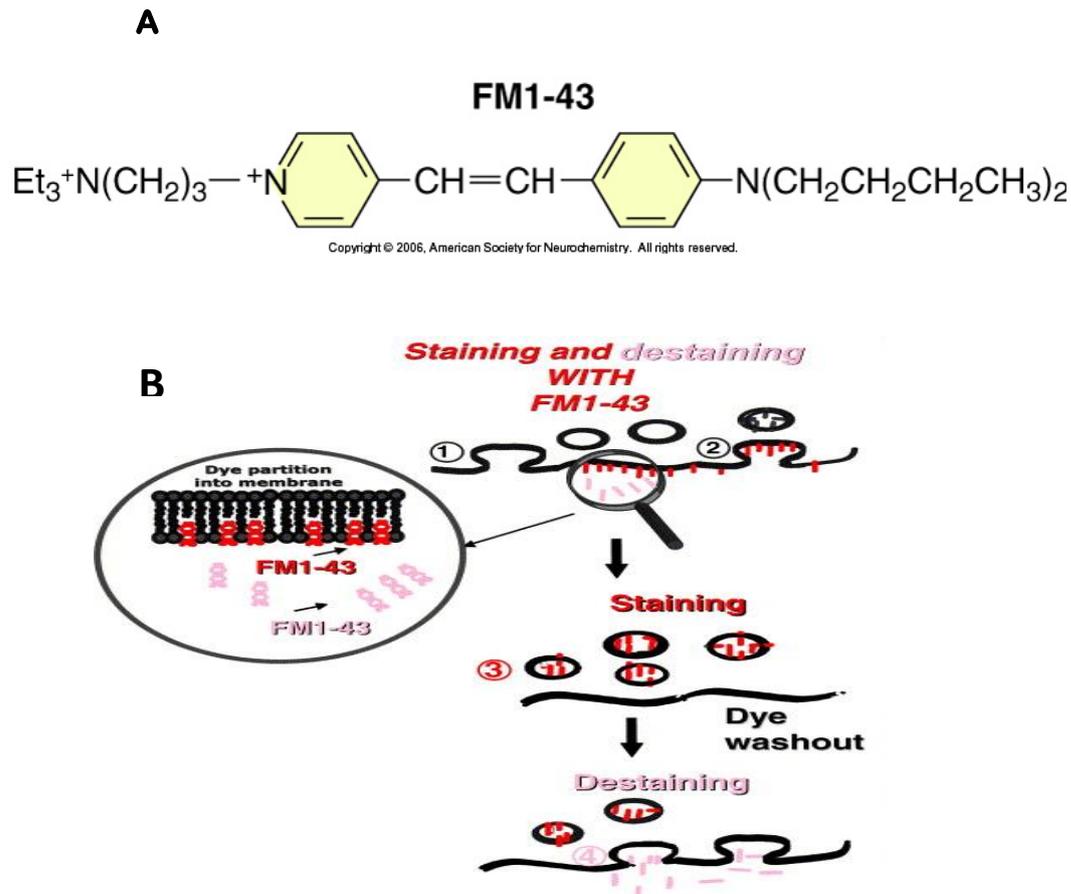
Os passos do ciclo sináptico como exocitose e endocitose podem ser monitorados utilizando sondas fluorescentes vitais captadas durante a endocitose e liberadas durante a exocitose (LICHTMAN *et al.*, 1985; BETZ; MAO.; BEWICK, 1992; RIBCHESTER; MAO.; BETZ, 1994).

O desenvolvimento destas sondas que marcam vesículas sinápticas foi um passo fundamental para melhor compreensão dos estudos sobre a reciclagem destas estruturas, pois permitem a visualização e investigação de um mecanismo neuronal que por muito tempo vinha sendo inacessível (COUSIN & ROBINSON, 1999).

Entre as sondas disponíveis estão as do tipo FM, como o FM1-43, que são moléculas anfipáticas, possuindo cauda lipofílica ligada a uma cabeça carregada positivamente via ligações duplas. Esta cabeça carregada positivamente impede o marcador de atravessar livremente as membranas celulares, mantendo-o preso no interior de endossomas ou vesículas. Por sua vez, o comprimento da cauda lipofílica determina a afinidade da molécula por membranas biológicas. Finalmente, o número de duplas ligações unindo a cabeça à cauda determina as propriedades espectrais da sonda. Por exemplo, o FM1-43 tem uma dupla ligação (Figura 4A) e pode ser excitado no espectro da fluoresceína enquanto o FM4-64 apresenta 3 ligações duplas entre cabeça e cauda, sendo excitado no espectro da rodamina (BETZ, *et al.*, 1996; BRUMBACK *et al.*, 2004). Assim, estas sondas originalmente produzidas por Fei Mao, têm sido utilizadas para marcar e então monitorar vesículas sinápticas, grânulos secretórios e outras estruturas endocíticas em uma variedade de preparações vivas. (GAFFIELD & BETZ, 2006).

Marcadores do tipo FM apresentam três propriedades que os tornam úteis para estudo do tráfego de vesículas: (1) se ligam reversivelmente à membrana celular. Desta forma, quando a sonda é aplicada à preparação, toda superfície de membrana exposta ao meio contendo FM torna-se marcada. Quando a preparação é lavada em meio desprovido de FM, as moléculas do marcador são removidas da superfície celular. (2) Moléculas de FM marcam seletivamente o folheto externo da bicamada lipídica. Isto possibilita que as vesículas em reciclagem nos sítios de endocitose capturem o marcador e o mantenham aprisionado em seu interior. Além disso, as moléculas de FM estão permanentemente carregadas (cabeça com valência +2), impedindo que elas se difundam através das membranas e se tornem livres no citoplasma. (3) Sondas do tipo FM são menos fluorescentes quando estão em ambiente aquoso, mas sua fluorescência aumenta aproximadamente 350 vezes quando estão agregadas ao ambiente hidrofóbico das membranas (BETZ *et al.*, 1996; BRUMBACK *et al.*, 2004). Portanto, em meio contendo FM1-43, após fusão e incorporação da membrana das vesículas à membrana da zona ativa durante a exocitose, a endocitose compensatória promoverá reciclagem dos grupos vesiculares com membrana marcada com FM de modo que as vesículas recicladas apresentarão o marcador aprisionado em seu interior e aderido a sua membrana (Figura 4B, passo 1 e 2). Isto possibilitará a visualização de aglomerados vesiculares marcados com a sonda em microscópio de fluorescência sob a forma de pontos fluorescentes (Figura 4B, passo 3).

O excesso de FM ligado à membrana das células musculares ou à mielina dos nervos será removido durante lavagem da preparação em meio desprovido do marcador. Caso a preparação seja estimulada por algum agente que desencadeie exocitose, como estímulo elétrico, ocorrerá uma nova etapa de liberação de neurotransmissores e exposição da sonda ao meio aquoso, possibilitando difusão do FM1-43 para a solução salina na qual se encontra a preparação. Isso determinará redução do sinal fluorescente e desmarcação dos pontos que representavam os aglomerados vesiculares que continham o marcador (Figura 4B, passo 4).



**Figura 4. O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em neurônios.** (A) Estrutura da sonda fluorescente FM1-43 (*Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by Siegel et al., 2006*). (B) 1 e 2. Marcação da membrana do terminal pré-sináptico com o FM1-43 adicionado à solução salina. O neurônio foi estimulado elétricamente na presença de FM1-43. Observe no detalhe em aumento maior que a sonda quando em meio externo é invisível devido ao seu baixo rendimento quântico, porém aderida à membrana ela pode ser visualizada. Notar que a membrana que originou uma nova vesícula sináptica está marcada com a sonda. 3. Uma breve lavagem remove as moléculas de FM que não foram internalizadas. 4. Um segundo ciclo de exocitose induzido por estímulo elétrico resulta na liberação da sonda que foi internalizada durante a endocitose. (*Modificado de GUATIMOSIM and VON GERSDORFF. Optical monitoring of synaptic vesicle trafficking in ribbon synapses. Neurochemistry International Volume 41, Issue 5, November 2002, Pages 307–312*).

### **3. 5– Marcação e desmarcação de vesículas sinápticas com FM1-43**

O músculo diafragma associado ao fragmento de nervo responsável por sua inervação foi retirado e dissecado e posteriormente seccionado em dois hemidiafragmas. Os conjuntos nervo-músculo resultantes foram montados em placas cobertas por gel de silicone Sylgard® e fixados com alfinetes entomológicos. As preparações foram banhadas em solução Ringer aerada com uma mistura de 5%CO<sub>2</sub>/ 95%O<sub>2</sub> por um sistema de perfusão contínua. As preparações neuromusculares foram então marcadas com a sonda vital FM 1-43 (4 µM), em solução Ringer contendo alta concentração de potássio (60 mM KCl), durante 10 minutos, para marcar o aglomerado de vesículas sinápticas sujeito à reciclagem . Após a estimulação, a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos para garantir a captação máxima de FM1-43 durante endocitose compensatória. O excesso de FM1-43 aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular foi removido durante um período de lavagem da preparação em Ringer sem o marcador por no mínimo 20 minutos, permitindo melhor visualização dos agrupamentos vesiculares contendo FM1-43 nas terminações axonais. Após a lavagem do excesso de sonda, as vesículas endocitadas podiam ser desmarcadas através de uma segunda etapa de estimulação (Betz & Bewick, 1992). As preparações foram incubadas na presença de d-tubocurarina (16 µM) para evitar contrações musculares durante a estimulação, desmarcação ou a aquisição de imagens.

#### **3.5- Exposição das preparações ao anestésico etomidato e às neurotoxinas**

As preparações nervo-músculo marcadas com o FM1-43 foram submetidas ao anestésico nas concentrações de 0.1 µM, 1 µM, 2 µM, 8 µM, 10 µM, e 40 µM (HERRING, 2011) com a finalidade de obter a curva-dose resposta. A concentração utilizada neste estudo foi a clinicamente relevante (1 µM) (HERRING, 2011).

Para a exposição às neurotoxinas (Omega-Agatoxina IVA, Tetrodotoxina e Omega-Conotoxina MVIIC), foi utilizado o mesmo protocolo de marcação, diferindo apenas na etapa de desmarcação, pois após incubar o hemidiafragma com a neurotoxina em teste, a etapa de desmarcação foi realizada na presença do etomidato e da neurotoxina.

### 3.6- Marcação dos terminais pós-sinápticos com $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BGT)

Nesta etapa, utilizamos o mesmo protocolo de dissecação, as mesmas soluções e os mesmos equipamentos utilizados anteriormente para marcação com FM1-43.

Para realizar estes experimentos, um hemidiafragma foi tratado com  $\alpha$ -BGT (12  $\mu$ M) conjugada com Alexa Fluor 594 por 7 minutos. No outro hemidiafragma realizamos o mesmo tratamento, porém na presença de etomidato na concentração de 1  $\mu$ M. Ambos os tratamentos foram realizados a temperatura ambiente (24°C). Após a marcação, as preparações foram levadas ao microscópio de fluorescência para registro das imagens.

### 3.7- Aquisição de imagens

As imagens obtidas dos terminais nervosos marcados com FM1-43 foram obtidas por meio de um microscópio de fluorescência (Leica DM 2500<sup>®</sup>) acoplado a uma câmera de CCD Micromax refrigerada (-20°C) utilizando-se objetivas de imersão em água (40x com abertura numérica de 0,75 ou 63x com abertura numérica de 0,95). As imagens coletadas pela câmera foram processadas e visualizadas em microcomputador utilizando-se o programa Axon Image Workbench. A luz utilizada para iluminar a preparação foi emitida por uma lâmpada de mercúrio que passa por filtros de 505/530 nm para seleção do espectro da fluoresceína, adequado à excitação do marcador FM1-43 e para seleção do espectro da rodamina para os experimentos utilizando  $\alpha$ -BGT. Todas as variáveis de ajuste da imagem como, por exemplo, tempo de exposição e *binning* foram mantidas constantes.

### 3.8- Análise de imagens

A análise das imagens e a mensuração dos níveis de fluorescência foram realizadas utilizando-se os programas Image J e Microsoft Excel. Os dados obtidos foram normalizados percentualmente e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prism 4. A análise estatística foi realizada pela aplicação do teste *t-student* pareado. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ .

### **3.9.- Medidas da liberação espontânea (MEEPs)**

Os registros eletrofisiológicos foram feitos no músculo diafragma de camundongo. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (24°C). O músculo foi fixado em uma câmara de acrílico contendo 5 ml de solução Ringer aerada com uma mistura de 5%CO<sub>2</sub>/ 95%O<sub>2</sub> por um sistema de perfusão contínua.

