

Janice Henriques da Silva

Efeito dos anestésicos inalatórios no transportador de dopamina em  
fatias de córtex cerebral de ratos

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação  
em Ciências Biológicas: Farmacologia  
Bioquímica e Molecular da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor  
em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Profa. Cristina Guatimosim Fonseca**

**Co-Orientador: Prof. Renato Santiago Gomez**

**BELO HORIZONTE**

**2006**

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com o auxílio das seguintes instituições:

Agência Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

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

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

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

Programa Avançado de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT).

Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX).

*Ao meu marido Pedro, pelo amor, compreensão e apoio.*

*Aos meus pais, Rosa de Maio e José Henriques, sempre presentes.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, que sempre ilumina meus passos.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez que me acolheu no laboratório de Neurofarmacologia, pela atenção, boa vontade, esclarecimentos de minhas dúvidas e suporte científico que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo.

Aos meus orientadores, Cristina Guatimosim Fonseca e Renato Santiago Gomez, pela iniciação no campo da pesquisa, confiança, ensinamentos e orientação na realização deste trabalho.

Aos professores Antônio Mourthê Filho e Edmundo Pereira que foram meus maiores incentivadores, pelos conselhos e amizade.

À professora Virgínia M. Vidigal Fernandes pela contribuição neste trabalho, conselhos e amizade. Muito obrigada.

Aos professores Marco Antônio Máximo Prado e Helton Reis pelas sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Paulo Henrique Diniz e Juliara Márcia Henriques da Silva pela ajuda na realização dos experimentos e pelas sugestões científicas..

A Adriane Aparecida pela amizade e ajuda no dia-a-dia do laboratório.

Às minhas amigas especiais: Aninha, Mel e Lucimar pela sincera amizade, conselhos e sugestões que contribuíram para este trabalho.

Às minhas novas amigas Luciene, Grace e Andréia por estarem sempre disponíveis para solucionar minhas dificuldades, pela ajuda nas diversas situações e pela amizade.

Às minhas maravilhosas irmãs: Júnia e Juliara pelo carinho em todos os momentos importantes de minha vida.

Aos meus amigos do laboratório : Cristina Martins , Bráulio, Célio, Daniela, Hernani, Bento, Débora, Renan, Fabiana, Bruno Resende, Alan, Monaliza, Rodrigo, pela ótima convivência e amizade.

Aos amigos e colegas da PUC MINAS, FUMEC e UNINCOR pelo apoio consistente e incentivo carinhoso.

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de Quadros.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>XV</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XVI</b>

### **1 Introdução**

1.1 Anestésicos inalatórios .....	02
1.1.1 Efeito dos anestésicos inalatórios no Sistema Nervoso Central .....	03
1.1.2 Mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios .....	05
1.1.3 Efeitos dos anestésicos inalatórios na liberação de dopamina.....	08
1.2 Transmissão dopaminérgica.....	10
1.2.1 Localização dos neurônios dopaminérgicos .....	10
1.2.2 Síntese e metabolismo da DA.....	11
1.2.3 Liberação de dopamina.....	12
1.2.3.1 Liberação dependente de cálcio .....	12
1.2.3.2 Liberação independente de Ca <sup>2+</sup> .....	14
1.2.4 Receptores Dopaminérgicos.....	17
1.2.5 Relevância Clínica.....	18

<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	
2.1-	Objetivo Geral .....	21
2.2-	Objetivos Específicos .....	21
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b>	
3.1	Drogas e Reagentes.....	24
3.2	Soluções .....	25
3.3	Animais .....	27
3.4	Determinação da liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos .....	28
3.4.1	Obtenção das fatias de córtex cerebral de ratos .....	28
3.4.2	Marcação das fatias com [ <sup>3</sup> H]-DA .....	28
3.4.3	Lavagem das fatias com DA não radioativa .....	28
3.4.4	Incubação das fatias .....	29
3.4.5	Administração e mensuração da concentração do sevoflurano e halotano.....	29
3.4.6	Contagem da radioatividade do sobrenadante .....	30
3.4.7	Análise estatística dos resultados.....	30
3.5	– Mensuração de fosfato em fatias de córtex cerebral de ratos .....	30
3.5.1	Obtenção das fatias de córtex cerebral de ratos.....	31
3.5.2	Incubação das fatias e administração das drogas.....	32
3.5.3	Mensuração de fosfato no meio de incubação .....	32
3.5.4	Análise estatística dos resultados .....	33

## 4 Resultados

4.1 Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos na presença do sevoflurano e halotano .....	35
4.2 Efeito do tempo de incubação na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	39
4.3 Determinação do papel do íon cálcio na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	42
4.4 Participação dos canais de sódio sensíveis à TTX na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	46
4.5 Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença da reserpina.....	49
4.6 Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (12 °C).....	52
4.7 Efeito do gradiente de Na <sup>+</sup> na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	55
4.8 Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de inibidores do DAT .....	58
4.9 O papel do transportador de noradrenalina (NET) na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	61
4.10 Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença da ouabaína. ....	64
4.11 A participação da bomba Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase na liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	68

4.12 Efeito do sevoflurano, halotano e GBR12909 na captação da DA em fatias de córtex cerebral de ratos .....	72
<b>5 Discussão e Conclusão .....</b>	<b>76</b>
<b>6 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>92</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{Ci}$	micro Curie
$\mu\text{M}$	micro Molar
$[^3\text{H}]$ dopamina	dopamina triciada
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	concentração de cálcio livre no citosol
$[\text{Na}^+]_i$	concentração de sódio livre no citosol
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BABTA-AM	1,2-bis (O-aminofenoxi) etano-N,N,N',N' ácido tetra (acetoximetil) éster
BIS	índice biespectral
$\text{Ca}^{2+}$	íons cálcio
$\text{Cd}^{2+}$	Cádmio
CCSV	canais de cálcio sensíveis à voltagem
$\text{Cl}^-$	íons cloreto
COMT	enzima catecol-O -metiltransferase
CSSV	canais de sódio sensíveis à voltagem
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
DAT	transportador de dopamina
Dpm	desintegração por minuto
$\text{EC}_{50}$	concentração efetiva capaz de liberar 50% da liberação máxima
EGTA	ácido etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino éter) N,N,N',N'-tetraacético
EEG	Eletroencefalograma
EPM	erro padrão da média
GABA	ácido $\delta$ -aminobutírico
KCl	cloreto de potássio
MAO	enzima monoaminoxidase
NA	noradrenalina
$\text{Na}^+$	íons sódio
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	trocador sódio-cálcio
NMDA	N-metil D-aspartato
POPOP	1,4-bis 2 (5-feniloxazolil) benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Rpm	rotação por minuto
SNC	sistema nervoso central
SRAA	sistema reticular ativador ascendente
TTX	tetrodotoxina
VMAT	transportador vesicular das monoaminas

## Lista de Figuras

Figura 1: Dose-resposta do sevoflurano na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos.....	37
Figura 2: Dose-resposta do halotano na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos.....	38
Figura 3: Curva de tempo de incubação do sevoflurano na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos.....	40
Figura 4: Curva de tempo de incubação do halotano na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA em fatias de córtex cerebral de rato.....	41
Figura 5: Efeito do EGTA, Cd <sup>2+</sup> e BAPTA na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	43
Figura 6: Efeito do EGTA, Cd <sup>2+</sup> e BAPTA na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	44
Figura 7: Efeito do EGTA, Cd <sup>2+</sup> e BAPTA na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por KCl em fatias de córtex cerebral de ratos.....	45
Figura 8: Efeito da TTX na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	47
Figura 9: Efeito da TTX na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	48

Figura 10: Efeito da reserpina na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	50
Figura 11: Efeito da reserpina na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	51
Figura 12: Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (12 °C) .....	53
Figura 13: Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (12 °C) .....	54
Figura 14: Efeito do gradiente de Na <sup>+</sup> na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	56
Figura 15: Efeito do gradiente de Na <sup>+</sup> na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida pelo halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	57
Figura 16 : Efeito da nomifensina e do GBR12909 na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	59
Figura 17 : Efeito da nomifensina e do GBR12909 na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	60
Figura 18 : Efeito da nisoxetina na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.....	62
Figura 19 : Efeito da nisoxetina na liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos .....	63

Figura 20: Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína .....	66
Figura 21: Liberação de [ <sup>3</sup> H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína .....	67
Figura 22: Liberação de fosfato inorgânico em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína e/ou sevoflurano .....	70
Figura 23: Liberação de fosfato inorgânico em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína e/ou halotano .....	71

## Lista de Tabelas

TABELA 1 - Contagem da radioatividade das fatias de córtex cerebral de ratos na presença do sevoflurano.....	74
TABELA 2 Contagem da radioatividade das fatias de córtex cerebral de ratos na presença do halotano.....	75

## **Lista de Quadros**

QUADRO 1– Vias dopaminérgicas do SNC.....	11
---	----

## Resumo

Os anestésicos inalatórios parecem afetar a transmissão sináptica, mas suas ações no sistema nervoso central permanecem obscuras. A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico que exerce importantes funções no sistema nervoso central e, assim, é possível que a sua liberação possa ser modulada pelos anestésicos inalatórios. Dessa forma, a investigação dos efeitos dos anestésicos na liberação deste neurotransmissor pode fornecer informações adicionais em relação aos mecanismos que contribuem com as ações destes agentes durante a anestesia. No presente estudo, fatias de córtex cerebral de ratos foram marcadas com [<sup>3</sup>H]dopamina objetivando-se estudar o efeito dos anestésicos inalatórios, sevoflurano e halotano, na liberação deste neurotransmissor. O sevoflurano (0,46 mM) e o halotano (0,048 mM) aumentaram significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]dopamina em fatias de córtex cerebral de ratos. Esse efeito foi independente do cálcio extra e intracelular, além de não ter sido afetado pela presença da TTX (bloqueador dos canais de sódio sensíveis a voltagem) e reserpina (inibidor do transportador vesicular das monoaminas). Esses dados sugerem que a liberação de dopamina induzida pelos anestésicos é independente dos processo excitatório e que, possivelmente, essa liberação pode ser via transportador de dopamina. Experimentos realizados em baixa temperatura ou com diminuição do íon sódio no meio de incubação indicaram que a liberação de dopamina induzida pelos anestésicos foi significativamente reduzida. Esse efeito também foi observado quando utilizou-se inibidores do transportador de dopamina e noradrenalina (GBR12909 e nisoxetina, respectivamente). A ouabaína, um inibidor da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, é conhecida por estimular a liberação de dopamina via transportador de membrana. Na presença desta droga a resposta evocada pelos anestésicos foi reduzida. No entanto, experimentos adicionais mostraram que os anestésico halotano e sevoflurano não inibem a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Em conclusão, este estudo indica que o sevoflurano e o halotano aumentam a liberação de dopamina em fatias de córtex cerebral de ratos principalmente a partir de transportadores de membrana desse neurotransmissor.