A técnica de gravação intracelular foi usada para gravar os MEEPs com um amplificador Axoclamp- 2A (Axon Instruments- Fernsehen ). As gravações foram filtradas (0,1Hz a 10 KHz) e amplificadas 100X antes da digitalização e aquisição em um computador de execução WinEDR (Jonh Dempster, da Universidade de Strathclyde). Os microeletrodos foram fabricados com capilares de borossilicato e tinham resistências de 5-15 MOhm quando preenchidos com KCl 3 M. O potencial de membrana foi também registrado e utilizado para corrigir as amplitudes e áreas a um potencial de repouso padrão de - 80 mV utilizando o método de Katz e Thesleff (1957). Concentrações de Etomidato (1, 8, 10 e 40 µM) e propilenoglicol (1 e 8 µM) foram adicionadas diretamente ao banho.

#### **3.7.3- Análise estatística**

Os dados obtidos foram normalizados percentualmente e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prism 4. A análise estatística foi realizada pela aplicação do teste *t-student* pareado. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ .

Todos os experimentos de eletrofisiologia foram realizados no laboratório de fisiologia da célula no departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), com o auxílio da Professora Doutora Lígia Naves Araújo.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 – Efeito do etomidato na exocitose espontânea de vesículas sinápticas

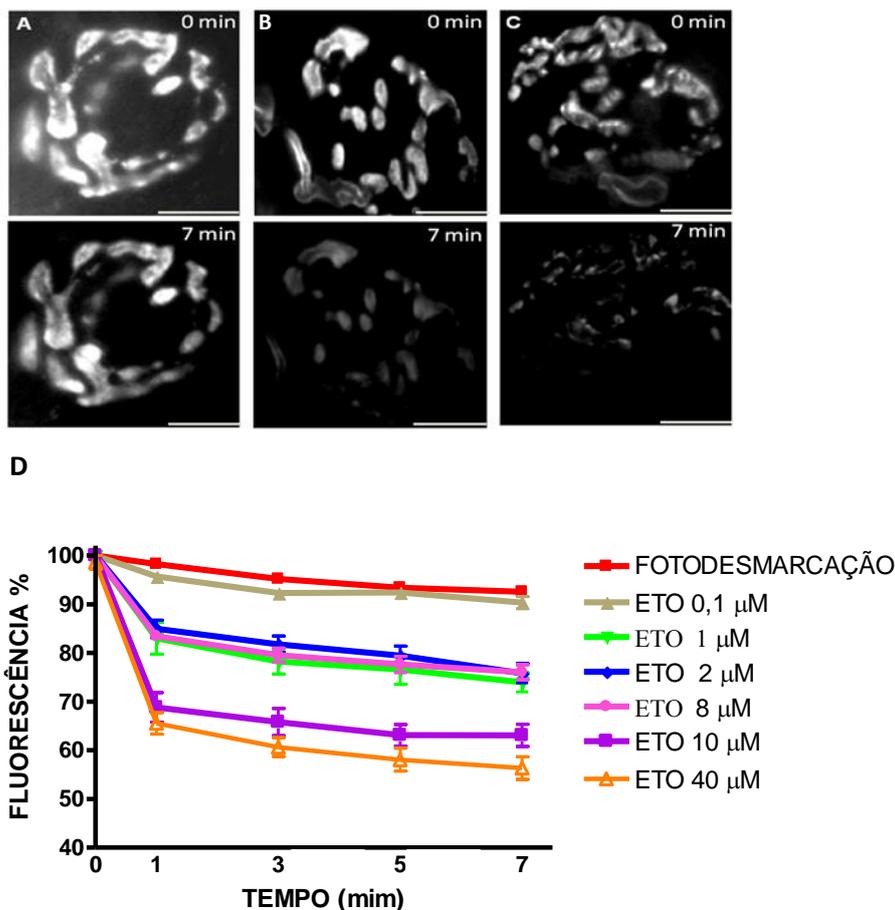
Neste trabalho investigamos, inicialmente, a possível ação do etomidato na exocitose espontânea de vesículas sinápticas da JNM de diafragma de camundongos.

Desta forma, as preparações nervo-músculo marcadas previamente com FM1-43, seguindo o protocolo descrito anteriormente, foram expostas à luz polarizada em meio Ringer durante 7 minutos em temperatura ambiente, para evidenciar o padrão de desmarcação na ausência do anestésico. As preparações também foram expostas a diferentes concentrações de etomidato (0.1, 1, 2, 8, 10 e 40  $\mu\text{M}$ ) seguindo as mesmas condições experimentais utilizadas para o controle na ausência do etomidato.

A figura 5a mostra as imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição à luz polarizada por 7 minutos (painel inferior), condição chamada de fotodesmarcação. Nestas imagens nota-se que houve aproximadamente 10% de queda da intensidade do sinal fluorescente. Na figura 5b são mostradas as imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato na concentração clínica de 1  $\mu\text{M}$  (painel inferior). A taxa de decaimento do sinal fluorescente na presença desta concentração do anestésico foi de aproximadamente 30%, o que indica que em concentrações clínicas o etomidato pode estimular a exocitose das vesículas sinápticas. A figura 5c mostra as imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato à concentração de 40  $\mu\text{M}$  (painel inferior). Na presença desta concentração supra-clínica de etomidato, percebemos uma redução de cerca de 40% do sinal fluorescente, uma queda ainda maior, indicando aumento da exocitose induzida por este agente. As curvas dose-respostas para as diferentes concentrações de etomidato utilizada neste estudo estão apresentadas na figura 5d. As curvas representam a média de no mínimo três experimentos independentes. Foram registradas imagens nos tempos 0, na ausência do anestésico e nos tempos 1 min, 3 min, 5 min e 7 min na presença do anestésico. A figura

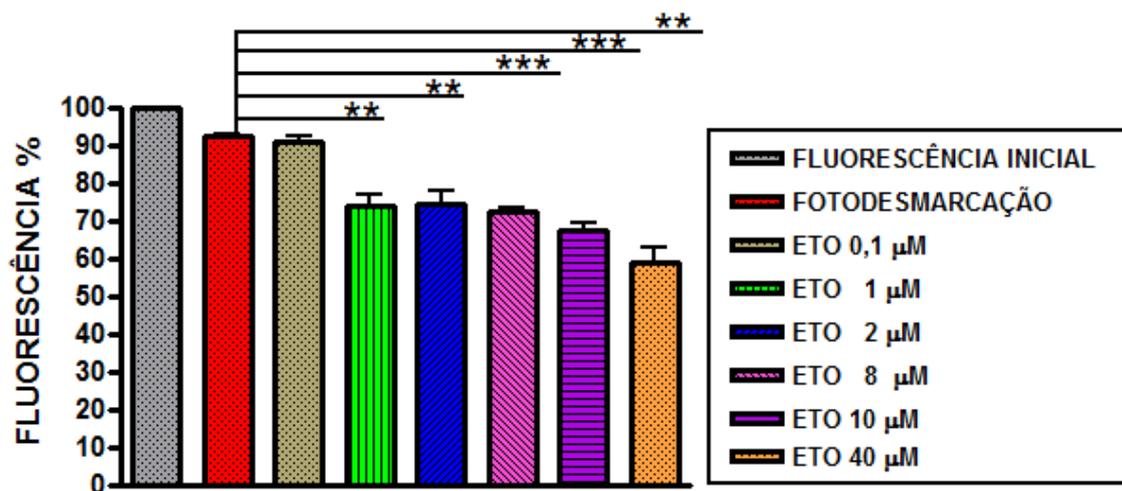
6 representa a quantificação gráfica da exocitose induzida pelo anestésico em concentrações sub-clínicas, clínicas e supra-clínicas.

A análise destes resultados sugere que à medida que aumenta-se a concentração do anestésico, há também um aumento da exocitose das vesículas sinápticas, evidenciado pela redução do sinal fluorescente, bem como pela curva dose-resposta. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o etomidato em doses clínicas e supra-clínicas é capaz de induzir a exocitose de vesículas sinápticas. Porém, na concentração sub-clínica não houve exocitose estatisticamente significativa. Nota-se que todas as concentrações clínicas e supra-clínicas de etomidato mostraram-se estatisticamente diferentes (\*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ) em relação ao controle (fotodesmarcação).



**Figura 5. Curva dose-resposta da exocitose induzida pelo anestésico etomidato.**

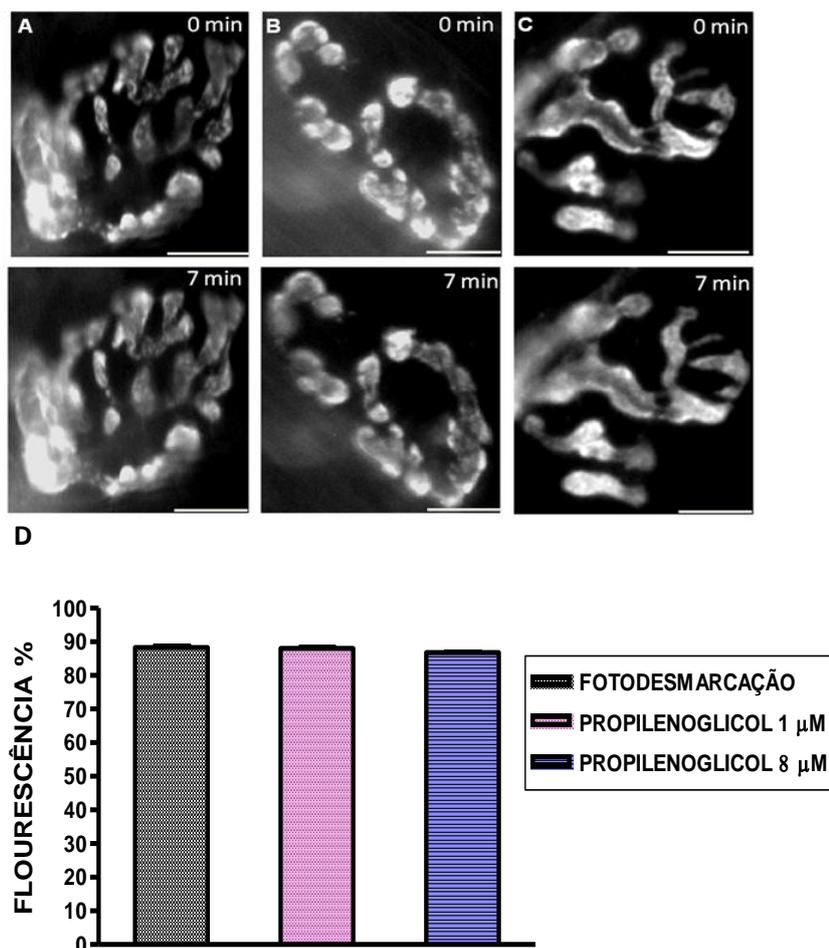
(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição à luz polarizada por 7 minutos (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato ( 1  $\mu\text{M}$ ) (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato ( 40  $\mu\text{M}$ ) (painel inferior). (D) Gráfico representativo do decaimento do sinal fluorescente ao longo de 7 minutos na presença e ausência de doses sub-clínicas, clínicas e supra-clínicas do anestésico etomidato. As curvas representam a média de no mínimo três experimentos independentes. Foram registradas imagens nos tempos 0, na ausência do anestésico (fotodesmarcação) e nos tempos 1', 3', 5' e 7' na presença do anestésico. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos dois terminais nervosos de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Assim, os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de 210 pontos fluorescentes de 42 terminais nervosos de 21 animais. Barra de escala=10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6: Quantificação da excitose induzida pelo anestésico etomidato.** Quantificação da excitose evocada por diferentes concentrações de etomidato após 7 minutos de exposição. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos dois terminais nervosos de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de 210 pontos fluorescentes de 42 terminais nervosos de 21 animais. \*\*  $P < 0.01$  e \*\*\*  $P < 0.001$

Como foi descrito anteriormente, o etomidato é diluído em propilenoglicol, sendo que cada ml da solução injetável contém 2 mg de etomidato dissolvidos neste veículo. Desta forma, para determinar se a exocitose das vesículas sinápticas foi induzida pelo etomidato e não pelo propilenoglicol, investigamos os efeitos deste veículo sobre a exocitose das vesículas sinápticas nas mesmas condições experimentais descritas acima. Os experimentos com o veículo foram realizados na presença de 1  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$  de propilenoglicol, pois nestas mesmas concentrações o etomidato parece estimular a exocitose das vesículas sinápticas. Desta forma, uma hemiface do músculo diafragma foi exposta à luz polarizada por sete minutos (fotodesmarcação). A outra hemiface foi exposta às concentrações supracitadas de propilenoglicol e as imagens foram registradas nos tempos 0 sem a presença do veículo, 1 min, 3 min, 5 min e 7 min na presença do veículo.