## Abstract

Inhalatory anesthetics affect synaptic transmission, but little is known about their actions in the central nervous system. Dopamine is a catecholaminergic neurotransmitter that has important functions in the central nervous system and it is possible that its release can be modulated by inhalatory anesthetics. The study of inhalatory anesthetics effects in the neurotransmitter release could provide further information about the mechanisms that contribute with the actions of these agents during anesthesia. In this study, cortical slices of rat brain were labeled with [<sup>3</sup>H] dopamine to observe the effects of sevoflurane and halothane in the release of this neurotransmitter. Dopamine release was significantly increased in the presence of sevoflurane (0,46 mM) and halothane (0,048 mM) were incubated. This effect was independent of extracellular or intracellular calcium, and it was not affected by TTX (blocker of voltage dependent sodium channels) or reserpine (an blocker of vesicular monoamine transporter). These data suggest that dopamine release induced by anesthetics is independent of the exocytotic process and that this release would be mediated by the dopamine transporter. Experiments using low temperature or by decreasing sodium concentration in the incubation media indicated that dopamine release induced by anesthetics was considerably reduced. The same effect was also observed when dopamine and noradrenaline transporter inhibitors were used (GBR12909 and nisoxetine, respectively). Ouabain, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump inhibitor, is known for stimulating dopamine release through the membrane transporter. In its presence, the evoked response by anesthetics was decreased. Nevertheless, further experiments demonstrated that halothane and sevoflurane did not inhibit the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump. In conclusion, our study strongly suggests that halothane and sevoflurane increase dopamine release in cortical slices of rat brain and that this release is mediated by the dopamine transporter present in the plasma membrane.



# **1. Introdução**

## 1.1 Anestésicos inalatórios

Os anestésicos inalatórios são utilizados como auxiliares em procedimentos cirúrgicos visando deixar o paciente inconsciente e insensível aos estímulos dolorosos. Em 1846, o dentista William W. Morton introduziu a anestesia com éter em cirurgias. Assim, a anestesia geral é, por razões históricas, uma técnica inalatória que, através do estudo dos diversos anestésicos voláteis que foram surgindo, possibilitou o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de muitas especialidades cirúrgicas. No entanto, apesar de passado mais de um século, o mecanismo de ação desses agentes voláteis não está bem esclarecido e permanece controverso (Antlkowiak, 2001).

Os anestésicos inalatórios constituem um grupo heterogêneo de agentes, incluindo o éter, o halotano, o sevoflurano, o isoflurano, dentre outros. O halotano, introduzido em 1956, foi o primeiro de uma série de agentes anestésicos não inflamáveis. Ele possui propriedades que permitem uma perda de consciência rápida, entretanto a sua margem de segurança não é ampla. Dentre as reações adversas desse anestésico podemos citar a depressão cardiovascular com queda da pressão sanguínea e frequência cardíaca (Saraiva e cols., 2002). O sevoflurano é um agente anestésico halogenado caracterizado por um baixo coeficiente de partição sangue:gás, permitindo uma rápida indução e recuperação anestésica. Esse anestésico foi sintetizado nos Estados Unidos em 1968 e, somente em 1990 foi liberado para uso clínico no Japão e se tornou disponível na Inglaterra e América em 1995. Atualmente, esse anestésico inalatório tem sido largamente utilizado na prática clínica, pois além de possuir baixo coeficiente de solubilidade no sangue e no tecido adiposo, proporciona pouca irritação respiratória durante a indução e o seu cheiro é mais aceitável pelos pacientes. Além disso, uma característica clínica importante observada na presença de sevoflurano é que, ao contrário de outros anestésicos voláteis, como o halotano e isoflurano, este não altera a frequência cardíaca (Patel e cols., 1996; revisto por Duffy & Matta, 2000).

### **1.1.1 Efeito dos anestésicos inalatórios no Sistema Nervoso Central**

Os anestésicos inalatórios são administrados sistemicamente e exercem seus principais efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Estabelecer como os anestésicos inalatórios agem se torna difícil, principalmente pelo fato de que o SNC é extremamente complexo e, apesar dos progressos obtidos, temos apenas um conhecimento rudimentar sobre a sua fisiologia. Há relatos em diversos estudos de que os anestésicos voláteis atuam em diferentes locais do SNC (Collins e cols., 1995; Antognini e cols., 2000). No entanto, ainda não foi possível explicar de modo específico onde se inicia a descontinuidade da condução do impulso nervoso para produzir amnésia, inconsciência e imobilidade.

Atualmente existem muitos estudos em animais demonstrando que os anestésicos inalatórios atuam na medula espinal dificultando a transmissão do impulso nervoso para o tálamo e córtex cerebral (Antognini e cols., 2000). Sendo a medula uma região que recebe estímulos e envia respostas à maior parte do corpo, é possível que a ação imobilizante destes agentes se processe inicialmente nas estruturas medulares, mas a inconsciência e amnésia ocorrem como resultado da ação dos anestésicos voláteis em regiões supraespinais (Eger e cols., 1997).

Os anestésicos inalatórios diminuem de forma global o fluxo sanguíneo e o metabolismo de glicose e deprimem, seletivamente, várias regiões supraespinais. Por exemplo, baixas concentrações de isoflurano reduzem a ativação cerebral em várias regiões distintas do córtex. No entanto, a atividade no córtex motor, córtex visual e regiões subcorticais permanece inalterada (Heinke e cols., 2001). Um outro estudo demonstra que os anestésicos inalatórios, como o enflurano, o isoflurano e o sevoflurano, diminuem o metabolismo cortical e induzem a inconsciência em concentrações abaixo daquelas necessárias para suprimir a resposta motora ao estímulo doloroso (Campagna e cols., 2003).

Apesar de não se saber quais as regiões específicas do encéfalo que são alvos dos anestésicos inalatórios, uma atenção especial tem sido focalizada nas estruturas que desempenham papel relevante na regulação da consciência. Várias hipóteses sobre o estado da consciência têm sido postuladas nas últimas décadas, mas ainda não estão bem estabelecidas as regiões do SNC responsáveis pela regulação desse estado (John, 2001). Acredita-se que a consciência seja uma função integrativa de muitas áreas do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal, frontal, pré-central e para-central, além do tálamo, sistema límbico e gânglios da base segundo a teoria integrativa (“theoretical framework”) (Edelman, 2003). De acordo com essa teoria, a consciência resulta da integração de muitos “inputs” oriundos de diferentes áreas cerebrais e esta integração ocorreria em um período de tempo menor que 500 ms. Assim, os anestésicos inalatórios podem induzir a perda da consciência pela inibição de uma área específica ou pela depressão de várias áreas integradas à consciência.

Os estudos têm focalizado os núcleos intralaminares do tálamo como centro de integração da consciência através das diversas conexões com o córtex e o sistema reticular ativador ascendente (SRAA) (revisto por Perry e cols., 1999). É importante ressaltar também que o tálamo, há muito tempo, é considerado como órgão integrante das vias ascendentes, sendo admitido que o centro da percepção da dor é parte de sua estrutura que tem conexões com o córtex cerebral onde a sensibilidade dolorosa é conscientizada e classificada. Além disso, a avaliação tomográfica das regiões de “consumo” de glicose em voluntários com anestesia profunda indica que o tálamo e o SRAA do tronco encefálico têm metabolismo de glicose mais alterado que outras regiões (Campagna e cols, 2003). Assim, é possível que a ação dos anestésicos gerais se relacione com a inibição da sensibilidade dolorosa no tálamo.

O SRAA, o tálamo, a ponte, a amígdala e o hipocampo estão envolvidos na cognição, memória, aprendizagem, sono e vigília. Há evidências da ação dos anestésicos

inalat6rios sobre o SRAA. Sendo esta estrutura muito importante no estado de vig6lia, 6 poss6vel que os f6rmacos que induzem o sono e a inconsci6ncia possam ter a6o sobre a mesma. Dados experimentais demonstraram inibi6o reversa do SRAA do tronco encef6lico pelos anest6sicos gerais (Clark & Rosner, 1973). Entretanto, foi demonstrado que les6es extensas no SRAA suprimem a resposta eletroencefalogr6fica 6 estimula6o, por6m os animais continuam completamente despertos (Feldman & Waller, 1962). Portanto n6o h6 evid6ncias experimentais de que o SRAA seja o 6nico ou mesmo o local principal de a6o dos anest6sicos inalat6rios.

Estudos realizados com eletroneuromonitora6o proporcionaram novas evid6ncias para o local e o mecanismo de a6o dos anest6sicos gerais. Esses agentes alteram a amplitude e a lat6ncia das ondas do eletroencefalograma (EEG), indicando que h6 a6o desses f6rmacos principalmente sobre o c6rtex cerebral. A an6lise biespectral do EEG 6 expressa pelo 6ndice biespectral (BIS) que tem valores de 0 a 100, sendo que 100 corresponde ao m6ximo de vig6lia e 0 ao m6ximo de inconsci6ncia. Durante o estado anest6sico o BIS est6 sempre abaixo de 50, geralmente em torno de 40. Ao despertar est6 pr6ximo de 90 (Sebel e cols., 1997).

Contudo, embora existam muitos dados sobre os efeitos anest6sicos nas v6rias regi6es do enc6falo, nenhum conjunto de dados 6 suficientemente completo ou consistente a ponto de permitir a conclus6o de que os anest6sicos produzem suas a6es atrav6s de um efeito espec6fico em determinada regi6o do SNC.

### **1.1.2 Mecanismo de a6o dos anest6sicos inalat6rios**

Os anest6sicos inalat6rios como 6ter, 6xido nitroso, xen6nio, halotano, sevoflurano, entre outros, constituem um grupo heterog6neo de subst6ncias que, juntas, n6o pertencem a

nenhuma classe química reconhecível. As teorias sobre a anestesia geral surgiram na tentativa de explicar como compostos tão diversos podem produzir o mesmo efeito global.

As hipóteses sobre as bases moleculares da anestesia geral, no decorrer da sua história, mudaram consideravelmente. Meyer e Overton foram os primeiros a propor um mecanismo molecular da ação anestésica, a hipótese lipídica. De acordo com a mesma, o mecanismo da anestesia relaciona-se intimamente com a propriedade destes agentes de se dissolverem na bicamada lipídica, causando, assim, mudanças críticas nas propriedades físico-químicas da membrana celular (Miller e cols., 1961).

A hipótese lipídica foi universalmente aceita por mais de 60 anos. Entretanto, Franks e Lieb (1981, 1978) propuseram que os anestésicos gerais atuariam diretamente em proteínas da membrana celular ao invés de interagirem com a bicamada lipídica. A hipótese protéica surgiu a partir da observação do fenômeno da interrupção, em que ocorre uma perda da atividade anestésica além de um determinado limite de aumento no comprimento da cadeia de hidrocarboneto, muito embora a solubilidade lipídica continue a aumentar. Essa hipótese foi reforçada através da observação de que vários anestésicos modulavam a atividade de uma proteína, a luciferase do pirilampo (vaga-lume). Os anestésicos se ligariam a um domínio hidrofóbico desta proteína inibindo sua função de emissão de luz (Franks & Lieb, 1984). Além disso, a descoberta de que estereoisômeros de anestésicos, igualmente solúveis em lipídios, podem ser diferentemente efetivos em causar anestesia também corroborou com a hipótese protéica (Franks & Lieb, 1991; Harris e cols., 1992; revisto por Franks, 2006). Assim, a partir da correlação da potência anestésica com solubilidade lipídica e da capacidade de ligação protéica dos anestésicos inalatórios, acredita-se que, provavelmente, ocorra uma ligação destes agentes a domínios hidrofóbicos específicos das proteínas, especialmente canais protéicos (Franks & Lieb, 1994).

Nos últimos 40 anos os canais iônicos têm sido considerados os principais alvos de ação dos anestésicos no SNC de mamíferos, uma vez que estes desempenham um

importante papel na transmissão neuronal. Os canais iônicos diferem tanto na sua seletividade para íons como no seu mecanismo de abertura. Tem se tornado cada vez mais evidente que a maioria dos anestésicos gerais afetam um grande número de diferentes canais iônicos (Franks & Lieb, 1994; Antkowiak, 2001; Hemmings e cols., 2005; revisto por Franks, 2006). Os canais iônicos podem ser subdivididos em canais operados por voltagem, em que o mecanismo de abertura do canal é controlado pela variação da voltagem na membrana plasmática, e nos canais operados por ligante, onde uma molécula se ligaria a um receptor associado a um canal iônico.

Segundo Franks & Lieb (1994), grande parte dos canais iônicos operados por voltagem são relativamente insensíveis a concentrações clinicamente relevantes de anestésicos gerais. No entanto, foi demonstrado que os anestésicos voláteis podem deprimir as correntes dos canais de cálcio voltagem dependente e, conseqüentemente, inibir a transmissão sináptica (Yamakage e cols, 1995).

Quando um potencial de ação se propaga até o terminal nervoso, a membrana despolariza-se e canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCSV) se abrem. O influxo de cálcio através destes canais dispara a exocitose de vesículas sinápticas com conseqüente liberação do neurotransmissor (Katz & Miledi, 1967; revisto por Neher, 1998). Assim, é possível que os CCSV possam ser um alvo pré-sináptico dos anestésicos inalatórios, interferindo, assim, na transmissão sináptica.

Baseado em critérios farmacológicos e eletrofisiológicos, seis tipos de correntes de CCSV são identificados: L, N, P, Q, R e T. Os CCSV são divididos em canais ativados por baixa voltagem e inativados rapidamente (tipo T), e canais ativados por alta voltagem, no qual necessitam de grande voltagem para serem ativados e são inativados lentamente (L, N, P, Q e R) (revisto por Meir e cols., 1999). Dados da literatura sugerem que os canais de cálcio do tipo N, P, e Q estão envolvidos na regulação da excitabilidade e são essenciais na transmissão sináptica e, conseqüentemente, na liberação de neurotransmissores (Dunlap

e cols, 1995). Portanto, alguns estudos investigaram se esses canais são alvos dos anestésicos inalatórios no SNC, porém, resultados contraditórios foram observados. Study (1994) investigou o efeito do isoflurano nas correntes de cálcio em neurônios de hipocampo. Esse autor demonstrou que o isoflurano, em concentrações clinicamente relevantes, inibiu as correntes de cálcio ativadas por baixa e alta voltagem. No entanto, Hall e cols (1994) observaram que os CCSV do tipo P são insensíveis a uma variedade de anestésicos gerais (halotano, isoflurano, tiopental, pentobarbital e propofol).

Os canais iônicos operados por ligantes também parecem desempenhar um papel importante na anestesia. Os receptores ionotrópicos como o para GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) do tipo A, para acetilcolina do tipo nicotínico e para glutamato são considerados sítios de ação dos anestésicos gerais (Campagna e cols, 2003).

### **1.1.3 Efeito dos anestésicos inalatórios na liberação de dopamina**

A ação farmacológica dos anestésicos inalatórios é descrita com base nos seus efeitos clínicos. Como já mencionado anteriormente, até hoje o mecanismo de ação dessas drogas permanece ainda bastante desconhecido. Estudos clínicos e experimentais foram realizados com o objetivo de identificar os locais de atuação dos anestésicos e quais as alterações funcionais que esses fármacos produzem nas estruturas do SNC que seriam determinantes do estado de anestesia observado clinicamente. Um possível sítio de ação para os anestésicos é o terminal neuronal pré-sináptico, como sugerido por dados experimentais que mostram que a transmissão sináptica é mais sensível aos efeitos dos anestésicos inalatórios que a condução axonal (Eger e cols., 1997; revisto por Franks, 2006). Alterações na liberação de neurotransmissores podem estar diretamente relacionadas com a interação dos anestésicos com canais iônicos ou com qualquer outra proteína de membrana. Dessa forma, a investigação dos efeitos dos anestésicos na



liberação de neurotransmissores pode contribuir para a elucidação do mecanismo de ação dos anestésicos.

A dopamina (DA) está presente em regiões restritas do SNC, mas exerce importantes funções tais como atividade motora, consciência e processos cognitivos. Estudos indicaram que a anestesia geral está frequentemente associada a mudanças significativas na concentração extracelular desse neurotransmissor (Segal e cols., 1990; Irifune e cols., 1997; Becker e cols., 2003).

Embora existam alguns trabalhos a respeito da ação dos anestésicos voláteis na liberação de DA, os resultados são bastante contraditórios. Estudos *in vivo* demonstraram que um aumento na concentração de DA no SNC é observado após anestesia induzida pelo halotano e isoflurano (Miyano e cols., 1993). Além disso, Stahle e cols., (1990), observaram que não só a concentração de DA extracelular foi significativamente aumentada por concentrações clínicas de halotano e isoflurano no corpo estriado de ratos, como também os metabólitos da DA. No entanto, Adachi e cols. (2000), utilizando técnica de microdiálise *in vivo*, demonstraram que o halotano diminui os níveis extracelulares de DA no corpo estriado de ratos.

Grande parte dos estudos *in vitro* sobre a ação dos anestésicos inalatórios na transmissão dopaminérgica utilizam preparações semi-intactas, como preparações de fatias e sinaptosomas. Keita e cols. (1999) mostraram que o halotano e isoflurano aumentam a liberação espontânea de DA em fatias de neostriado de ratos. A partir de um estudo em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos foi demonstrado que o halotano, mas não o isoflurano, inibiu a captação de [<sup>3</sup>H]-DA (EL-Maghrabi e cols., 1993). No entanto, Shahani e cols. (2002) observaram que a captação de DA foi inibida pelo halotano e isoflurano em células LLC-PK1 transfectadas com transportador de dopamina (DAT) humano.

## **1.2 Transmissão dopaminérgica**

As catecolaminas (DA, noradrenalina, adrenalina) são compostos formados por um núcleo catecol (um anel de benzeno com duas hidroxilas) associado a uma cadeia de etilamina ou a alguns de seus derivados. As catecolaminas atuam como mensageiros químicos no SNC (Vallone e cols., 2000). A DA é a principal catecolamina no SNC e está envolvida em uma variedade de funções, tais como atividade motora, humor, emoção, afetividade e comunicação neuroendócrina. No sistema nervoso periférico, a DA é um modulador das funções cardíaca e renal, do tônus vascular e da motilidade gastrointestinal (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994).

Estudos sobre a transmissão dopaminérgica surgiram na década de 50, quando a DA foi reconhecida como um neurotransmissor independente (Carlsson e cols., 1958). A partir da técnica de microscopia de fluorescência, Carlsson e Waldeck (1958) observaram populações de neurônios contendo DA. Posteriormente, Dahlstrom e Fuxe (1964) descreveram mais detalhes sobre o sistema dopaminérgico no sistema nervoso de ratos.

### **1.2.1 Localização dos neurônios dopaminérgicos**

No SNC de ratos existe um número importante de células dopaminérgicas, cerca de 15.000 a 20.000 para cada uma das metades do mesencéfalo (Hokfelt e cols., 1976). O sistema dopaminérgico tem sido amplamente estudado com o auxílio das técnicas de microscopia de fluorescência e imunocitoquímica. Diferentemente de outros neurotransmissores, como a noradrenalina, que é encontrada de forma difusa no SNC, a DA se distribui de maneira circunscrita. As projeções dopaminérgicas do SNC estão presentes no corpo estriado, córtex frontal, substância negra, sistema límbico, corpo

amigdalóide e hipotálamo (Hokfelt e cols., 1976; Fallon e cols., 1978; Fallon & Moore, 1978). As principais projeções dopaminérgicas do SNC são representadas no QUADRO 1.

**QUADRO 1– Vias dopaminérgicas do SNC**

<b>Origem</b>	<b>Projeções e funções</b>	<b>Vias dopaminérgicas</b>
Substância negra e formação reticular.	Corpo estriado. Controle da atividade motora somática.	Via nigro-estrial.
Área tegmental ventral.	Córtex frontal, corpo estriado ventral, sistema límbico e corpo amigdalóide. Regulação do comportamento emocional.	Via mesolímbica.
Núcleo arqueado do hipotálamo à hipófise.	Eminência média do hipotálamo. Controle hormonal	Via tubero-infundibular.

**1.2.2 Síntese e metabolismo da DA**

A síntese de DA tem lugar nas terminações nervosas dopaminérgicas, onde são encontradas altas concentrações de enzimas como a tirosina hidroxilase (TH) e a descarboxilase de aminoácidos aromáticos, a L-DOPA descarboxilase (Freund e cols.,

1984). Os trabalhos de Nagatsu e cols., (1964) e Leviit e cols., (1965) demonstraram que a hidroxilação do aminoácido L-tirosina é o ponto de regulação da síntese de catecolaminas no SNC e, conseqüentemente, a enzima TH é a enzima limitante da síntese de DA, noradrenalina e adrenalina. A TH é uma proteína de 498 aminoácidos (56 KDa) presente predominantemente no citosol das terminações catecolaminérgicas. A enzima é uma oxidase que utiliza L-tirosina e oxigênio como substratos e tetrahidrobioterina (BH<sub>4</sub>) como co-fator para adicionar um grupo hidroxila ao aminoácido e assim formar a L-DOPA. Na presença da descarboxilase de aminoácidos aromáticos a L-DOPA é convertida em DA. Esse neurotransmissor é metabolizado por dois tipos de enzimas: a monoaminoxidase (MAO) e a catecol-O-metiltransferase (COMT). No cérebro existem dois tipos de MAO, designadas do tipo A e B. Os principais produtos de metabolização da DA são o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) (Thorpe e cols., 1997).

### **1.2.3 Liberação de dopamina**

#### **1.2.3.1 Liberação dependente de cálcio**

Nesse processo, a DA contida nas vesículas é liberada quando ocorre a fusão da membrana vesicular com a membrana do terminal pré-sináptico (Katz & Miledi, 1967). Primeiramente, o neurotransmissor é transportado para o interior das vesículas sinápticas com o auxílio de uma proteína com 12 domínios transmembrana, o transportador vesicular das monoaminas (VMAT<sub>2</sub>), que utiliza um gradiente eletroquímico gerado por uma bomba (ATPase) de prótons (Henry e cols., 1998a; Henry e cols., 1998b; Schuldiner, 1994). Esse transportador também é responsável pelo transporte vesicular da noradrenalina, serotonina e histamina. O VMAT<sub>2</sub> é inibido pela reserpina e tetrazenazina e sensível à variação de pH (Howell e cols., 1994). O VMAT<sub>2</sub> tem um papel importante na liberação de DA

dependente do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Kanner & Schuldiner, 1987). Nas células cromafins da adrenal existe um outro transportador vesicular das monoaminas: o VMAT<sub>1</sub> (Erickson e cols., 1992).