A Figura 7a mostra as imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição à luz polarizada por 7 minutos (painel inferior) (fotodesmarcação). As figuras 7b-c mostram imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao propilenoglicol nas concentrações de 1 e 8 ( $\mu\text{M}$ ), respectivamente (painel inferior). A figura 7d mostra a quantificação dos efeitos das concentrações testadas de propilenoglicol na exocitose de vesículas sinápticas nas mesmas condições e concentrações que foram encontrados efeitos para o etomidato. Observando estes resultados percebemos que a redução do sinal fluorescente após a exposição à luz polarizada (fotodesmarcação) foi em torno de 10% , e na presença de propilenoglicol (1  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ ) a redução do sinal também permaneceu nesta faixa de valor para ambas as concentrações. Sendo assim, a análise destes resultados indicam que o veículo propilenoglicol não exerce efeito sobre a exocitose das vesículas sinápticas.



**Figura 7. Propilenoglicol não interfere na exocitose de vesículas sinápticas.** (A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição à luz polarizada por 7 minutos (painel inferior). B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao propilenoglicol (1  $\mu$ M) (painel inferior). C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao propilenoglicol (8  $\mu$ M) (painel inferior). D) Quantificação do efeito do propilenoglicol na exocitose de vesículas sinápticas nas mesmas condições e concentrações equimolares em relação as utilizadas nos testes com etomidato. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos dois terminais nervosos de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de 60 pontos fluorescentes de 12 terminais nervosos de 6 animais. Barra de escala =10  $\mu$ m.

#### **4.2- Etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo independente de Na<sup>+</sup>.**

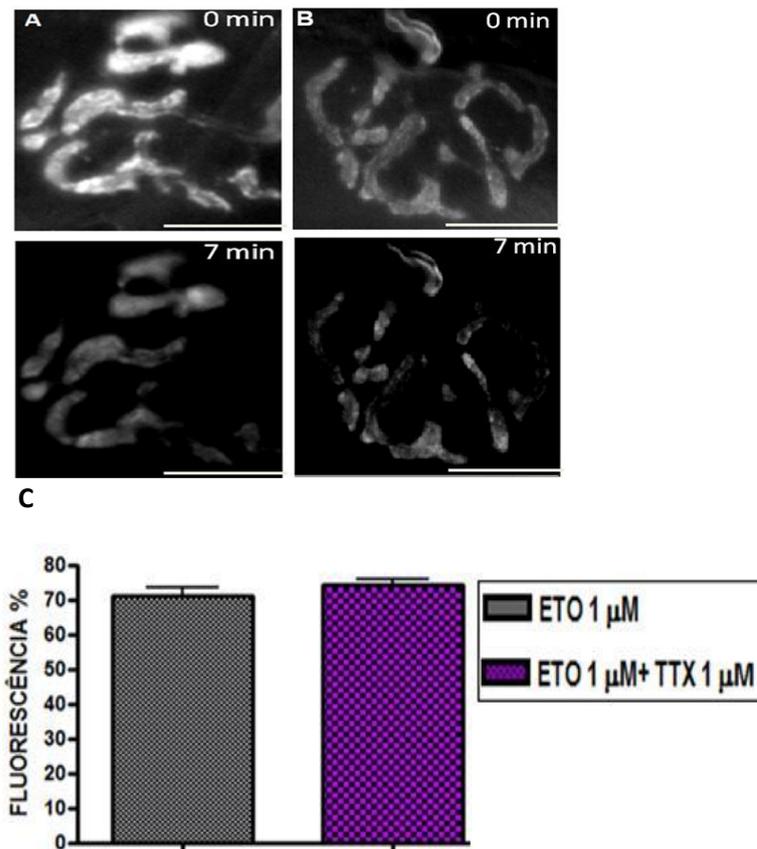
Para que ocorra a transmissão sináptica é necessária a propagação de um potencial de ação no axônio do neurônio pré-sináptico que envolve mudanças nas concentrações iônicas de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Esse potencial então se propaga ao longo do terminal e promove a abertura de canais para Ca<sup>2+</sup> regulados por voltagem. O influxo de Ca<sup>2+</sup> intracelular induz a exocitose de vesículas sinápticas liberando assim, o neurotransmissor na fenda sináptica.

Sabe-se que todo esse processo envolvendo a liberação do neurotransmissor pode apresentar possíveis alvos para ação dos anestésicos, e como foi observado que o etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas, nosso próximo conjunto de experimentos foi voltado para responder à seguinte questão: Por qual mecanismo este anestésico poderia estimular a exocitose de vesículas sinápticas? Seria por um mecanismo dependente de Na<sup>+</sup>?

Desta forma, as preparações nervo-músculo após a marcação com a sonda FM1-43, foram incubadas durante 7 minutos com a neurotoxina bloqueadora de canais para Na<sup>+</sup>, Tetrodotoxina (TTX) 1 μM. Em uma etapa posterior, adicionamos etomidato 1 μM na presença de TTX (1 μM) para registro das imagens durante 7 minutos. Como controle para estes experimentos utilizamos o outro hemidiafragma tratado apenas com etomidato 1 μM.

A Figura 8 mostra que a queda do sinal fluorescente tanto na presença do etomidato 1 μM quanto na presença de etomidato 1 μM + TTX 1 μM foi de aproximadamente 30%. A figura 8a mostra imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição de etomidato 1 μM por 7 minutos (painel inferior). Na figura 8b temos as imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato 1 μM + TTX 1 μM (painel inferior). Nestas figuras podemos observar que a queda da intensidade de fluorescência foi igual para ambas as condições experimentais, o que indica que mesmo bloqueando os canais para Na<sup>+</sup>, o etomidato ainda é capaz de estimular a exocitose das vesículas sinápticas. A figura 8c mostra o

gráfico da quantificação dos efeitos do bloqueador para canais para  $\text{Na}^+$  antes e após 7 minutos de incubação. Portanto, a análise destes resultados sugere que o etomidato é capaz de estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo independente do  $\text{Na}^+$ .

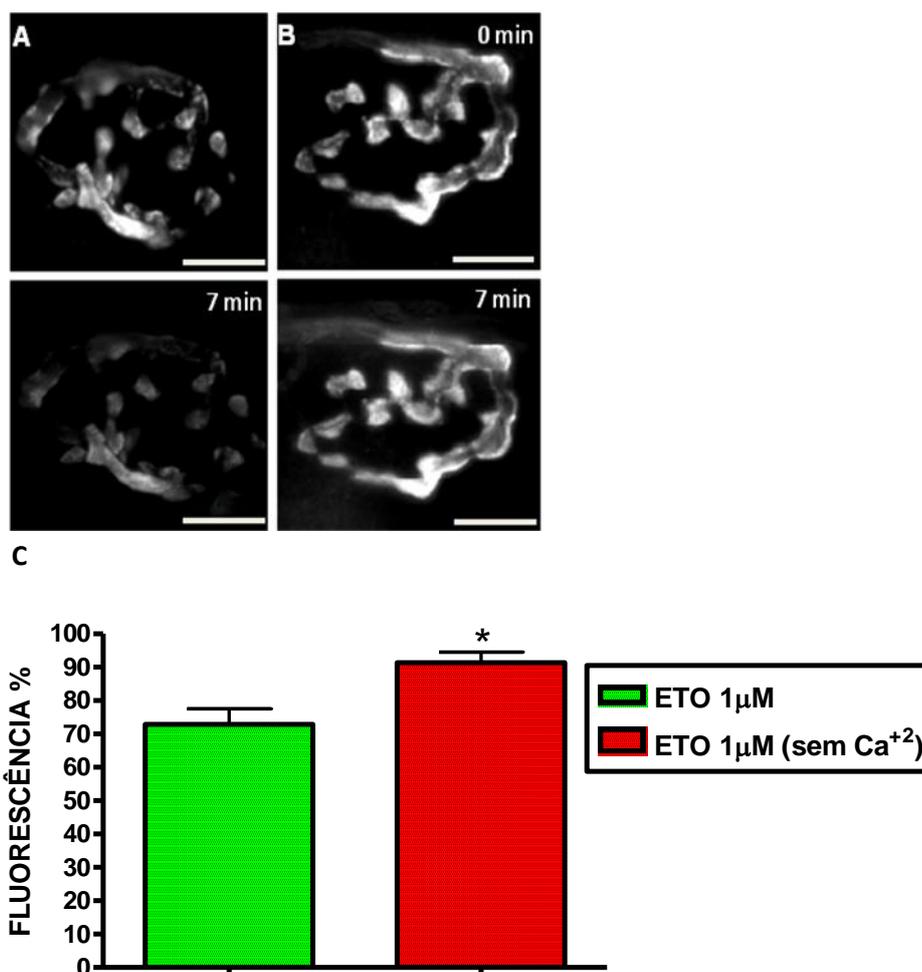


**Figura 8. Etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo independente de  $\text{Na}^+$ .** A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição ao etomidato ( $1 \mu\text{M}$ ) por 7 minutos (painel inferior). B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato  $1 \mu\text{M}$  +TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) (painel inferior). C) Quantificação dos efeitos do bloqueador para canais para  $\text{Na}^+$  antes e após 7 minutos de incubação. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos dois terminais nervosos de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de 60 pontos fluorescentes de 12 terminais nervosos de 6 animais. Barra de escala =  $10 \mu\text{m}$ .

### **4.3- Etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente de $\text{Ca}^{2+}$ externo.**

Como os resultados anteriores sugerem que o etomidato é capaz de estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo independente de  $\text{Na}^+$ , nós investigamos se este efeito seria dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Os experimentos para investigar o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  externo na exocitose induzida por etomidato foram realizados em solução Ringer modificada com substituição equimolar de  $\text{CaCl}_2$  por  $\text{MgCl}_2$ . Além disso, EGTA (1mM), um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, também foi adicionado ao Ringer modificado, livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , garantindo assim a ausência total deste íon. As preparações foram marcadas com FM1-43, sendo que uma hemiface do músculo diafragma foi destinada ao controle que neste caso, foi o tratamento com etomidato 1  $\mu\text{M}$ . A outra hemiface do músculo foi também tratada com etomidato 1  $\mu\text{M}$  em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , as imagens foram registradas no decorrer de 7 minutos para as duas condições experimentais. A figura 9 mostra que na ausência do  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença do etomidato, a exocitose evocada pelo anestésico foi bloqueada. A figura 9a mostra imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição de etomidato 1  $\mu\text{M}$  por 7 minutos (painel inferior). Observamos nesta figura, uma redução da intensidade do sinal fluorescente em torno de 30%. Na figura 9b temos as imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato 1  $\mu\text{M}$  em meio livre  $\text{Ca}^{2+}$  externo (painel inferior), onde observamos uma queda de aproximadamente 10% na intensidade do sinal fluorescente indicando que em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , o etomidato não estimula a exocitose de vesículas sinápticas. A figura 9c mostra a quantificação dos efeitos do etomidato na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo antes e após 7 minutos. Nota-se que houve diferença estatística entre as duas condições experimentais com  $*p < 0.05$  na presença do etomidato em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparado à exposição do etomidato em meio Ringer normal. Assim, a análise destes resultados indica que a exocitose induzida por etomidato ocorre de uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo.



**Figura 9. Etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente de Ca<sup>2+</sup> externo.** A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição ao etomidato (1 μM) por 7 minutos (painel inferior). B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição ao etomidato 1 μM em meio livre Ca<sup>2+</sup> externo (painel inferior). C) Quantificação dos efeitos do etomidato na ausência de Ca<sup>2+</sup> externo antes e após 7 minutos. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos dois terminais nervosos de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Os resultados expressam a média ± EPM de 60 pontos fluorescentes de 12 terminais nervosos de 6 animais. \*P<0.05. Barra de escala =10 μm.

Como observamos que a excitose de vesículas sinápticas induzida pelo etomidato foi dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, nosso próximo passo foi investigar qual (is) canal (is) para  $\text{Ca}^{2+}$  seria(m) possível (eis) alvo (s) de ação desse anestésico. Para responder a esta questão utilizamos inicialmente a  $\omega$ -conotoxina MVIIC (50  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dos subtipos N, P/Q.

As preparações foram então marcadas previamente com a sonda FM1-43. Uma hemiface do músculo foi destinada ao controle (etomidato 1  $\mu\text{M}$ ) e a outra hemiface do músculo foi pré-incubada por 7 minutos com  $\omega$ -conotoxina MVIIC (50  $\mu\text{M}$ ). As imagens de ambas as condições experimentais foram adquiridas no decorrer de 7 minutos.