A maior parte das vesículas sinápticas (90%) que contém o transmissor não estão livres no citoplasma. Elas encontram-se unidas ao citoesqueleto da terminação pré-sináptica mediante a interação de proteínas fosforiladas por quinases presentes na membrana da vesícula (sinapsina I e II) com proteínas do citoesqueleto. Quando um potencial de ação alcança o terminal nervoso, a mudança de potencial de membrana ativa os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem (CCSV). Devido ao gradiente eletroquímico, gera-se um influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , que em conjunto com a calmodulina ativam quinases que fosforilam a sinapsina I e II. A adição de um grupo fosfato às sinapsinas enfraquece a união das vesículas sinápticas ao citoesqueleto, facilitando, assim, o seu transporte à zona ativa (revisto por Sudhof, 2004).

Uma vez transportadas à zona ativa, as vesículas ancoram-se e sofrem maturação (“priming”) tornando-se prontas para sofrerem exocitose. Como mencionado anteriormente, um potencial de ação despolariza o terminal alterando o potencial de aproximadamente -70 mV a +20mV, permitindo, assim, a abertura de CCSV. Essa abertura dos canais altera a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das células. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através desses canais dispara a exocitose com conseqüente liberação do neurotransmissor (Katz & Miledi, 1967; revisto por Neher, 1998).

Existem evidências de que o processo de exocitose pode ser desencadeado pelo cálcio proveniente dos estoques intracelulares (Tse e cols., 1997; Berridge, 1998; Raiteri, 2000). Dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os anestésicos sevoflurano, halotano e isoflurano aumentam a liberação exocitótica de [<sup>3</sup>H]-acetilcolina em fatias de córtex cerebral de ratos, principalmente a partir de cálcio proveniente de

estoques intracelulares (Gomez e cols., 1999; Gomez e cols., 2000; Silva e cols., 2005). Fernandes e cols. (2004) observaram que a tityustoxina, uma toxina de escorpião *Tityus serrulatus*, induz liberação exocitótica de [<sup>3</sup>H]-DA dependente do cálcio intracelular.

### **1.2.3.2 Liberação independente de Ca<sup>2+</sup>**

Já está bem estabelecido o processo de liberação de DA através da exocitose de vesículas, envolvendo o cálcio proveniente do meio extra ou intracelular. No entanto, foi proposto um outro mecanismo de liberação, que pode co-existir com o clássico modelo exocitótico, denominado transporte reverso (TR) através do transportador de DA (DAT) (Leviel, 2001).

O DAT é uma glicoproteína de membrana plasmática que pertence a uma superfamília de transportadores de membrana dependentes de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (Amara & Kuhar, 1993a; Amara & Kuhar, 1993b). Os membros dessa superfamília possuem múltiplas características estruturais em comum, incluindo 12 domínios transmembrana, múltiplos sítios de glicosilação e sítios de fosforilação (Amara e Kuhar, 1993; Giros e cols., 1996). A estequiometria do transportador indica que a DA é co-transportada para o interior do terminal (recaptação) ou para o meio externo (TR) com dois íons Na<sup>+</sup> e um íon Cl<sup>-</sup> (Krueger, 1990; Nelson, 1998).

Há quatro décadas, Julius Axelrod introduziu o conceito de recaptação na tentativa de explicar como a noradrenalina era transportada de volta para terminal nervoso (Hertting & Axelrod, 1961). Assim, ele propôs que o processo de recaptação era um mecanismo importante para a inativação de neurotransmissores. Mais tarde, similaridades e algumas diferenças entre os mecanismos de captação para DA, noradrenalina e serotonina foram demonstradas. Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, os genes que codificam

proteínas responsáveis pela recaptação das monoaminas foram identificados nos anos 90 (Inazu e cols., 1999). Vale a pena ressaltar que, a partir dessa década, estudos evidenciaram que a DA pode ser recaptada pelo transportador de noradrenalina (NET) em diversas regiões cerebrais, principalmente no córtex pré-frontal (Morón e cols., 2002; revisto por Torres e cols., 2003).

As técnicas de imunocitoquímica e hibridização *in situ* possibilitaram a localização dos transportadores de monoaminas. Pode-se encontrar o DAT expresso nos corpos celulares da substância negra, área tegmental ventral do cérebro e córtex cerebral, (principalmente frontal e temporal), o transportador de serotonina (SERT) expresso nos núcleos da rafe central e medial e o NET expresso no córtex pré-frontal e parietal e nos núcleos da base (Hoffman e cols., 1999; Torres e cols., 2003). Outras metodologias relevantes são o uso de sistemas de expressão heteróloga e a mutagênese, que contribuem para a identificação dos domínios estruturais e funcionais dos transportadores. Atualmente surgem os modelos animais que possuem alterações genéticas no transporte de monoaminas e que têm ajudado a esclarecer o papel dessas proteínas na função cerebral (Torres e cols., 2003).

O DAT é, portanto, um carreador de membrana cuja principal função é terminar a ação do neurotransmissor, através da recaptação, além de ser responsável também pela liberação da DA citosólica para a fenda sináptica, denominado TR, mecanismo ainda bastante desconhecido (Leviel, 2001).

O transporte reverso de DA é observado na presença de anfetamina, sendo que vários estudos demonstraram que a liberação de DA induzida pela anfetamina não é inibida pela reserpina (um inibidor do transportador vesicular de DA) (revisto por Leviel, 2001). Além disso, estudos sugerem que a DA endógena, localizada principalmente em compartimento vesicular parece ser menos sensível à anfetamina do que a DA livre no citosol. Assim, o conceito de TR foi utilizado, inicialmente, a partir de estudos sobre a

liberação de DA na presença de algumas drogas como a anfetamina e a tiramina. Somente mais tarde, o TR foi então considerado um possível modo fisiológico de liberação responsável por parte da DA presente na fenda sináptica. A função do TR na atividade neuronal basal ainda não está bem esclarecida, mas o mecanismo de ação e o processo regulatório desse modelo atípico de liberação têm sido intensamente estudados (Chen & Reith, 2000; Leviel, 2001; Torres e cols, 2003).

O DAT é sensível a drogas como GBR 12909, que inibe esse transportador competitivamente e com grande seletividade (Anderesen, 1989) e à nomifensina, inibidor de alta afinidade do DAT (Herdon & Nahorshi, 1987; Raiteri, 1979). Sua função pode ser modulada por segundos mensageiros como o diacilglicerol (via ativação da PKC) e o ácido araquidônico (Chen & Reith, 2000). O DAT pode ser regulado diretamente através de múltiplos fatores endógenos envolvendo alterações no gradiente de sódio e na temperatura. Em baixas temperaturas (12 a 17 °C) ocorre inibição do DAT, afetando suas funções nos neurônios dopaminérgicos, principalmente o TR (revisto por Gerevich e cols., 2001).

Recentemente, Khoshbouei e cols. (2003) relataram que o TR mediado pelo DAT pode ser iniciado por um aumento da concentração do sódio intracelular ( $[Na^+]_i$ ). A  $[Na^+]_i$  desempenha um papel importante na regulação da liberação de neurotransmissores a partir do terminal axônico (via despolarização ou inversão do trocador  $Na^+ / Ca^{2+}$ ). A elevação da  $[Na^+]_i$  também pode causar liberação de neurotransmissor independente de cálcio, onde o aumento da  $[Na^+]_i$  pode reverter o processo de recaptação de transmissores, ocasionando o efluxo de neurotransmissores livres no citoplasma, denominado TR, como já citado anteriormente (Adam-Vizi, 1992). Assim, o funcionamento do DAT está diretamente relacionado com o gradiente de  $Na^+$  extra e/ou intracelular, visto que o DAT é uma glicoproteína de membrana plasmática dependente de  $Na^+/Cl^-$ .



### 1.2.4 Receptores Dopaminérgicos

Com base nas características moleculares, foram descritos 5 subtipos de receptores para DA, os quais são agrupados em 2 famílias farmacológicas denominados D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. A família D<sub>1</sub> é composta pelos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>. Esses receptores possuem uma região carboxila terminal que é aproximadamente 7 vezes mais longa que a correspondente aos receptores D<sub>2</sub>. O subtipo D<sub>1</sub> é o receptor dopaminérgico mais abundante no SNC (Missale e cols., 1998). Níveis altos desses receptores são encontrados no tubérculo olfatório, estriato, substância negra e córtex cerebral (frontal e cíngulo) (Missale e cols., 1998). Já o subtipo D<sub>5</sub> se distribui pelo hipocampo, tálamo e hipotálamo e nas regiões frontal e temporal do córtex cerebral (Jaber e cols., 1996). A ativação da família D<sub>1</sub> estimula a enzima adenil ciclase levando à formação do AMPc (Zhou e cols., 1990). Também tem sido reportado que a ativação dos receptores D<sub>1</sub> do córtex frontal induz a produção de outros segundos mensageiros, como o diacilglicerol e o IP<sub>3</sub>, através da estimulação de fosfolipase C (Friedman, 1990)

A família D<sub>2</sub> é formada por 3 subtipos: D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Essa família possui como característica uma região (i<sub>3</sub>), composta por 101 a 166 aminoácidos, dependendo do subtipo e da espécie. Os subtipos da família D<sub>2</sub> são considerados autoreceptores das terminações dopaminérgicas cuja ativação reduz a liberação de DA (Dwoskin e cols., 1986). O efeito se deve principalmente à inibição da síntese de AMPc e modulação das correntes iônicas, em particular as ativadas por voltagem. A redução da formação de AMPc diminui a atividade da PKA que fosforila as sinapsinas I e II. A inibição dos canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à voltagem reduzem a entrada do íon Ca<sup>2+</sup>, diminuindo a probabilidade de fusão das vesículas (Jaber e cols., 1996).

### 1.2.5 Relevância clínica

Já está bem estabelecido que a dopamina (DA) é um neurotransmissor catecolaminérgico que está presente no cérebro (córtex frontal, temporal e parietal, núcleo arqueado do hipotálamo à hipófise) e principalmente na substância negra do mesencéfalo. O sistema dopaminérgico tem sido foco de grande interesse, principalmente devido a associação de alguns transtornos do SNC com alterações nesse sistema. Alterações da via dopaminérgica nigrostriatal são responsáveis pelo desenvolvimento do Mal de Parkinson, ao passo que disfunções dos neurônios dopaminérgicos da via mesocorticolímbica estão relacionadas com o aparecimento de alguns estados psicóticos, como a esquizofrenia. (Weinberger e cols., 1988; Goldstein & Deutch, 1992; Lang & Lozano, 1998). Diferentes estudos indicaram que sinais positivos da esquizofrenia, como euforia, alucinações auditivas e delírio, se devem, pelo menos em parte, a uma hiperatividade da transmissão dopaminérgica. De fato, algumas drogas psicoestimulantes, como a anfetamina aumentam a transmissão dopaminérgica, mimetizando alterações do comportamento presentes em pacientes esquizofrênicos (Goldstein e cols., 1997).