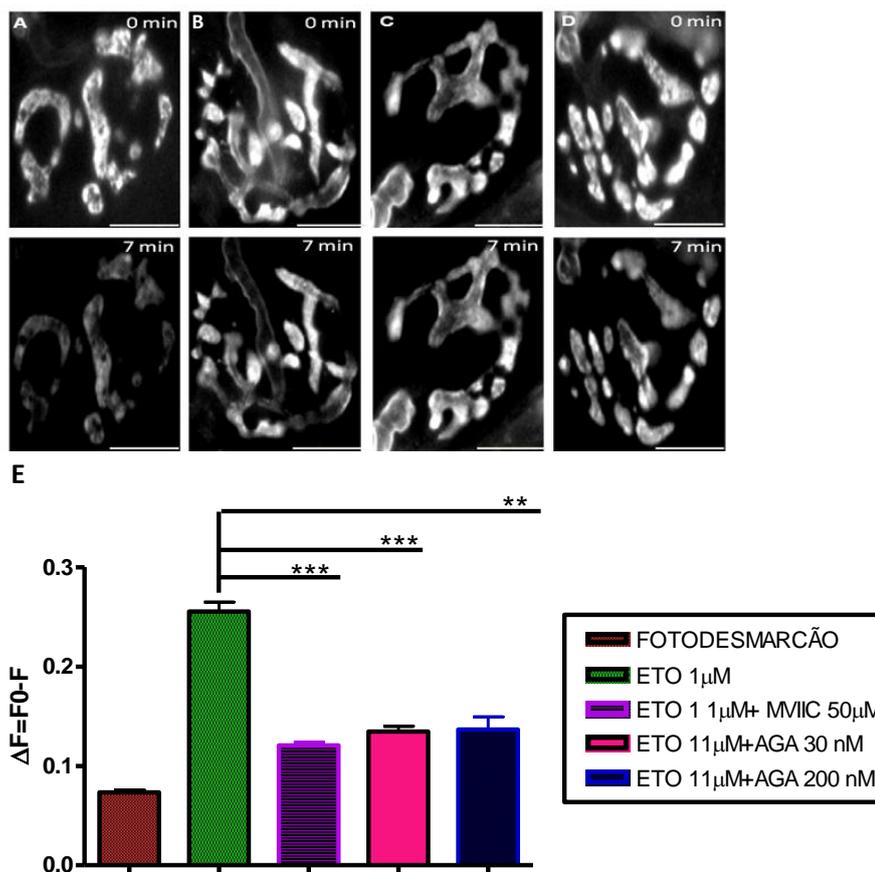
Nossos resultados demonstram que a  $\omega$ -conotoxina MVIIC inibiu a excitose induzida por etomidato. Na figura 10a são mostradas as imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição ao etomidato 1  $\mu\text{M}$  por 7 minutos (painel inferior), com aproximadamente 30% de redução. A figura 10b mostra imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição a  $\omega$ -conotoxina MVIIC (50  $\mu\text{M}$ ) (painel inferior), com redução em torno de 13% do sinal fluorescente quando comparado ao etomidato 1  $\mu\text{M}$ .

Uma vez que a liberação de vesículas sinápticas em JNM de mamíferos é mediada por canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q, a partir destes resultados nós investigamos se o efeito excitotóxico do etomidato envolveria estes canais. Para responder a esta pergunta, utilizamos  $\omega$ -Agatoxina IVA, uma neurotoxina específica para o bloqueio de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q.

As preparações marcadas com a sonda FM1-43, foram pré-incubadas por 7 minutos com duas concentrações diferentes de  $\omega$ -Aga IVA. Inicialmente, utilizamos a neurotoxina na concentração 200 nM, pois nesta concentração haveria o bloqueio dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P e Q. Num segundo momento, realizamos novos experimentos, nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando a neurotoxina na concentração de 30 nM, pois esta concentração tem sido empregada para bloquear os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P (RANDALL & TSIEN, 1995), sem interferir com os de tipo Q.

As figuras 10c-d mostram imagens representativas da redução da intensidade do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição a  $\omega$ -AGA IVA 30 nM e 200nM, respectivamente. Observamos nestas imagens que a queda da intensidade de fluorescência foi cerca de 20% para  $\omega$ -AGA IVA 30 nM e de 10 % para  $\omega$ -AGA IVA 200 nM. A figura 12e mostra o gráfico da quantificação dos efeitos do bloqueador para canais de  $Ca^{2+}$  em concentrações que bloqueiam os canais de  $Ca^{2+}$  do tipo P/Q e do canal tipo P isolado, antes e após 7 minutos de incubação.

A análise destes resultados mostra que a  $\omega$ -AGA IVA 30 nM reduziu significativamente a exocitose evocada por etomidato ( $***P<0.001$ ). Não foi observada diferença estatística entre as duas concentrações de  $\omega$ -AGA testadas na presença do etomidato. Estes resultados sugerem que o etomidato é capaz de estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo depende de canais para  $Ca^{2+}$  do tipo P/Q, podendo haver maior contribuição dos canais do tipo P.



**Figura 10. Etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q, podendo haver maior contribuição dos canais do tipo P.** A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após a exposição ao etomidato ( $1 \mu\text{M}$ ) por 7 minutos (painel inferior). B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição a MVIIC ( $50 \mu\text{M}$ ) (painel inferior). C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição a  $\omega$ -AGA IVA ( $30 \text{ nM}$ ) (painel inferior). (D) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após 7 minutos de exposição a  $\omega$ -AGA IVA ( $200 \text{ nM}$ ) (painel inferior). (E) Quantificação dos efeitos dos bloqueadores para canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em concentrações para o bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q e do canal tipo P isolado, antes e após 7 minutos de incubação.  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ , fluorescência normalizada. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos dois terminais nervosos de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de 120 pontos fluorescentes de 24 terminais nervosos de 12 animais. \*\*  $P < 0.01$  e \*\*\*  $P < 0.001$  comparado ao etomidato  $1 \mu\text{M}$ . Barra de escala =  $10 \mu\text{m}$ .

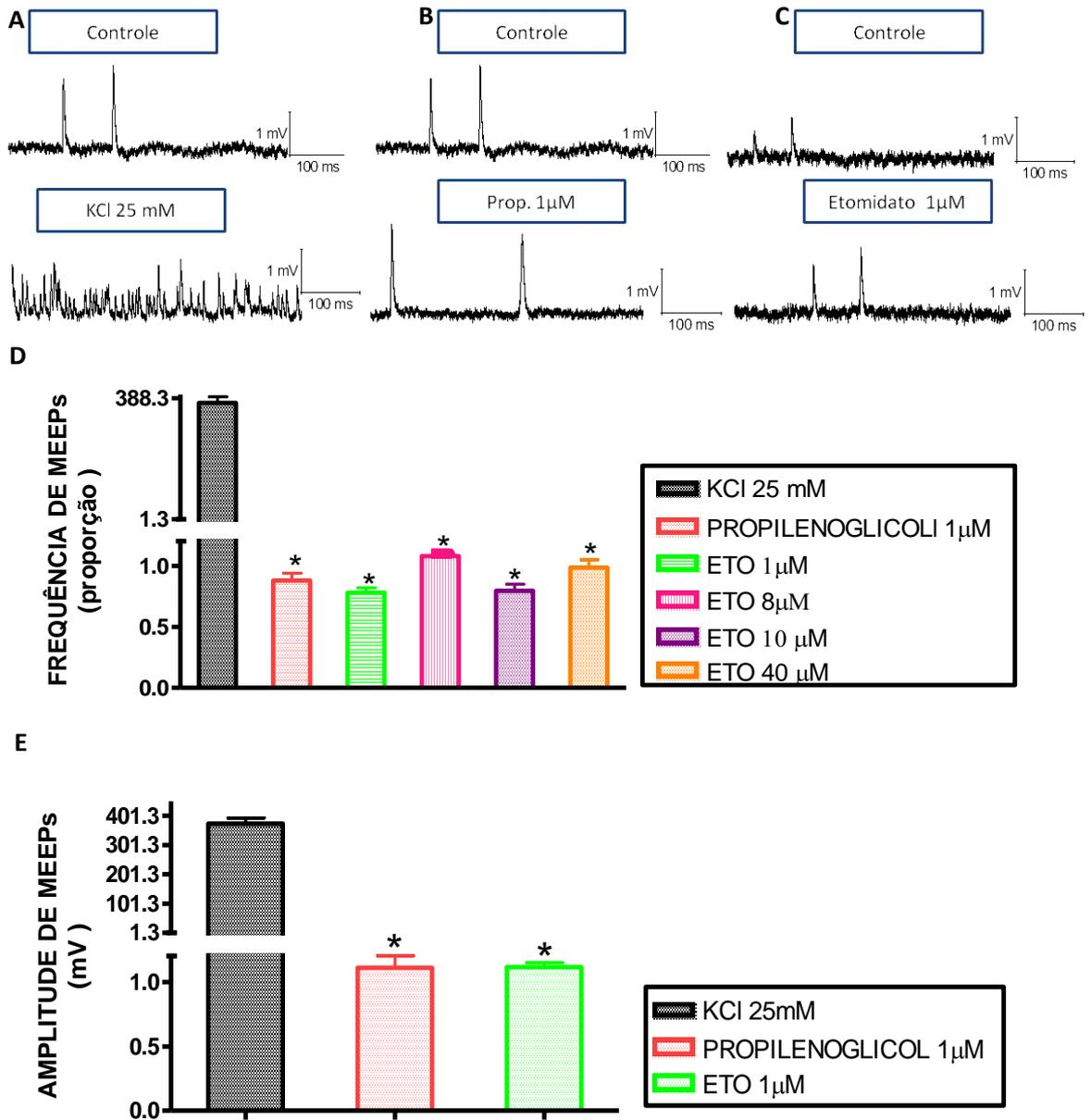
#### **4.4-Efeito do etomidato nos potenciais em miniatura da placa motora (MEEPs)**

Para avaliar os efeitos de etomidato sobre liberação quântica de ACh, realizamos gravações eletrofisiológicas dos MEEPs.

Para estes experimentos também utilizamos o músculo diafragma de camundongos que foi fixado em placa de acrílico contendo Ringer. Os registros eletrofisiológicos foram feitos a partir de uma fibra muscular. Registramos a liberação do MEEPs sem estímulo por 7 minutos. Posteriormente, adicionamos o anestésico ou o veículo propilenoglicol e registramos no mesmo tempo obtido para o controle.

A figura 11a mostra as imagens representativas de registros de frequência dos MEEPs na ausência (controle) e na presença do estímulo despolarizante KCl 25mM. É possível observar que na presença do estímulo, a frequência dos MEEPs é aumentada. Na figura 11b são mostradas as imagens representativas de frequência na ausência (controle) e presença de propilenoglicol 1 $\mu$ M. Nestas imagens nota-se que não houve alterações na frequência dos MEEPs na presença de propilenoglicol. A figura 11c mostra imagens representativas de frequência na ausência (controle) e na presença de etomidato 1 $\mu$ M. Na presença do etomidato também não houve mudança na frequência dos MEEPs. Na figura 11d-e temos a quantificação gráfica da frequência dos MEEPs. Em relação à amplitude dos MEEPs, na presença do etomidato 1 $\mu$ M houve uma tendência ao aumento sem diferença estatística.

A partir dos nossos resultados observamos que concentrações clínicas de etomidato não foram capazes de alterar nem a frequência dos eventos, nem a sua amplitude quando comparadas a um estímulo padrão (KCl 25 mM). As mesmas observações foram feitas quando realizamos experimentos com o veículo propilenoglicol no qual o etomidato é diluído.



**Figura 11. Efeitos do etomidato sobre a frequência e amplitude dos MEEPs.**

(A) Imagens representativas da frequência de MEEPs na presença de KCl 25mM (B) Imagens representativas da frequência de MEEPs na presença de propilenoglicol 1μM (C) Imagens representativas da frequência de MEEPs na presença de etomidato 1μM . (D) Quantificação gráfica da frequência dos MEEPs.(E) Quantificação gráfica da amplitude dos MEEPs .Barras de calibração: 100 ms (horizontal), 1 mV (vertical).\*p<0.05 quando comparado ao KCl. Foram realizados registros de uma fibra muscular para cada animal, sendo que para cada condição experimental utilizamos 3 animais.

#### 4.6- Efeito do etomidato sobre os receptores nicotínicos de ACh

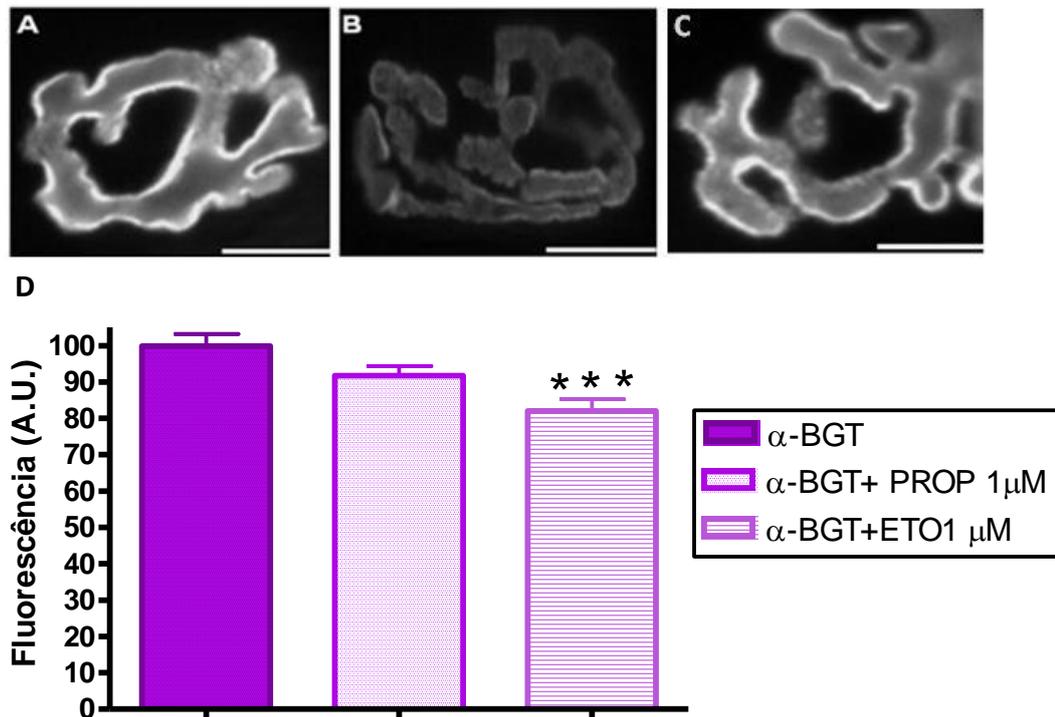
O próximo conjunto de experimentos foi voltado para responder se o etomidato pode, de alguma forma, atuar nos receptores nicotínicos pós-sinápticos para ACh.

Para realizar estes experimentos, incubamos um hemidiafragma com  $\alpha$ -BGT- Alexa 594, que se liga de maneira estável aos receptores nicotínicos da placa motora. No outro hemidiafragma realizamos o mesmo tratamento, porém na presença de etomidato 1  $\mu$ M, as imagens para ambas as condições experimentais foram registradas no decorrer de 7 minutos.

Posteriormente, realizamos novos experimentos, nas mesmas condições, utilizando propilenoglicol, com o objetivo de verificar se este veículo exerceria alguma interferência nos receptores nicotínicos de acetilcolina.

A figura 12a mostra imagens representativas da intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos de músculo diafragma de camundongo na presença de  $\alpha$ -BGT. Na figura 12b temos imagens representativas da intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos de músculo diafragma de camundongo na presença de  $\alpha$ -BGT+ etomidato 1  $\mu$ M. Observa-se nestas imagens que houve perda significativa de cerca de 20% da intensidade de fluorescência quando a preparação foi exposta ao anestésico e à  $\alpha$ -BGT concomitantemente. Entretanto, a figura 12c mostra as imagens representativas na presença de  $\alpha$ -BGT + propilenoglicol 1  $\mu$ M, onde observamos que não houve alteração na intensidade de fluorescência, indicando que o veículo parece não interferir com os receptores nicotínicos para ACh. A figura 12e mostra a quantificação gráfica da média de intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos. Nota-se que na presença de  $\alpha$ -BGT + etomidato 1  $\mu$ M, houve diferença estatística (\*\*\*)  $p < 0.001$  quando comparado à presença apenas de  $\alpha$ -BGT.

A análise destes resultados sugere que o etomidato pode atuar, de alguma forma, nos receptores nicotínicos para ACh, uma vez que na presença do anestésico houve queda do sinal fluorescente.



**Figura 13. Etomidato pode atuar nos receptores nicotínicos de ACh.** (A-C) Imagens representativas da intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos de músculo diafragma de camundongo na presença de  $\alpha$ -BGT. (B) Imagens representativas da intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos de músculo diafragma de camundongo na presença de  $\alpha$ -BGT+ etomidato 1  $\mu$ M. (C) Imagens representativas da intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos músculo diafragma de camundongo na presença de  $\alpha$ -BGT+ propilenoglicol 1  $\mu$ M (D) Gráfico mostrando a média de intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos. Foram analisados 15 terminais nervosos para cada hemiface do músculo diafragma de cada animal, sendo que para cada condição experimental contamos com 3 animais. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de intensidade de fluorescência de 180 terminais nervosos de 6 animais. \*\*\*  $p < 0.001$ . Barra de escala = 10  $\mu$ m.

## 5 – DISCUSSÃO

O ato anestésico é amplamente utilizado sendo que 13,5% da população é submetido a algum tipo de anestesia a cada ano (CLERGUE *et al.*, 1998). Desta forma, é fundamental compreender os mecanismos subjacentes ao processo anestésico, abrindo assim caminho para o desenvolvimento de drogas mais seletivas e mais seguras (EDOMER *et al.*, 2002).

Neste contexto, investigar e compreender os mecanismos de ação dos anestésicos gerais, e mais especificamente os intravenosos, são aspectos cada vez mais buscados com o intuito de se realizar um emprego mais seguro destes agentes. Estudos utilizando técnicas de eletrofisiologia e neuroquímica indicam que os anestésicos gerais apresentam potentes efeitos na transmissão sináptica no plano do SNC, pois atuam aumentando a transmissão sináptica inibitória (NICOLL, 1972 revisado por MURUGAIAH & HEMMINGS, 1998) e inibindo a transmissão sináptica excitatória (POCOCK & RICHARDS, 1993). Além disso, estes efeitos podem ser pré e/ou pós-sinápticos, uma vez que no terminal pré-sináptico, esses agentes podem alterar a liberação de neurotransmissores, e na região pós-sináptica podem modular as respostas destes (PASHKOV & HEMMINGS, 2002).

Entretanto, apesar dos esforços realizados para esclarecer os mecanismos pelos quais os anestésicos atuam no SNC, não foi possível até o momento elucidar, completamente, os mecanismos celulares e moleculares de ação dos anestésicos intravenosos a nível periférico. Sabe-se que a JNM promove integração do SNC e as células musculares, sendo assim, é fundamental compreender como os anestésicos intravenosos atuam nesta estrutura, uma vez que entre os principais efeitos dos anestésicos intravenosos estão as alterações no padrão de contratilidade dos músculos causando então relaxamento muscular e em alguns casos, contrações súbitas (DOENICK, 1999).

Nesta perspectiva, o objetivo inicial deste trabalho foi analisar os possíveis efeitos do anestésico intravenoso etomidato na exocitose de vesículas sinápticas na JNM de diafragma de camundongos. As concentrações utilizadas nesta investigação científica (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 40  $\mu$ M) foram baseadas em dados da literatura

(HERRING, 2011; GIESE & STANLEY, 1983; YANG & UCHIDA, 1996; BELELLI. *et al.*,1999).

No presente estudo, mostramos que concentrações clínicas (1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ ) e supraclínicas (10 e 40 $\mu\text{M}$ ) de etomidato induziram a exocitose de vesículas sinápticas marcadas com FM1-43, e este efeito foi dose-dependente uma vez que à medida que aumentava-se a concentração do anestésico, maior era o decaimento da fluorescência (Figuras 5 e 6). Este dado está de acordo com experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa avaliando o efeito do propofol na exocitose de vesículas sinápticas utilizando a mesma preparação (JNM) (LEITE *et al.*, 2010). Neste trabalho, observou-se que baixas concentrações de propofol (10-25  $\mu\text{M}$ ) também induziram a exocitose de vesículas sinápticas. Além disso, dados obtidos por Xie *et al.*,(2004), também demonstraram que concentrações clinicamente relevante de etomidato foram capazes de estimular a liberação de catecolaminas, porém neste estudo foi utilizado um outro modelo experimental (células cromafins). Entretanto, no estudo realizado por Herring *et al.*, (2011), utilizando o mesmo modelo do estudo anterior (células cromafins), assim como em células PC12, e cultura de neurônios, demonstrou-se que, diferentemente dos resultados apresentados por Xie *et al.*, (2004) e por nós neste trabalho, o etomidato inibiu a liberação de neurotransmissores atuando em proteínas específicas envolvidas na neurotransmissão como a syntaxina 1A.

Um outro estudo realizado por Xie *et al.*, (2012) utilizando linhagens de células PC12 com expressão suprimida de proteínas como sinaptotagmina I, SNAP 25 e SNAP 23, demonstrou que os anestésicos etomidato e propofol não inibiram a liberação de neurotransmissores, sugerindo assim que a ação inibitória causada por estes anestésicos pode estar relacionada a sítios específicos nestas proteínas. A discrepância destes resultados em relação ao estudo anterior deste mesmo grupo de pesquisa utilizando células cromafins e aos nossos apresentados aqui utilizando JNM, pode estar relacionada aos modelos experimentais e às técnicas utilizadas.

Após a observação de que o etomidato leva a um aumento da exocitose de vesículas sinápticas, investigamos o mecanismo pelo qual esse anestésico estaria exercendo o seu efeito. Já está bem estabelecido que o durante o potencial de ação a abertura dos canais para  $\text{Na}^+$  inicia o processo de despolarização da membrana do terminal pré-sináptico. Assim, investigamos a participação dos íons  $\text{Na}^+$  na exocitose de

vesículas sinápticas induzida por etomidato utilizando a TTX, um potente bloqueador de CSSV a nível periférico e central (NARAHASHI, 2008). Esta neurotoxina apresenta alta potência e especificidade, de maneira que não afeta outros receptores ou canais iônicos (NARAHASHI, 2008). Nossos resultados sugerem que a exocitose induzida por etomidato segue um mecanismo independente de  $\text{Na}^+$ , pois não verificamos alteração significativa na exocitose evocada pelo anestésico na presença deste bloqueador (Figura 8). Estes dados estão de acordo com os descritos por Leite *et al.*, (2010), no qual foi observado que, em baixas doses, o propofol estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo independente de  $\text{Na}^+$ . Além disso, outros estudos evidenciaram que os anestésicos inalatórios halotano e isoflurano foram capazes de estimular a liberação de neurotransmissores em um mecanismo independente de  $\text{Na}^+$  (SILVA *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2007).

Dessa forma, avaliamos a possibilidade do etomidato estimular a liberação de vesículas sinápticas atuando, de alguma forma, em CCSV, uma vez que este é um passo fundamental para a exocitose de vesículas sinápticas. De fato, dados da literatura sugerem que a liberação dos neurotransmissores é regida por alguns subtipos de CCSV que foram subdivididos em L-, N, P e Q tendo como base para esta divisão: diferenças na distribuição, biologia molecular, farmacologia e propriedades eletrofisiológicas (NOWYCKY; FOX; TSIEN, 1985; MILLER, 1987; HIRNING *et al.*, 1988 revisto por WRIGHT & ANGUS 1996).

A figura 9 mostra que na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo o etomidato não foi capaz de promover a exocitose de vesículas sinápticas. Com base nestes experimentos, podemos concluir que a ação do etomidato ocorre de uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo e independente de  $\text{Ca}^{2+}$  interno, uma vez que na ausência do  $\text{Ca}^{2+}$  externo não verificamos exocitose, sendo assim os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sozinhos não são capazes de promover a exocitose.

Nosso próximo passo foi então investigar o tipo específico de CCSV responsável por este efeito. As preparações nervo-músculo foram expostas ao etomidato na presença da neurotoxina  $\omega$ -CTx-MVIIC, um bloqueador inespecífico para canais do tipo N, P e Q (HILLYARD *et al.*, 1992). A figura 10 mostra que na presença de  $\omega$ -CTx-MVIIC a exocitose evocada por etomidato foi inibida. A seguir, testamos o efeito de bloqueadores específicos de CCSV na exocitose induzida por etomidato, uma vez que

em terminais nervosos, coexistem múltiplos subtipos de CCSV, sendo que os subtipos de maior importância para transmissão sináptica neuromuscular são os do tipo P/Q (LEVEQUE *et al.*, 1994). Utilizamos então em nossos experimentos a neurotoxina  $\omega$ -Aga IVA, um bloqueador específico para os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  supracitados (P/Q). Esta toxina requer o estado aberto do canal para ter acesso ao sítio de ligação e quando liga-se, inativa-o (OLIVEIRA *et al.*, 1994).

A figura 10 mostra que na presença de  $\omega$ -Aga IVA (200 nM), a inibição da exocitose induzida por etomidato não foi maior quando comparada à concentração de 30 nM. Estes resultados sugerem que o etomidato é capaz de estimular a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo que depende de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q, podendo haver maior contribuição do canal tipo P.