Apesar da existência de alguns estudos relacionados com a transmissão dopaminérgica e anestésicos inalatórios, temos pouco ou quase nenhum conhecimento sobre o papel funcional da DA no estado de anestesia (Becker e cols., 2003). No entanto, sabe-se que durante a indução da anestesia observam-se estágios de euforia, além de hiperlocomoção durante a recuperação anestésica. A DA é um neurotransmissor que exerce importantes funções no SNC tais como atividade motora, consciência e processos cognitivos, logo, a modulação da transmissão dopaminérgica pode ser um alvo de ação dos anestésicos inalatórios.

Embora existam trabalhos a respeito da ação dos anestésicos voláteis na transmissão dopaminérgica, não está claro se essas drogas alteram a liberação desse neurotransmissor (Toner e cols., 2001; Adachi e cols., 2003). Assim, ao estudar o efeito do

halotano e do sevoflurano na liberação de DA no SNC estaremos contribuindo para um maior entendimento sobre o mecanismo de ação de dois anestésicos muito utilizados na clínica, além de tornar o procedimento da anestesia cada vez mais seguro, principalmente para pacientes que possuem distúrbios no sistema dopaminérgico.

## **2. Objetivos**

**Objetivo Geral**

- Estudar a transmissão dopaminérgica em fatias córtex cerebral de ratos na presença dos anestésicos inalatórios sevoflurano e halotano.

**Objetivos específicos**

- Avaliar se diferentes concentrações do sevoflurano e halotano interferem na liberação de dopamina em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar se o efeito do sevoflurano e halotano na liberação de dopamina em fatias de córtex cerebral de ratos é dependente do tempo de incubação.
- Investigar a participação do íon cálcio extra e intracelular na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar a participação dos canais de sódio sensíveis à TTX na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar o papel do transportador de dopamina na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.
- Investigar o papel do transportador de noradrenalina na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.

- Investigar a participação da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.
  
- Investigar o efeito do sevoflurano e halotano na captação da dopamina em fatias de córtex cerebral de ratos

### **3. Material e Métodos**

### 3.1 Drogas e reagentes

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

- EGTA,  $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$ .
- Dopamina não radioativa,  $C_8H_{11}NO_3 \cdot HBr$ .
- Pargilina,  $C_{11}H_{13}N HCl$ .
- Nomifensina,  $C_{16}H_{18}N_2 + C_4H_4O_4$ .
- GBR12909,  $C_{28}H_{32}F_2N_2O \cdot 2HCl$
- Ouabaína,  $C_{29}H_{44}O_{12}$ .
- Reserpina,  $C_{33}H_{40}N_2O_9$ .
- BAPTA-AM,  $C_{34}H_{40}N_2O_{18}$ .
- POPOP,  $C_{24}H_{16}N_2O_2$ .
- PPO,  $C_{15}H_{11}NO$ .
- cloreto de cádmio.
- cloreto de colina
- Nisoxetina
- Malachite Green Base (Verde de Malaquita)
- Coomassie Brilliant Blue G

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

O Halotano foi gentilmente cedido por Halocarbon, River Edge, New Jersey, USA.

Reagentes obtidos da Reagen-Quimiobras Indústrias Químicas do Brasil:

- Ácido tricloroacético,  $CCl_3COOH$ .
- Cloreto de potássio,  $KCl$ .
- Molibdato de amônio
- Alcool polivinílico



Reagentes obtidos da Merk S.A Indústrias Químicas:

- Cloreto de sódio, NaCl.
- Sulfato de magnésio,  $MgSO_4 \cdot (7H_2O)$ .
- Glicose,  $C_6H_{12}O_6$ .
- Tolueno,  $C_6H_5CH_3$ .
- Cloreto de cálcio dihidratado,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ .
- Ácido clorídrico, HCl.
- Álcool etílico,  $CH_3CH_2OH$ .
- Fosfato diácido de potássio,  $KH_2PO_4$
- Hidróxido de sódio, NaOH.
- HEPES,  $C_8H_{18}N_2O_4S$ .
- Tritom,  $C_{34}H_{62}O_{11}$ .

Os reagentes obtidos do Grupo Química Indústria Ltda, Brasil.

- Naftaleno,  $C_{10}H_8$ .
- Dioxana,  $C_4H_8O_2$ .

Substância obtida da Amersham Pharmacia Bioetech UK Limited, England:

- $[2,5,6-^3H]$ dopamina, atividade específica 49.0 (lote-TRK284).

### 3.2 Soluções

Meio de incubação 1

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
$CaCl_2$ , $2H_2O$	1,35 mM
$MgSO_4$ ( $7H_2O$ ).	1,2 mM

Glicose	5,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
Pargilina	10 μM
HEPES	12,5 mM

pH 7.4 ajustado com NaOH 0,1 N

Obs: Pargilina: droga inibidora da degradação da DA.

Solução de [<sup>3</sup>H]-DA, contendo aproximadamente 0,20 μCi de [<sup>3</sup>H]-DA em 2000 mL do meio de incubação

Solução de dopamina não radioativa 1,0 μM

Líquido de cintilação (solução de Bray modificado)

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

Solução de ácido tricloroacético a 10%

## Meio de incubação 2

NaCl	115 mM
KCl	3 mM
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2 mM
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).	1,2 mM
Glicose	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM

pH 7.4 ajustado com NaOH

Soluções estoque para o Método Chan

Verde de Malaquita - 0,08 % p/v

Alcool polivinílico - 2,32% p/v

Molibdato de amônio – 5,7% p/v em HCl 6 N

Solução para o Método Chan

- H<sub>2</sub>O % 33 v/v
- Molibdato de amônio 16 % v/v
- Alcool polivinílico 16 % v/v
- Verde Malaquita 33 % v/v

### 3.3 Animais

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

### **3.4 Determinação da liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos**

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

Ratos adultos Wistar foram decapitados e o encéfalo removido. Os dois hemisférios do cérebro eram separados e o córtex dissecado sobre uma placa Petri em cima de um papel de filtro umedecido com solução (meio de incubação 1) em gelo. Em seguida, o córtex foi fatiado em fatias de 0,5 mm em um fatiador de tecido.

O tecido foi pesado em balança de torção na quantidade de 40 mg e colocado em frascos de incubação que se encontravam no gelo. Esses frascos continham 2,0 mL da solução, contendo aproximadamente 0,20  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-DA.

#### **3.4.2 Marcação das fatias com [ $^3\text{H}$ ]-DA**

Em seguida, as fatias foram colocadas em banho com agitação (120 rpm), pré-incubadas a 37°C durante cinco minutos e posteriormente incubadas por 30 minutos com [ $^3\text{H}$ ]-DA (atividade específica 49,0 Ci/mmol). Após a marcação, as fatias foram transferidas para tubos de centrifuga que já se encontravam no gelo e, logo após, centrifugadas a 6000 rpm, 3300 g por cinco minutos, a 4°C.

#### **3.4.3 Lavagem das fatias com DA não radioativa**

Os tubos foram retirados da centrifuga, o sobrenadante desprezado e o precipitado contendo os “pellets” com as fatias foram lavados com 2,0 mL de solução contendo DA não radioativa (1,0  $\mu\text{M}$ ). Esse procedimento foi repetido três vezes, para

retirar a [<sup>3</sup>H]-DA inespecificamente ligada ao tecido.

#### **3.4.4 Incubação das fatias**

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as fatias foram colocadas em 1,5 mL de meio de incubação e transferidas novamente para frascos de vidro que foram incubados em banho com agitação (120 rpm) à temperatura de 37°C e pré-incubadas durante 5 minutos .

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

Soluções estoques saturadas com sevoflurano ou halotano foram preparadas a cada experimento e obtidas da seguinte maneira: 10 ml do meio de incubação foram equilibradas com os anestésicos estudados na forma líquida (100, 200, 400, 600, 800, ou 1600µl) a 37°C em frascos de vidro, hermeticamente fechados por 30 minutos. Em seguida, utilizando-se uma seringa de vidro, 500µl da solução estoque saturada com sevoflurano ou halotano foram adicionadas aos frascos de vidro contendo 1,5 mL de meio de incubação a 37°C após 5 minutos de pré-incubação. Após a administração do anestésico específico, os frascos foram, então hermeticamente fechados, agitados e incubados por até 30 minutos. A saturação da solução estoque e a concentração aquosa do sevoflurano e halotano no meio de incubação após 30 minutos foram confirmadas após a extração com n-heptano utilizando-se o princípio da cromatografia gasosa (Ruteldge e cols, 1963). Com esse objetivo, utilizamos um cromatógrafo a gás Hewlett Packard Series II-Modelo 5890 equipado com uma coluna capilar (HP<sub>1</sub>:SE-30;35 metros de comprimento; diâmetro interno 20 mm; espessura de filme de 0,33 µm; temperatura máxima: 325°C), onde um microlitro da solução estoque ou do meio de incubação era introduzido diretamente através

de um septo (elastômero). As condições de separação incluíam uma análise cromatográfica à temperatura constante da coluna (30°C) e uma mistura de hidrogênio (fluxo:35, 350 e 30 ml /min, respectivamente) como gás carreador.

#### **3.4.6 Contagem da radioatividade do sobrenadante**

Ao terminar o tempo de incubação, os frascos eram retirados do banho e o material transferido em seguida para um tubo de centrífuga. Após a centrifugação (3300g por 7 minutos, a 4°C), o sobrenadante era colocado em tubo de ensaio e 100µL desta solução era transferido para um microtubo (eppendorf) contendo 1000µL de solução de Bray. A radioatividade era contada no espectrofotômetro de cintilação líquida durante 10 minutos. Em estudos prévios, foi realizado uma cromatografia da fração do sobrenadante que mostrou que aproximadamente 90% da radioatividade presente é [<sup>3</sup>H]-DA (Fernandes e cols., 2004). O termo liberação de DA é usado para indicar a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA não captada pelo sistema de captação após a sua liberação.

#### **3.4.7 Análise estatística dos resultados**

Os resultados foram obtidos, analisados e expressos de duas formas: a primeira pela contagem da radioatividade do sobrenadante em que se utilizou a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em dpm/mg de tecido. Representa a média das amostras, feitas em duplicata, repetidas no mínimo três vezes (em dias diferentes),  $\pm$  o erro padrão da média (EPM) subtraído o valor da [<sup>3</sup>H]-DA liberada nos frascos mantidos em gelo.

Na segunda forma, expressamos a radioatividade do sobrenadante pelo delta ( $\Delta$ ) de liberação de [<sup>3</sup>H]-DA. Representa a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em dpm/mg de tecido (conforme

citado anteriormente) na presença de drogas (anestésicos ou outros agentes) subtraída da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em dpm/mg de tecido obtida nas condições controle definidas em cada experimento.