Diferente dos nossos dados, estudos realizados em cardiomiócitos de ventrículos de coração de cobaias demonstram que o etomidato atuava inibindo, e não estimulando, os CCSV do tipo L existente nestas células. Esta diferença pode estar relacionada ao tipo de CCSV presente na célula estudada. Entretanto, existem dados na literatura que apontam que agentes anestésicos do mesmo grupo do etomidato como o propofol, podem atuar nos CCSV do tipo N também estimulando exocitose de vesículas sinápticas de JNM de rã (LEITE *et al.*, 2010). Em relação aos CCSV do tipo P/Q, foi descrito que em fatias cerebrais de ratos, concentrações clínicas de anestésicos intravenosos como propofol inibem a liberação de dopamina, que tem sua liberação mediada predominantemente por CCSV do tipo P/Q (HIROTA *et al.*, 2000). Podemos observar desta forma, que anestésicos pertencentes ao mesmo grupo podem produzir efeitos diversos nos diferentes subtipos de CCSV.

Um dos aspectos que chama a atenção para nosso estudo é o fato de que o anestésico etomidato induz a exocitose de vesículas sináptica na JNM, enquanto a literatura aponta que um dos efeitos causados pelos anestésicos gerais é o relaxamento da musculatura esquelética (CATON, 2005). No entanto, vários efeitos secundários desfavoráveis associados com etomidato foram observados, incluindo a dor durante a injeção e os movimentos mioclônicos durante a indução da anestesia geral. (WATT & LEDINGHAM, 1984 revisto por FORMAM, 2011).

As mioclonias são consideradas movimentos involuntários de um músculo ou grupo de músculos causadas por contrações bruscas ou até mesmo por relaxamento muscular. Quando relacionadas à contração, são chamadas de mioclonias positivas e as relacionadas ao relaxamento muscular são conhecidas como mioclonias negativas (RUBBOLI & TASSINARI, 2006).

Em relação ao etomidato, tem sido demonstrado que as mioclonias positivas aumentam com doses crescentes do agente. Além disso, quando a anestesia é induzida por etomidato, cerca de 50-80% dos pacientes apresentam mioclonias (DOENICKE, 1999).

A literatura também aponta vários estudos que correlacionam uso de anestésicos intravenosos a efeitos excitatórios que podem se manifestar como mioclonias. Krieger *et al.*, (1985), relataram a atividade epileptiforme generalizada no eletroencefalograma em 20% dos pacientes não epiléticos após a administração de etomidato. Borgeat *et al.*, (1993) verificaram movimentos espontâneos em 100% das crianças que receberam 3 mg/kg de propofol.

O mecanismo neurológico que causa mioclonias ainda permanece obscuro (MODICA *et al.*, 1990). Uma possibilidade é que ela represente alguma forma de atividade convulsiva. Por outro lado, alguns argumentam que ela é um fenômeno de desinibição cortical, uma vez que na presença de grandes concentrações de etomidato, há depressão de atividade cortical (DOENICK, 1973; DOENICK, 1999).

Estudos tem sido voltados para elucidar o mecanismo pelo qual o etomidato causa mioclonias, como o estudo de Snodgrass (1990), que demonstra que os receptores GABA<sub>A</sub> que são alvos do etomidato no SNC, podem estar envolvidos nos mecanismos de mioclonias. Concomitante com este dado, pesquisas apontam que agonistas de receptores GABA<sub>A</sub> como o etomidato, produzem mioclonias em vários modelos animais, sendo causada provavelmente, devido à inibição de circuitos inibitórios com desinibição localizada resultante (OKADA *et al.*, 1989).

Sendo assim, possíveis mecanismos para explicar este fenômeno, a nível do SNC, são a capacidade do etomidato possuir propriedades agonistas sobre os receptores GABA<sub>A</sub> e o fato deste anestésico fazer parte da classe dos anestésicos com efeitos

excitatórios, pois todas substâncias que pertencem a esta classe, provavelmente interagem com receptores GABA ou receptores de aminoácidos excitatórios melhorando as respostas evocadas (WINTERS, 1978 revisto por Snodgrass, 1990).

Entretanto, apesar dos esforços empregados para tentar explicar os mecanismos que levam à mioclonia a nível de SNC, tais mecanismos relacionados à nível periférico ainda não foram elucidados. Nossos resultados utilizando uma poderosa ferramenta de monitoramento de reciclagem de vesículas sinápticas (FM1-43), indicam que há exocitose de vesículas sinápticas evocadas por etomidato em concentrações clínicas. Sendo assim, poderíamos especular que as mioclonias observadas com etomidato na prática clínica poderiam ser pelo menos parcialmente explicadas pelo aumento da exocitose de ACh na JNM.

Para testar esta hipótese realizamos experimentos utilizando a técnica de eletrofisiologia para avaliar se o etomidato teria algum efeito sobre a frequência e a amplitude dos potenciais de placa motora em miniatura (MEEPs).

Nossos resultados indicam que tanto a frequência quanto a amplitude dos MEEPs não foram alterados na presença do etomidato (Figura 11). Estes achados concordam com estudos anteriores e pioneiros sobre a ação de anestésicos na transmissão neuromuscular. Miller *et al.*, (1971) e Watland *et al.*, (1957), demonstraram que halotano não exerce efeito na transmissão neuromuscular. Por outro lado, Karis *et al.*, (1966), relataram que vários anestésicos inalatórios atuavam diminuindo a amplitude dos MEEPs de músculo sartório de rãs. A hipótese levantada por estes pesquisadores é que estes anestésicos causam uma diminuição de sensibilidade da membrana pós-sináptica para ACh.

Nossos resultados utilizando  $\alpha$ -BGT indicam que o etomidato pode atuar nos receptores nicotínicos de ACh e esta seria uma possível explicação para a ausência de mudança no padrão dos MEEPs na presença do etomidato. Demonstramos que na presença de etomidato em concentrações clínicas, a marcação com  $\alpha$ -BGT foi diminuída (Figura 12). Para explicar um possível mecanismo de ação dos anestésicos sobre os receptores nicotínicos para ACh, levantamos a hipótese de que sendo o etomidato um anestésico lipofílico, poderia de alguma forma, alterar a distribuição dos receptores nicotínicos para ACh. Caso isso ocorresse, não observaríamos alterações no registro dos

MEEPs, assim como aconteceu em nossos estudos utilizando a técnica de eletrofisiologia. Além disso, estudo recentemente publicado por Bondarenko *et al.*, 2012, fornece evidência experimental convincente de que anestésicos intravenosos e inalatórios induzem mudanças na dinâmica de proteínas que formam o receptor nicotínico, especialmente próximo a regiões hidrofóbicas que regulam diretamente as funções do canal. Entretanto, o mecanismo pelo qual ocorre a interação entre o anestésico e os receptores ainda não está completamente compreendido, necessitando um estudo mais aprofundado para esclarecer como ocorre este fenômeno.

Estudos como o de Scheller *et al.*, (1997), indicam que anestésicos como sevoflurano e isoflurano atuam nos receptores nicotínicos inibindo-os de uma forma reversível e em concentrações sub-clínicas. Foi evidenciado também que anestésicos intravenosos como propofol e etomidato são capazes de diminuir o tempo de abertura dos receptores nicotínicos em doses clínicas e supra-clínicas (RUTH *et al.*, 1992). Já o estudo de Forman *et al.*, (1995) demonstrou que isoflurano foi capaz de se ligar a um sítio localizado dentro do canal do receptor, o que ocasionou a inibição do receptor pelo anestésico.

Nesta linha de raciocínio, Branningan *et al.*, (2010), investigou se o sevoflurano possuía apenas um sítio no receptor de ACh. Os achados encontrados por estes pesquisadores revelaram que este anestésico pode se ligar a vários sítios no receptor de ACh, podendo se ligar a sítios superficiais, a sítios interunidades do receptor ou até mesmo dentro do poro como foi demonstrado anteriormente. Além disso, muitos estudos utilizando análogos fotorreativos do etomidato como o azietomidato e TDBzL-etomidato evidenciam sítios de ligação para estes agentes nos receptores nicotínicos para Ach, causando sua inibição (ZIEBELL *et al.*, 2004; NIRTHANAN *et al.*, 2008).

A partir do nosso corpo de resultados, sugerimos que o etomidato em doses clínicas é capaz de promover a exocitose de vesículas sinápticas por mecanismo dependente  $Ca^{2+}$  externo. Sugerimos ainda que a liberação do neurotransmissor induzida pelo etomidato inicialmente talvez possa causar excitação dos receptores pós-sinápticos, o que poderia ser relacionado aos movimentos espontâneos após a administração do anestésico, com posterior dessensibilização destes receptores. Entretanto, ainda estamos no campo das hipóteses sendo necessário estudos mais aprofundados para esclarecer este provável mecanismo.

Este trabalho é pioneiro em relacionar a ação de um anestésico amplamente utilizado na clínica médica e seus efeitos na JNM de camundongos, pois os trabalhos enfocando o uso do etomidato foram voltados até aqui, para seus efeitos no SNC (EVANS *et al.*, 1978; ASHTON *et al.*, 1981; PATEL *et al.*, 1995; HERRING *et al.*, 2011). Assim, os resultados expostos neste trabalho poderão ajudar no entendimento de alguns efeitos clínicos deste anestésicos a nível periférico.

## 6- CONCLUSÃO

Este estudo demonstra, por métodos de microscopia óptica de fluorescência, que o anestésico intravenoso etomidato, que é amplamente utilizado na clínica, apresenta ações pré-sinápticas estimulando a exocitose de vesículas sinápticas, e que este efeito ocorre por uma maneira independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mais especificamente atuando em canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q, podendo haver maior contribuição dos canais tipo P.

Utilizando a técnica de eletrofisiologia demonstramos que o etomidato não alterou a frequência nem a amplitude dos registros de MEEP, fato que pode ser explicado pela ação do anestésico nos receptores pós-sinápticos para ACh. Nossos dados sugerem que o etomidato pode alterar o padrão de distribuição dos receptores nicotínicos interferindo assim com a resposta mediada pelos mesmos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOMEN, H.; ZIEGLER, G.; KLOTZ, U. Midazolam kinetics. *Clin . Pharmacol Ther.* v. 30, p. 653-661,1981.

ASHTON, D; GEERTS, R.; WATERKEYN ,C.; E. LEYSEN, J.*Etomidate stereospecifically stimulates forebrain, but not cerebellar, <sup>3</sup>H-diazepam binding.* Life Sciences,V. 29, n. 25, p.2631–2636,1981.

BELELLI, I.; PISTIS, I.; PETERS, J.A.; LAMBERT, J.J. General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci.* v. 20, n. 12, p. 496-502, 1999.

BENNETT M.V. GAP junctions as electrical synapses. *Journal of neurocytology.* v. 26, p. 349-366, 1997.

BETZ, W. J.; MAO, F.; BEWICK, G. S. Activity dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *The Journal of Neuroscience,* v. 12, p.363-375, 1992.

BIENZLE, D.; BOYD, C.J. Sedative effects of ketamine and midazolam in snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *J Zoo Wildl Med.* v.23, n.2, p.201-4, 1992.

BONDARENKO, V.; MOWREY, D.; LIU, L.T.; XU, Y.; TANG, P.NMR resolved multiple anesthetic binding sites in the TM domains of the  $\alpha 4\beta 2$  nAChR. *Biochim Biophys Acta .* v. 18, n. 5, p.1261-8, 2012.

BORGEAT, A.; FUCHS, T.; WILDER-SMITH, O.;TASSONYI, E. The effect ofnalbuphine and droperidol on spontaneous movements during induction of anesthesia with propofol in children. *J Clin Anesth.*1993.

BOVILL, J.G. Intravenous anesthesia for the patient with left ventricular dysfunction. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* v. 10, p43–48, 2006.

BRANNIGAN, G.; LEBARD, D.N.,;HÉNIN, J.; ECKENHOFF, R.G.; KLEIN, M.L. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic

acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci* . v. 107, n. 32, p.14122-7, 2010.

BRAVO, D.; PARSONS, S. M. Microscopic kinects and structure-function analysis in the vesicular acetylcholine transporter. *Neurochem Int.* v. 41, n.5, p. 285-9, 2002.

BRAY, R.J. The propofol infusion syndrome in infants and children: can we predict the risk? *Curr Opin Anaesthesiol.* v. 15, p. 339-342, 2002.

BRAY,R.J. The propofol infusion syndrome in infants and children: can we predict the risk? *Curr Opin Anaesthesiol.* v. 15, p.339-342, 2002.