Para analisar o conteúdo de [<sup>3</sup>H]-DA captada pelo tecido, fizemos extrações com TCA, que causou a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA das fatias do córtex cerebral. Expressamos os resultados em dpm/mg de tecido, que representa a média das amostras, feitas em duplicata, repetidas no mínimo cinco vezes (em dias diferentes)  $\pm$  o erro padrão da média (EPM).

Os resultados foram analisados por análise de variância ANOVA ou pelo teste “t-student”, quando indicado. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

O programa de computador utilizado na elaboração dos gráficos, análise estatística e cálculo para o EC<sub>50</sub> foi o Sigma-plot (Scientific Graphing Software), versão 8.0.

### **3.5 Mensuração de fosfato em fatias de córtex cerebral de ratos**

Esta metodologia foi desenvolvida por Chan e cols. (1986), adaptada por Bruno e cols. (2002) e associada com a técnica de fatia em córtex cerebral de ratos utilizada no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

### **3.5.1 Obtenção das fatias de córtex cerebral de ratos e administração das drogas**

Após obtenção das fatias (item 3.4.1) em meio de incubação 2, as mesmas foram colocadas em banho com agitação (120 rpm), pré-incubadas a 37°C durante 20 minutos na presença ou ausência de ouabaína e subseqüentemente, administrado os anestésicos sevoflurano ou halotano (conforme item 3.4.5). Após o período de 10 minutos de incubação era acrescentado ácido tricloroacético a 10% para lisar as fatias e interromper as reações. Em seguida as fatias foram transferidas para tubos de centrifuga que já se encontravam em gelo e, logo após, centrifugadas a 6000 rpm, 3300 g por cinco minutos, a 4°C.

### **3.5.3 Mensuração de fosfato no meio de incubação**

O fosfato presente no sobrenadante (meio de incubação 2) após a centrifugação foi mensurado a partir do método Chan e cols. (1986). A liberação de fosfato foi expressado em nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína.

Para a dosagem de proteína das fatias de córtex cerebral de ratos foi utilizado o método Bradford (1976).

### **3.5.4 Análise estatística dos resultados**

Representa a média das amostras, feitas em duplicata, repetidas no mínimo quatro vezes (em dias diferentes),  $\pm$  o erro padrão da média (EPM).

A liberação de fosfato foi expressa em nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína.

Os resultados foram analisados por análise de variância ANOVA ou pelo teste



“t-student”, quando indicado. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **4. Resultados**

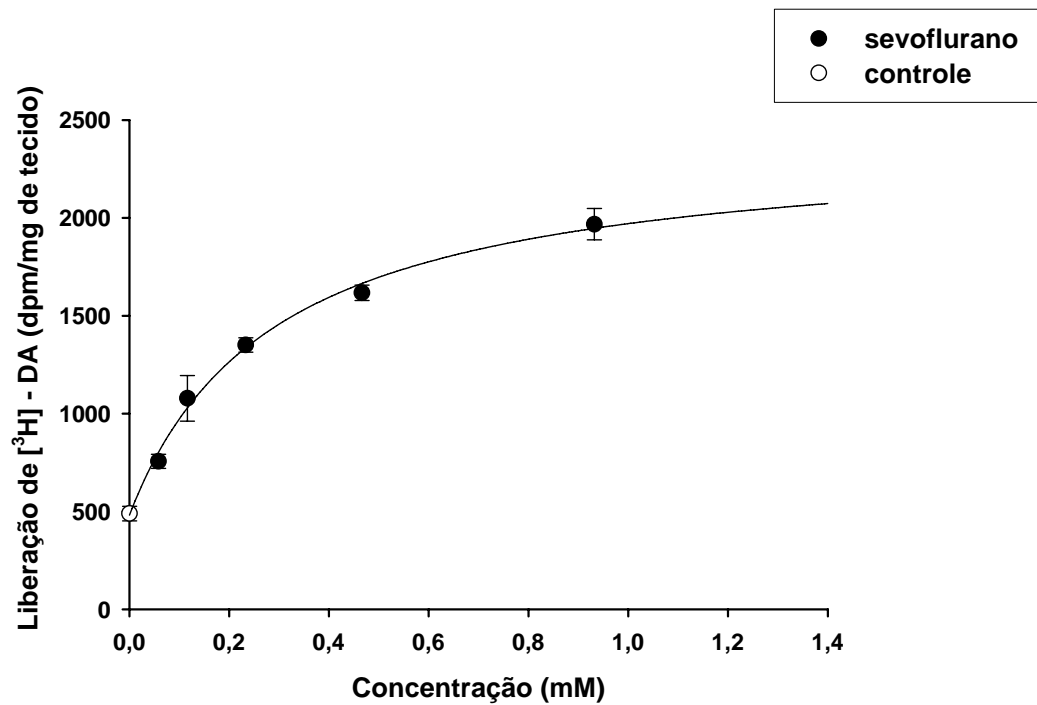
#### **4.1 Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos na presença do sevoflurano e halotano**

Nosso objetivo inicial foi investigar a ação do sevoflurano e do halotano na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos. Assim, para testar se o sevoflurano ou halotano seriam capazes de alterar a liberação deste neurotransmissor, as fatias de córtex cerebral de rato foram incubadas em concentrações crescentes desses dois anestésicos.

As fatias de córtex cerebral de ratos foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C e, subsequentemente, estimuladas com concentrações crescentes de sevoflurano (0,058, 0,11, 0,23, 0,46 e 0,93 mM) durante 20 minutos. Os resultados apresentados na figura 1 mostram que o sevoflurano foi capaz de induzir um aumento na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA de uma maneira dependente da concentração do anestésico. Nota-se que o sevoflurano aumentou significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações utilizadas. O  $EC_{50}$  (calculado da concentração efetiva capaz de liberar 50% da liberação máxima) foi de 0,29 mM. A liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano nas concentrações de 0,46 e 0,93 mM se diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ), porém pode-se observar que a curva tende a se estabilizar após a concentração 0,46mM ( $1617 \pm 38$  dpm/mg de tecido). Logo, a concentração que passamos a utilizar em nossos experimentos foi de 0,46mM que levou a um aumento de 3,24 vezes em relação ao controle ( $498.6 \pm 37$ dpm/mg de tecido).

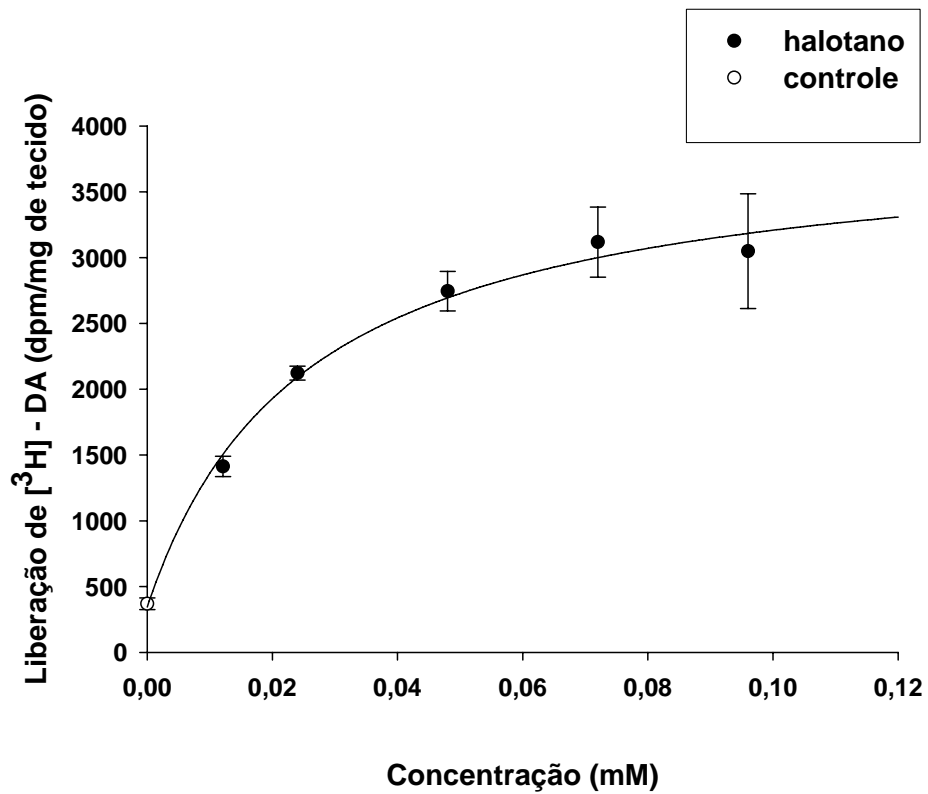
Experimento semelhante ao descrito anteriormente foi realizado com o anestésico halotano. As fatias de córtex cerebral de rato foram incubadas com o anestésico em concentrações crescentes (0,012, 0,024, 0,048, 0,072 e 0,096mM) durante 20 minutos. Os

resultados apresentados na Figura 2 mostram que o halotano também foi capaz de induzir um aumento na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA de uma maneira dependente da concentração do anestésico, de forma que todas as concentrações do halotano utilizadas aumentaram significativamente a liberação basal de [<sup>3</sup>H]-DA ( $p < 0,05$ ). A liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo halotano nas concentrações de 0,024 e 0,048mM se diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Assim, pode-se observar que a liberação foi crescente até a concentração de 0,048mM. Logo, a concentração que passamos a utilizar em nossos experimentos foi de 0,048mM de halotano que liberou  $2744,6 \pm 86$  dpm/mg de tecido de [<sup>3</sup>H]-DA e provocou um aumento de 7,43 vezes em relação ao controle ( $369,6 \pm 25$  dpm/mg de tecido). O EC<sub>50</sub> calculado para o halotano foi de 0,025mM.



**Figura 1: Dose-resposta do sevoflurano na liberação de [3H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos.**

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



**Figura 2: Dose-resposta do halotano na liberação de  $[^3\text{H}]$ -DA em fatias de córtex cerebral de ratos.**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com  $[^3\text{H}]$ -DA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C e, subsequentemente, estimuladas com halotano nas concentrações de 0,012, 0,024, 0,048, 0,072 e 0,096mM durante 20 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicatas.

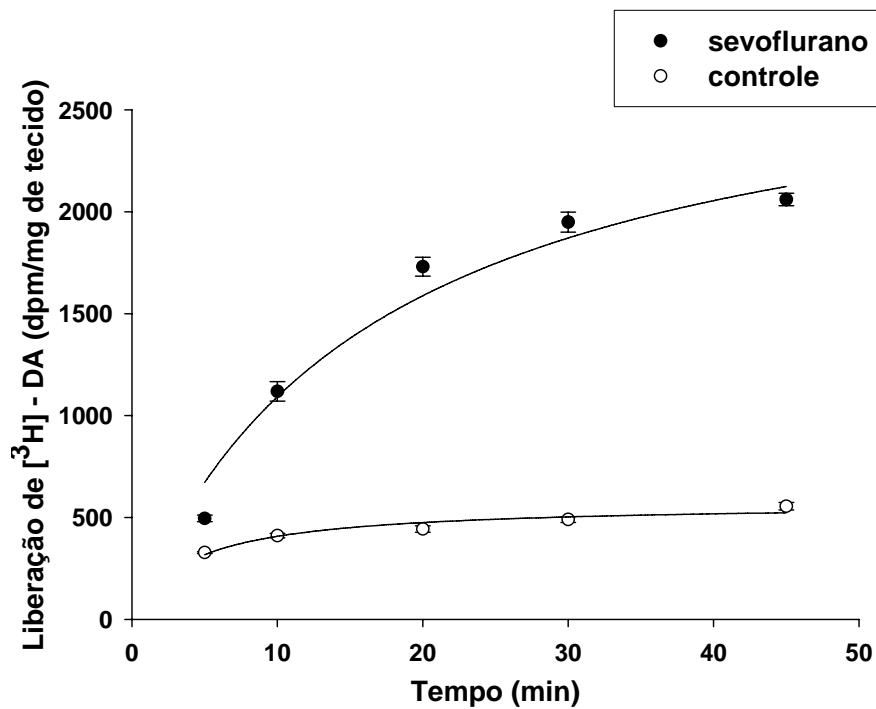
#### **4.2 Efeito do tempo de incubação na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Para determinar se a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano era dependente do tempo de incubação, as fatias foram estimuladas com sevoflurano ou halotano por diferentes tempos. As fatias de córtex cerebral de ratos foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46mM) durante 5, 10, 20, 30 e 45 minutos a 37°C. A Figura 3 mostra que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano foi dependente do tempo de incubação.

O mesmo procedimento experimental foi realizado utilizando-se o halotano. As fatias foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C e, posteriormente, estimuladas com halotano (0,048mM) por 2,5, 5, 10, 20, e 30 minutos de incubação a 37°C. A Figura 4 mostra que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo halotano também foi dependente do tempo de incubação.

Pode-se observar que a curva de liberação foi crescente até o tempo de 30 minutos de incubação com sevoflurano (Fig. 3) e 20 minutos de incubação com o halotano (Fig. 4). Verifica-se ainda, que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano nos tempos de 30 e 45 minutos e pelo halotano nos tempos 20 e 30 minutos de incubação não se diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ), ou seja, a resposta do sevoflurano e halotano tende a se estabilizar após 30 e 20 minutos de incubação, respectivamente.

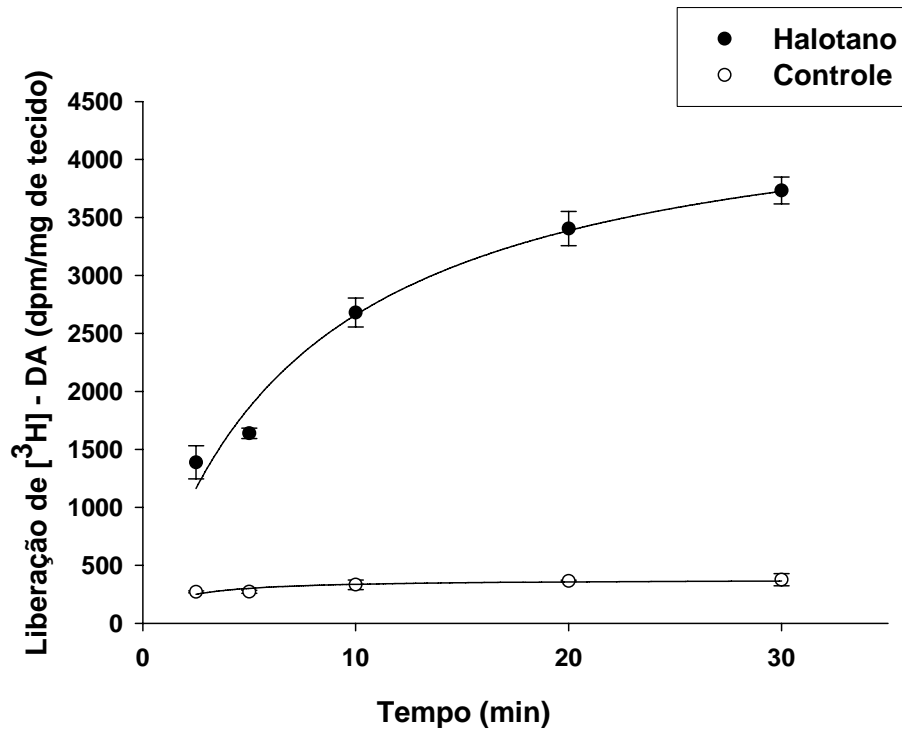
Assim, o tempo que escolhemos para estudar o mecanismo envolvido na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano foi de 20 minutos ( $1730 \pm 46,5$  dpm/mg de tecido) e pelo halotano foi de 10 minutos de incubação ( $2680 \pm 125$  dpm/mg de tecido), onde o sevoflurano induziu um aumento na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA de 3,47 e o halotano de 7,29 vezes quando comparado ao controle.



**Figura 3: Curva de tempo de incubação do sevoflurano na liberação de [3H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40mg) marcadas com [3H]-DA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C e, subsequentemente, estimuladas ou não com sevoflurano (0,46 mM) durante 5, 10, 20, 30 e 45 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicatas.





**Figura 4: Curva de tempo de incubação do halotano na liberação de [3H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos**

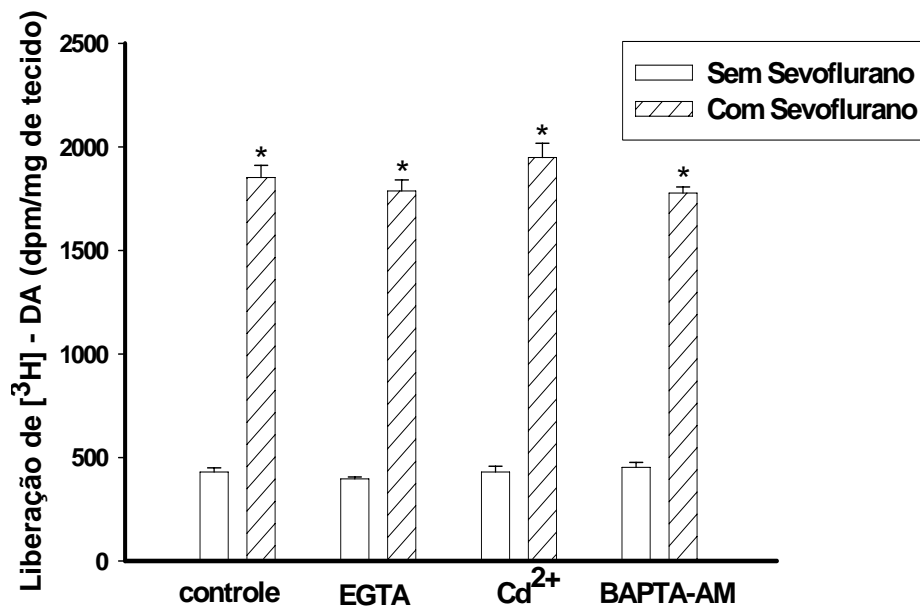
Fatias de córtex cerebral de ratos (40mg) marcadas com [3H]-DA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C e, subsequentemente, estimuladas ou não com halotano (0,048 mM) durante 2,5, 5, 10, 20, e 30 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicatas.

### 4.3 O papel do íon cálcio na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos

O influxo de cálcio através de CCSV dispara a exocitose com conseqüente liberação do neurotransmissor (Katz & Miledi, 1967; revisto por Neher, 1998). Desse modo, para testar a participação do cálcio extracelular na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano (0,46 mM) e halotano (0,048 mM), as fatias de córtex cerebral de ratos foram incubadas em meio contendo Cd<sup>+2</sup>, um bloqueador inespecífico dos CCSV (Fox e cols, 1987) ou EGTA, um quelante de cálcio extracelular.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas em meio de incubação por 15 minutos na presença ou ausência de Cd<sup>+2</sup> (100 µM) ou EGTA (2,0 mM), em experimentos independentes e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048mM) durante 10 minutos. As Figuras 5 e 6 mostram que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelos anestésicos sevoflurano e halotano não foi alterada pela presença do Cd<sup>+2</sup> e EGTA (p>0,05) .

Existem evidências de que a exocitose pode ser desencadeada pelo cálcio proveniente dos estoques intracelulares (Tse e cols., 1997; Berridge, 1998). Assim, para avaliarmos a participação do cálcio intracelular na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelos anestésicos, utilizou-se o BAPTA-AM (50µM), um quelante de cálcio intracelular (Adler e cols, 1991). Nesses experimentos as fatias foram pré-incubadasde córtex cerebral em meio de incubação por 30 minutos na presença ou ausência de BAPTA-AM (50 µM) e, subseqüentemente, estimulamos com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Observou-se (Fig. 5 e 6) que essa droga também não interferiu na resposta dos anestésicos (p>0,05). Por outro lado, a presença do EGTA, Cd<sup>+2</sup> e BAPTA-AM inibiu significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por altas concentrações de potássio (50 mM) (Fig. 7).

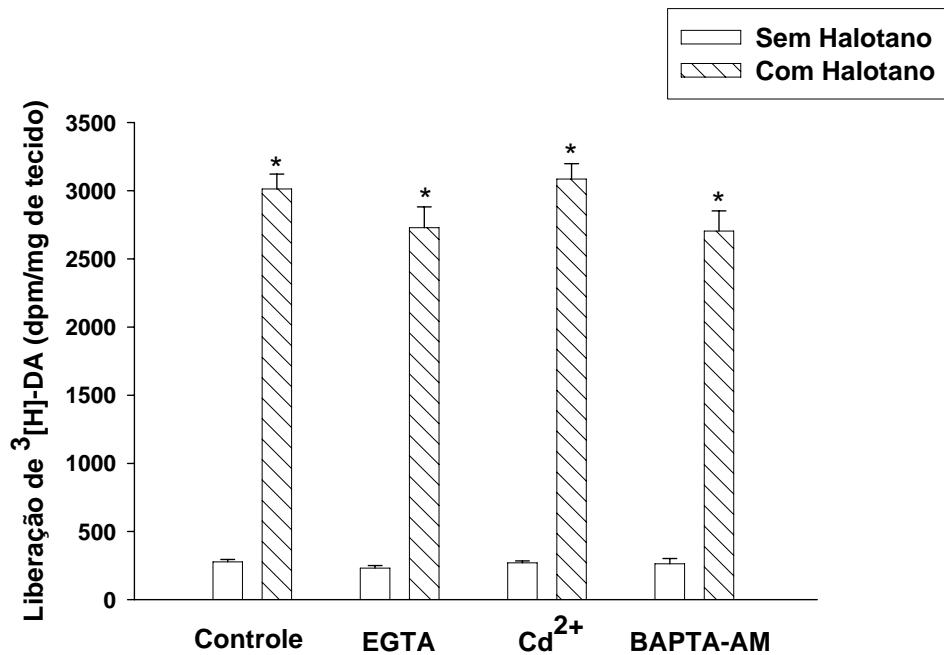


**Figura 5: Efeito do EGTA, Cd<sup>2+</sup> e BAPTA na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de EGTA (2,0mM) ou Cd<sup>2+</sup> (100μM) ou por 30 minutos na presença ou ausência de BAPTA-AM (50μM) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* estatisticamente diferente do controle.