BREJC, K., VAN DIJK, W.J., KLAASSEN, R.V.; SCHUURMANS, M.; VAN DER OOST, J.; SMIT, A.B.; SIXMA, T.K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* v.411, p.269–276, 2001.

BRUMBACK, A. C.; LIEBER, J. L.; ANGLESON, J. K.; BETZ, W. J. Using FM1-43 to Study Neuropeptide Granule Dynamics and Exocytosis. *Methods*, v.33, n.4, p.287-94, ago. 2004.

BUGGY, D.J.; NICOL, B.; ROWBOTHAM, D.J.; LAMBERT, D.G. Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release: a role for GABAA receptor-mediated inhibition. *Anesthesiology*, V. 92, p. 1067–1073, 2000.

BURNS, M.E; AUGUSTINE, G.J. "Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision". *Cell* . v. 83, p . 187-194 ,1995 .

BUTZ, S; OKAMOTO, M.; SUDHOF, T.C. A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell.* v. 94, p. 773–782, 1998.

CARLOS, R.; CALVO, R.; ERILL, S. Plasma protein binding of etomidate in different age groups and in patients with chronic respiratory insufficiency. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* v.19, p.171–174, 1981.

CARLSON, B.X.; HALES, T.G.; OLSEN, R.W. GABA-A Receptors and Anesthesia., Anesthesia Biologic Foundations. In: Yaksh TL, Lynch C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ, editors. Philadelphia: *Lippincott-Raven*; p. 259–276, 1998.

CECCARELLI, B.; HULBURT, W. P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and *Cell Biology*, v. 133, p. 1237-1250, 1996.

CHAPMAN, E. R. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual CHT1. Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1-12, 2006.

CLERGUE, F.; AUROY, Y.; PEQUIGNOT, F.; JOUGLA, E.; LIENHART, A.; LAXENAIRE, M. C. French survey of anesthesia in 1996. *Anesthesiology*. v. 91, p.1509–1520, 1999.

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*. v.1, n.542(2), p.:225-32, 1991.

COUSIN, M. A.; ROBINSON, P. J. Mechanisms of Synaptic Vesicle Recycling Illuminated by Fluorescent Dyes. *Journal of Neurochemistry*, v.73, n.6, p.2227-39, dez.1999

DINIZ, P.H.; SILVA, J.H.; GOMEZ, M.V.; GUATIMOSIM, C.; GOMEZ, R.S.. Halothane increases non-vesicular [(3)H]dopamine release from brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol*.v. 27, n.6, p.757-70, 2007.

DOENICKE, A.; KUGLER, J.; PENZEL, G.; LAUB, M.; KALMAR, L.; KILLIAN, I.; BEZECNY H. Cerebral function under etomidate, a new non-barbiturate i.v. hypnotic. *Anaesthesist*. v.22, 357-66,1973.

DOENICKE, A.; ROIZEN, M.F.; HOERNECKE, R.; MAYER, M.; OSTWALD, P.; FOSS, J. Haemolysis after etomidate: comparison of propylene glycol and lipid formulations. *Br J Anaesth*. v. 79, p.386–388, 1997.

DOENICKE, A.W.; ROIZEN, M.F.; KUGLER, J.; KROLL, H.; FOSS, J.; OSTWALD, P. Reducing myoclonus after etomidate. *Anesthesiology*.v.90, n. 1, p.113–119,1999.

DUARTE, D.F. Farmacocinética e farmacodinâmica dos anestésicos venosos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 44, n.1, p. 35-42, 1994.

EDOMER, T.; CHARPANTIER, E.; MULLER, D., DUMONT, L.; BERTRAND, D. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Research Bulletin*. v. 57, n. 2, p. 133–150, 2002.

EVANS, R.H.; HILL, R.G. GABA-mimetic action of etomidate. *Experientia*. v. 34, p. 1325–1327, 1978.

FRANKS, N .P.& LIEB, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. v. 367, p. 607-614, 1994.

FRANKS, N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol.*: 147 Suppl 1:S72-81 . 2006.

FRANKS, N. P.& LIEB, W. R. . Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors. *Nature*, 310: 599-601. 1984.

FRANKS, N. P.& LIEB, W. R.. Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science*. 254: 427-430,. 1991.

GAFFIELD, M. A.; BETZ, W. J. Imaging Synaptic Vesicle Exocytosis and Endocytosis with FM Dyes. *Nature Protocols*, v.1, n.6, p.2916-21, 2006.

GANDHI, S. P.; STEVENS, C. F. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature*. v. 423, n. 6940, p. 591-2, 2003.

GIESE, J.L.; STANLEY, T.H. . Etomidate: a new intravenous anesthetic induction agent. *Pharmacotherapy*. v.3, p. 251-258, 1983.

GILSSON, S. N.; EL-ETR, A. A.; BLOOR, B. C. The effect of ketamine upon norepinephrine and dopamine levels in rabbit brain parts. . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. v. 295, n. 2, p. 149-52,1976.

GLASS ,P.A.S.; SHAFER, S.L.; REVES, J.G.; Intravenous Drug Delivery Systems, In: Miller RD – Miller’s Anesthesia, 7 Ed, Philadelphia,Elsevier,p.;825-858,2010.

GLEN, J.B. Animal studies of the anaesthetic activity of ICI 35 868. *Br. J. Anaesth.* v.52, p. 731–742,1980.

GLEN, J.B.; HUNTER, S.C. Pharmacology of an emulsion formulation of ICI 35868. *British Journal of Anaesthesia.* v. 56,p. 617-625, 1984.

GLEN, J.G. Animal studies of the anaesthetic activity of ICI 35 868. *Brit. J. Anaesth.*, v.52, p.731-742, 1980.

GUATIMOSIM, C.; VON GERSDORFF, H. Optical monitoring of synaptic vesicle trafficking in ribbon synapses. *Neurochemistry International.* V. 41,n. 5, , p.307–312 2002.

HALL, Z. W. An Introduction to Molecular Neurobiology. Sunderland, MA: Sinauer, 1992.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell.* v. 72. Suppl:99-121,1993.

HARLOW, M.L.; RESS, D.; STOSCHEK, A.; MARSHALL, R. M.; MCMAHAN, U. J. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* .v. 409, p.479-84, 2001.

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

HERRING, B. E. Etomidate and Propofol Inhibit The Neurotransmitter Release Machinery at Different Sites. *The Journal of Physiology.* v.5, p. 1103-1115, 2011.

HEUSER, J. E.; REESE T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane

HEYKANTS, J.J.P.; BRUGMANS, J; DOENICKE, A. On the pharmacokinetics of etomidate (R26490) in human volunteers: Plasma levels, metabolism, and excretion. *Clinical Research Report.* (R26490/1 Janssen Research Product Information Service), 1975.

HILLYARD, D.R.; MONJE, V.D.; MINTZ, I.M.; BEAN, B.P.; NADASDI, L.; RAMACHANDRAN, J.; MILJANICH, G.; AZIMI-ZOONOOZ, A.; MCINTOSH, J.M.; CRUZ, L.J.; IMPERIAL, J.S.; OLIVERA, B.M. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sub>v</sub>2 channels. *Neuron*. v. 9, p. 69–77, 1992.

HIRNING, L.D.; FOX, A.P.; McCLESKEY, E.W.; OLIVERA, B.M.; THAYER, S.A.; MILLER, R.J.; TSIEN, R.W. Dominant role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*. v. 239, n. 4835, p. 57–61, 1988.

HIROTA, K.; KUDO, M.; KUDO, T.; MATSUKI, A.; LAMBERT, D.G. Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K<sup>+</sup>-evoked norepinephrine and dopamine release from rat striatal slices: possible involvement of P/Q-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Br J Anaesth*. v. 85, n. 6, p. 874–80, 2000.

JANSSEN, P.A.; NIEMEGEREERS, C.J.; MARSBOOM, R.P. Etomidate, a potent non-barbiturate hypnotic: Intravenous etomidate in mice, rats, guinea-pigs, rabbits and dogs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. v. 214, p. 92–132, 1975.

JARMAN, R. History of Intravenous Anaesthesia with Ten Years' Experience in the USE of Pentothal Sodium in a prospective double blind study. *Postgrad Med J*. v. 22, n. 252, p. 311–318, 1946.

JOHNSON, G.V.; HARTZELL, C.R. Choline Uptake, Acetylcholine Synthesis and Release, and Halothane Effects in Synaptosomes. *Anesth Analg*. v. 64, n. 4, p. 395–9, 1985.

JOKSOVIC, P.M.; BRIMELOW, B.C.; MURBARTIAN, J.; PEREZ-REYES, E.; TODOROVIC, S.T. Contrasting anesthetic sensitivities of T-type Ca<sub>v</sub>2 channels of reticular thalamic neurons and recombinant Cav3.3 channels. *British Journal of Pharmacology*. v. 144, P. 59–70, 2005.

KARIS, J.H.; GISSEN, A.J.; NASTUK, W.L. Mode of action of diethyl ether in blocking neuromuscular transmission. *Anesthesiology*. v. 27, n. 1, p. 42–51, 1966.

KATZ, B. Nerve, Muscle and Synapse. New York: McGraw-Hill Book Company, 1966.

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.

KAY, B.; ROLLY, G. Total intravenous anesthesia with etomidate part III. Some observations in adults. *Acta Anaesthesiol Belg.* v. 28, p.157–164, 1977.

KENDALL, T.J.; MINCHIN, M.C. The effects of anesthetics on the uptake and release of amino acid neurotransmitters in thalamic slices. *Br J Pharmacol* . v. 75, p. 219-227, 1982.

KINDLER, C. H.; EILERS, H.; DONOHOE, P.; OZER, S.; BICKLER, P. *Volatile Anesthetics Increase Intracellular Calcium in Cerebrocortical and Hippocampal Neurons* *Anesthesiology*, v.90, n.4 , p 1137–1145,1999

KREIGER, W.; COPPERMAN, J.; LAXER, D.L. Seizures with etomidate anesthesia. *Anesth Analg* . v.64, p.1226–1227,1985

KRIEGER, W.; COPPERMAN, J.; LAXER, K.D. Seizures with etomidate anesthesia [letter]. *Anesth Analg.* v.64, p.1226-7,1985.

KUMMER, T. T.; MISGELD, T.; SANES, J. R. Assembly of the Postsynaptic Membrane at the Neuromuscular Junction: Paradigm Lost. *Current Opinion in Neurobiology.* v.16, n.1, p.74-82, 2006.

LEITE, L.F.; GOMEZ, R.S.; FONSECA, C. M.; GOMEZ, M.V.; GUATIMOSIM, C. *Effect of intravenous anesthetic propofol on synaptic vesicle exocytosis at the frog neuromuscular junction.* *Acta Pharmacologica Sinica* . v. , n.32, p. 31–37, 2011.

LEVEQUE .C; EL FAR, O.; MARTIN-MOUTOT, N; , SATO, K.; , KATO, R.; TAKAHASHI, M; SEAGAR, M.J .Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem.*v.269, p. 6306–6312, 1994.

LICHTMAN, J. W.; WILKINSON, R. S.; RICH, M. M. Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. *Nature* v. 314 n. 6009, p. 357-9, 1985.

LIU YEN-CHING; YA-JEAN WANG ; SHENG-NAN WU. The mechanisms of propofol-induced block on ion currents in differentiated H9c2 cardiac cells. *European Journal of Pharmacology* p. 93–98 ,2008.

MARTELLA G., C. PERSIS, P. BONSI, S. NATOLI, D. CUOMO, G. BERNARDI, P. CALABRESI, A. PISANI. Inhibition of Persistent Sodium Current Fraction and Voltagegated L-type Calcium Current by Propofol in Cortical Neurons: Implications for Its Antiepileptic Activity. *Epilepsia*, v. 46, n.5:, p.624–635, 2005.

MEIER, C.; DERMIETZEL, R. Electrical synapses-gap junctions in the brain. *Results Probl Cell Differ.* v. 43, n. 99, p128, 2006.

MILLER, R.J. Multiple calcium channels and neuronal. *Science.* v. 2, p. 46-52, 1987.

MILLER, S. L. A theory of gaseous anesthetics. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v.47, p.1515-1524, 1961.

MODICA. P.A., TEMPELHOFF, R.; WHITE, P.F. Pro- and anticonvulsant effects of anesthetics (Part II). *Anesth Analg*;v.70, p.433-44,1990.

MORGAN, M.; LUMLEY, J.; WHITWAM, J.G. "Etomidate, a new water-soluble non-barbiturate intravenous induction agent" . *The Lancet.* v.305, p. 7913, 1975.

MORGAN, M.; LUMLEY, J.; WHITWAM, J.G. Etomidate, a new water-soluble non-barbiturate intravenous induction agent. *Lancet.*; v. 321, p. 955–956, 1975.

MURTHY, N. V; DE CAMILLI, P. Cell Biology of the Presynaptic Terminal. *Annual Rev. Neurosci.* v. 26, p.701–28, 2003.

MURUGAIAH, K.D.; HEMMINGS, H.C. Effects of intravenous general anesthetics on [3H]GABA release from rat cortical synaptosomes. *Anesthesiology* . v. 89, n. 4, p. 919-28, 1998.

NARAHASHI, T. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* . v.84, n. 5, p.147-54, 2008.

NGUYEN, M. L.; COX, G. D.; PARSONS, S. M. Kinetic Parameters of the Vesicular Acetylcholine Transporter: Two Protons are Exchanged for One Acetylcholine. *Biochemistry*, v. 37, p. 13400-13410, 1998.

NICOLL, R.A. The effects of anaesthetics on synaptic excitation and inhibition in the olfactory bulb. *J Physiol*.v. 223, p. 803-14,1972.

NIRTHANAN, S.; GARCIA, G.; CHIARA, D.C.; HUSAIN, S.S; COHEN, J.B . Identification of Binding Sites in the Nicotinic Acetylcholine Receptor for TDBzl-etomidate, a Photoreactive Positive Allosteric Effector. *J Biol Chem*. v. 283, n.32, p.:22051-62, 2008.

NOWYCKY, M.C., FOX, A.P. & TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*. v. 316, p. 440-443 , 1985.

NYMAN, Y.; VON HOFSTEN, K.; PALM, C.; EKSBERG, S.; LONNQVIST, P.A. Etomidate-lipuro is associated with considerably less injection pain in children compared with propofol with added lidocaine. *Br J Anaesth*. v. 97, p. 536–539, 2006.

OKADA, R.; NEGISHI, N.; NAGAYA, H. The role of the nigrothalamic GABAergic pathway in the propagation of pentylenetetrazol seizures. *Brain Res*. v. 480, p. 383-387,1989.

OLIVEIRA,B.M.; MILJANICH, G.P.; RAMACHANDRAN, J; ADAMS, M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 63, p. 823-867, 1994.

ORSER, B.A.; WANG, L.Y.; PENNEFATHER, P.S.; MACDONALD, J.F. Propofol modulates activation and desensitization of GABAA receptors in cultured murine hippocampal neurons. *J Neurosci*. v. 14, n.12, p.7747-60,1994.

PANG and SUDHOF. Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*. v. 22, n. 4, p. 496–505, 2010.

PASHKOV, V.N.; HEMMINGS JR, H.C. The effects of general anesthetics on norepinephrine release from isolated rat cortical nerve terminals. *Anesth Analg* . v. 95, n. 5, p. 1274-81, 2002.

PATEL,P. M.; GOSKOWICZ,R. L.; DRUMMOND, J. C; COLE,D. J. Etomidate reduces ischemia-induced glutamate release in the hippocampus in rats subjected to incomplete forebrain ischemia. *A & A*, v. 80, n. 5,p.933-939, 1995.

POCOCK,G.; RICHARDS, C.D. Excitatory and inhibitory synaptic mechanisms in anaesthesia. *Br J Anaesth*. v. 71, p.134-47,1993.

POHORILLE, A.; WILSON, M. A. ; NEW, M. H. ; CHIPOT, C. Concentrations of anesthetics across the water–membrane interface; the Meyer–Overton hypothesis revisited. *Toxicology Letters*. v. 23, p. 421–430, 1998.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, V. F.; MELLO, M. C. de; GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International*. v. 41, p. 291-299, 2002.

PYLE, J. L.; KAVALALI, E. T.; PIEDRAS-RENTERIA, E. S.; TSIEN, R. W. Rapid reuse of readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*. v. 28, p. 221-231, 2000.

RANDALL, A; TSIEN, R.W. Pharmacological dissection of multiple types of calcium channel currents in rat cerebellar neurons. *J. Neurosci*.v.15,p. 2995 ± 3012,1995.

RATNAKUMARI, L.; HEMMINGS JR, H.C. Effects of propofol on sodium channel dependent sodium influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. *Anesthesiology*. v. 86, n. 2, p. 428-39,1997.

RATNAKUMARI, L.; HEMMINGS, H.C . Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane. *Anesthesiology*. V. 88, P. 1043-1054, 1998.

RIBCHESTER, R.R.; MAO F.; BETZ, W. J. Optical measurements of activity dependent membrane recycling in motor nerve terminals of mammalian skeletal muscle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 255, n. 1342, p. 61-66, 1994.

RIBEIRO, F. M.; BLACK, S. A. G.; PRADO, V. F.; RYLETT, R. J.; FERGUSON, S. S. G.; PRADO, M. A. M.. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *Journal of Neurochemistry*. v. 97, p. 1-12, 2006.

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. *Neuron*. v. 27, p. 551-559, 2000.

RIZO, J.; SÜDHOF, T. C. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience*. v. 3, n. 8, p. 641-53, 2002.

RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic Vesicle Pools. *Nature Reviews/Neuroscience* v. 6, p. 57-69, 2005.

ROBITAILLE, R.; ADLER, E. M.; CHARLTON, M. P. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* . v. 5, n. 6, p.:773-9, 1990.

ROYLE, S. G.; LAGNADO L. Endocytosis at the synaptic terminal. *The Journal of Physiology*, v. 553, n. 2, p. 345-355, 2003.

RUBBOLI, G.; TASSINARI, C.A. An overview of its clinical features, pathophysiological mechanisms, and management. *Neurophysiol Clin* . v. 36, n. 5-6, p.337-43, 2006

RUSCH, D.; ZHONG, H.; FORMAN, S.A. Gating allosterism at a single class of etomidate sites on alpha1beta2gamma2L GABA A receptors accounts for both direct activation and agonist modulation. *J Biol Chem*.v. 279 , p.20982-20992, 2004.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Induction, Assembly, Maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*. v.2, n. 11, p. 791-805, 2001.

SCHELLER, M.; BUFLER, J.; SCHNECK, H.; KOCHS, E. FRANKE, C. Isoflurane and sevoflurane interact with the nicotinic acetylcholine receptor channels in micromolar concentrations. *Anesthesiology*. v. 86, n.1, p.:118-27,1997.

SCHWEIZER, F. E.; RYAN, T. A. The Synaptic Vesicle: Cycle of Exocytosis and Endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, v.16, p.298-304, 2006.

SHENG, Z.; RETTIG, J.; TAKAHASHI, M.; CATTERALL, W.A. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron*. v.13, p.:1303–1313, 1994.

SHIGEMURA, T.; HATAKEYAMA, N.; SHIBUYA, N.; YAMAZAKI, M.; MASUDA, A.; CHEN, F.S.; MOMOSE, Y.; ITO, Y. Effects of propofol on contractile response and electrophysiological properties in single guinea-pig ventricular myocyte. *Pharmacol. Toxicol.* v. 85,p. 111–114, 1999.

SILVA, J.H.; GOMEZ, R.S.; DINIZ, P.H.; GOMEZ, M.V.; GUATIMOSIM, C. The effect of sevoflurane on the release of [3H]dopamine from rat brain cortical slices. *Brain Res Bull.* v. 72, n. 4-6, p. 309-14, 2007.

SINE, S.M.; ENGEL, A.G. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*. v. 23, n.;440(7083), p.448-55, 2006.

SMITH, D. J.; WESTFALL, D. P.; ADAMS, J. D. Ketamine interacts with opiate receptors as an agonist. *Anesthesiology*. v.53, n.5, 1980.

SNODGRASS, S.R. Myoclonus: analysis of monoamine, GABA, and other systems. *FASEB J.* v.4, n.10, p.2775-88, 1990.

SÖLLNER, T.; BENNETT, M. K.; WHITEHEART, S. W.; SCHELLER, R. H.; ROTHMAN, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, v. 75, n. 3, p. 409-18, 1993.

SOLT AND FORMAN, K. SOLT AND S.A. FORMAN. Correlating the clinical actions and molecular mechanisms of general anesthetics, *Curr. Opin. Anesthesiol.* v. 20 p. 300–306, 2007.

SUNG, Y.F; FREDERICKSON, E. L.; HOLTZMAN, S.G. Effects of intravenous anesthetics on brain monoamines in the rat. *Anesthesiology*. v. 39, n. 5, p. 478-87, 1973.

TAKEI, K.; MUNDIGL, O.; DANIELL, L.; DE CAMILLI, P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *The Journal of Cell Biology*, v. 133, p. 1237-1250, 1996.

TAKEYASU, Y.; HARADA, K.; OKAMURA, A.; Kemmotsu, O. Is the site of action of Ketamine the N-methyl-D-aspartate? *Anesthesiology*. v.72, p. 704-710,1990.

TASSINARI, C.A.; RUBBOLI,G.; SHIBASAKI, H,Neurophysiology of positive and negative myoclonus. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*.v. 107, n.3, p.181–195,1998.

TODOROVIC, S.M.; LINGLE, C.J. Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol*. v.79, n.1, p.240-52, 1998.

TORREJAIS, M.M.; SOARES, J.C.; MATHEUS, S.M.; CASSEL, F.D.; MELLO, J.M.; BASSO, N.A . Histochemical and SEM evaluation of the neuromuscular junctions from alcoholic rats. *Tissue Cell*. v. 34, n. 2, p.117-23, 2002.

WATT, I.; LEDINGHAM, I. M.Mortality amongst multiple trauma patients admitted to an intensive therapy unit *Anaesthesia*. v. 39, p. 973 – 981,1984.

WATT, I.; LEDINGHAM, I.M. Mortality amongst multiple trauma patients admitted to an intensive therapy unit. *Anaesthesia*. ; v.39, n.10, p.973-81,1984.

WESTPHALEN, R.I; HEMMINGS JR., H.C. Selective depression by general anesthetics of glutamate versus GABA release from isolated cortical nerve terminals. *J Exp Pharmacol Ther*. v. 304, n. 3, p.1188-96, 2003.

WHITE, P. F. Propofol: pharmacokinetic and pharmacodynamics, *Seminars in anesthesia*. v. 7, p. 4-20, 1988.

WHITE, P. F. What's new in intravenous anesthesia.IARS. *Review courses lectures*, p. 105-114, 1990.

WHITE, P. F.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. Ketamine - The pharmacology and therapeutic uses. *Clin Pharmacol Ther*. v.6, p.279–291, 1965.

WINTERS, W. D. Effects of anesthetic drugs on the electrical activity of the brain. *Annu. Rev. Pharmacol.* v.16,p. 413-426,1976.

WOOD, M. Plasma drug binding: implications for anesthesiologists. *Anesth Analg* v. 65, n 7, p.:786-804,1986.

WRIGHT'CHRISTINE, E; ANGUS, J. A. Effects of N-, P- and Q-type neuronal calcium channelantagonists on mammalian peripheral neurotransmission. *Brifish Journal of Pharmacology.* v. 119, p. 49-56,1996.

XIE, Z.; CURRIE, K.P.; FOX, A.P. Etomidate elevates intracellular calcium levels and promotes catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* v. 1, n. 560 (Pt 3), p. 677-90, 2004.

XIE, Z.; MCMILLAN, K.; PIKE, C.M.; CAHILL, A.L.; HERRING, B.E. WANG, Q.;FOX, A.P . Interaction of Anesthetics with Neurotransmitter Release Machinery Proteins. *J Neurophysiol* . 2012

YANG.J.; UCHIDA, I. Mechanisms of etomidate potentiation of GABAA receptor-gated currents in cultured postnatal hippocampal neurons.. *Neuroscience.*v. 73, p.69-78, 1996.

ZACHARIAS, M.; CLARKE, R.S.; DUNDEE, J.W.; JOHNSTON, S.B. Evaluation of three preparations of etomidate. *Br J Anaesth.* v. 50, p. 925–929, 1978.

ZAKKO, S.F.; SEIFERT, H.A.; GROSS, J.B. A comparison of midazolam and diazepam for conscious sedation during colonoscopy in a prospective double-blind study. *Gastrointest Endosc.* v.49, n. 6, p. :684-9, 1999.

ZED, P.; MABASA, V.; SLAVIK, R. Etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department: Is adrenal suppression a concern? *Can J Emerg Med.* v. 8, p 347-50, 2006.

ZHAI, R. G.; BELLEN, H. J. The Architecture of the Active Zone in the Presynaptic Nerve Terminal. *Physiology*, v.19, p. 262-270, 2004.

ZIEBELL, M.R.;NIRTHANAN, S.; HUSAIN, S.S.; MILLER, K.W.; COHEN, J.B. Identification of Binding Sites in the Nicotinic Acetylcholine Receptor for [<sup>3</sup>H] Aziatomidate, a Photoactivatable General Anesthetic . *J Biol Chem*, V. 23, n. 17, p. 17640-9,2004.