Os experimentos com EGTA e BAPTA-AM foram realizados na ausência de cálcio no meio de incubação.

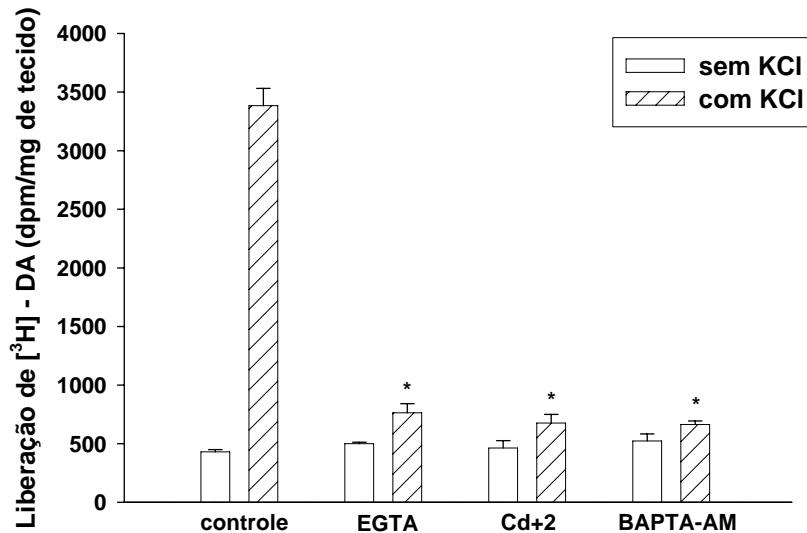


**Figura 6: Efeito do EGTA, Cd<sup>2+</sup> e BAPTA na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de EGTA (2,0mM) ou Cd<sup>2+</sup> (100μM) ou por 30 minutos na presença ou ausência de BAPTA-AM (50μM) e, subsequentemente, estimuladas com halotano (0,048mM) durante 10 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* estatisticamente diferente do controle.

Os experimentos com EGTA e BAPTA-AM foram realizados na ausência de cálcio no meio de incubação.



**Figura 7: Efeito do EGTA,  $\text{Cd}^{+2}$  e BAPTA na liberação de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-DA}$  induzida por KCl em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com  $[\text{}^3\text{H}]\text{-DA}$  foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de EGTA (2,0mM) ou  $\text{Cd}^{+2}$  (100 $\mu\text{M}$ ) ou por 30 minutos na presença ou ausência de BAPTA-AM (50 $\mu\text{M}$ ) e, subsequentemente, estimuladas KCl (50 mM) durante 15 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

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

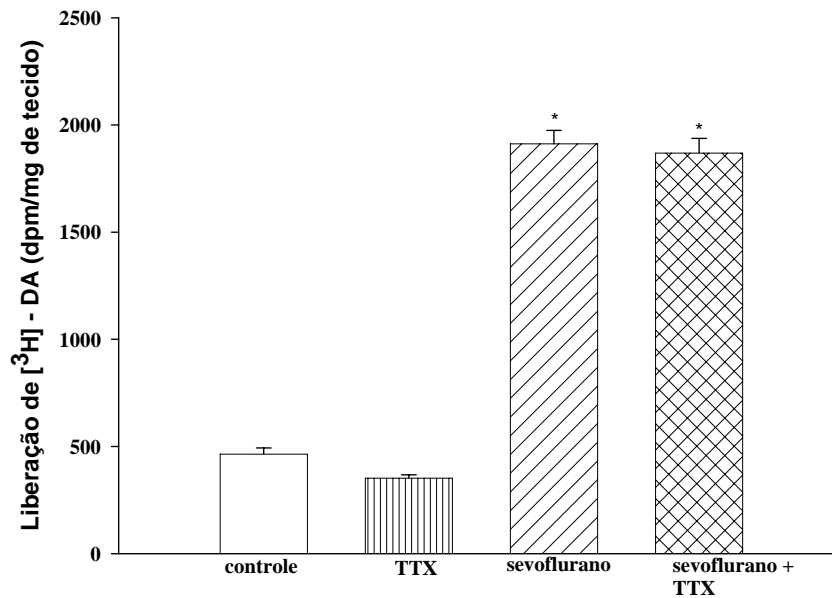
Os experimentos com EGTA e BAPTA-AM foram realizados na ausência de cálcio no meio de incubação.

#### **4.4 Participação dos canais de sódio sensíveis à TTX na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.**

O influxo de Na<sup>+</sup> através da membrana é um elemento fundamental no processo de despolarização e conseqüente liberação de neurotransmissores. Assim, a liberação de DA induzida pelo anestésicos poderia estar relacionada com alterações na entrada desse íon através de canais sensíveis à voltagem. Para investigar esta hipótese, utilizou-se a tetrodotoxina (TTX), potente inibidor de canais de sódio sensíveis à voltagem que bloqueia a geração e a propagação do potencial de ação em tecidos excitáveis (Moore & Narahashi, 1967).

As fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas em meio de incubação por 15 minutos na presença ou ausência de TTX (1 µM) e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048 mM) durante 10 minutos.

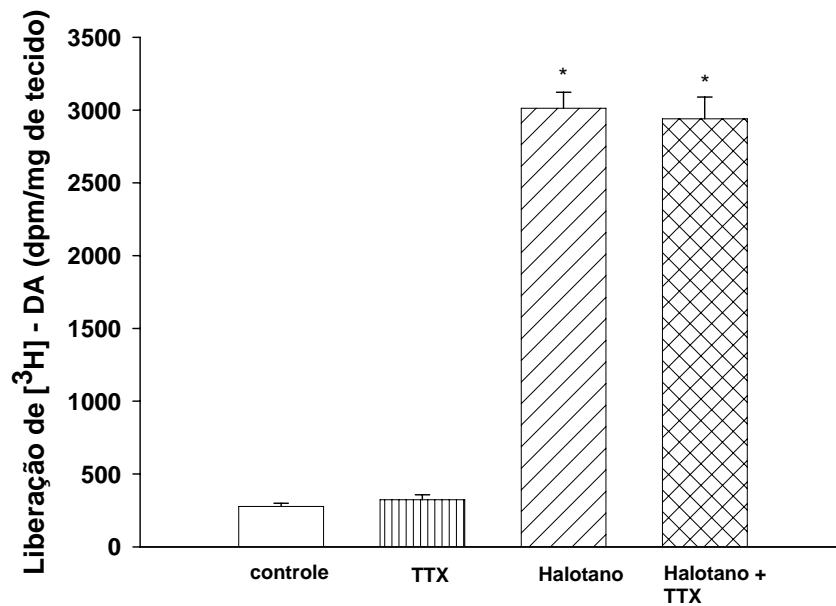
As Figuras 8 e 9 mostram que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelos anestésicos sevoflurano e halotano não foi afetada pela presença TTX (p>0,05), sugerindo que a respostas dos anestésicos é independente da despolarização de membrana.



**Figura 8: Efeito da TTX na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de TTX (1  $\mu$ M) e, subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* estatisticamente diferente do controle,  $p < 0,05$ .



**Figura 9: Efeito da TTX na liberação de [3H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [3H]-DA foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de TTX (1  $\mu$ M) e, subsequentemente, estimuladas com halotano (0,048mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* estatisticamente diferente do controle,  $p < 0,05$ .

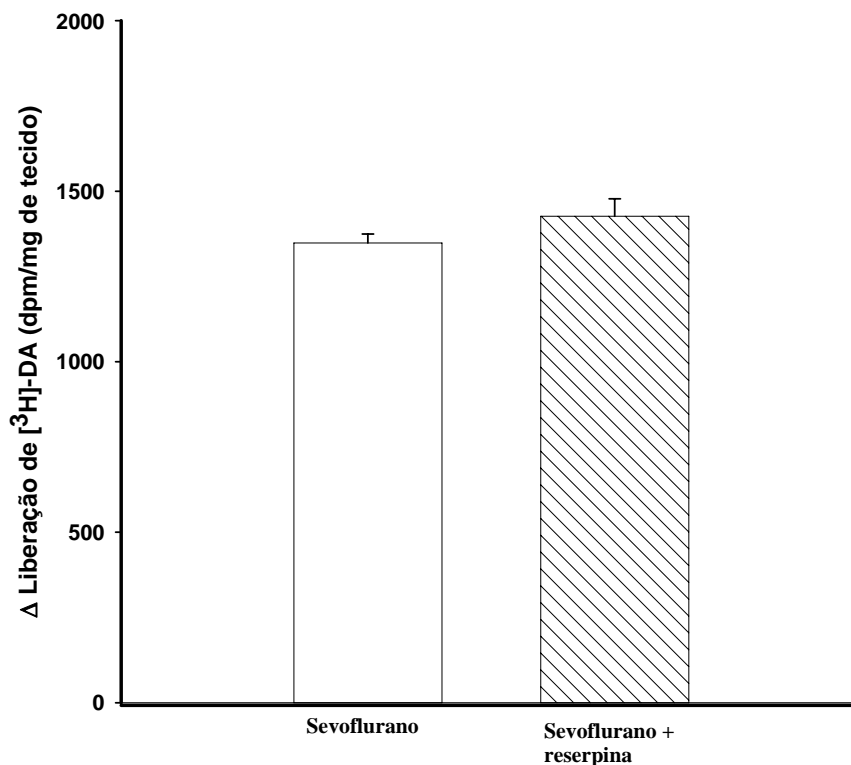
#### **4.5 Liberação de [3H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença da reserpina**



Já está bem estabelecida a liberação de dopamina através de um processo excitatório, envolvendo alterações no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  através de canais sensíveis à voltagem ou cálcio proveniente do meio intracelular. Uma vez que observamos que a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano é independente do íon cálcio e da despolarização de membrana, investigou-se através da reserpina (inibidor do transportador vesicular das monoaminas) se esta DA liberada é independente do processo excitatório.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da reserpina ( $0,03 \mu\text{M}$ ), posteriormente marcadas com [ $^3\text{H}$ ]-DA e, subsequentemente, incubadas novamente por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da reserpina ( $0,03 \mu\text{M}$ ) e estimuladas com sevoflurano ( $0,46 \text{ mM}$ ) durante 20 minutos ou halotano ( $0,048 \text{ mM}$ ) durante 10 minutos. As figura 10 e 11 mostram que a reserpina não afetou a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-DA induzida pelos anestésicos ( $p > 0,05$ ). A reserpina inibiu significativamente a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-DA induzida por altas concentrações de potássio ( $50 \text{ mM}$ ) (dados não mostrados).

Esses dados sugerem que o mecanismo de excitação não está envolvido na ação desses anestésicos, ou seja, a liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos é, possivelmente, de origem não vesicular.



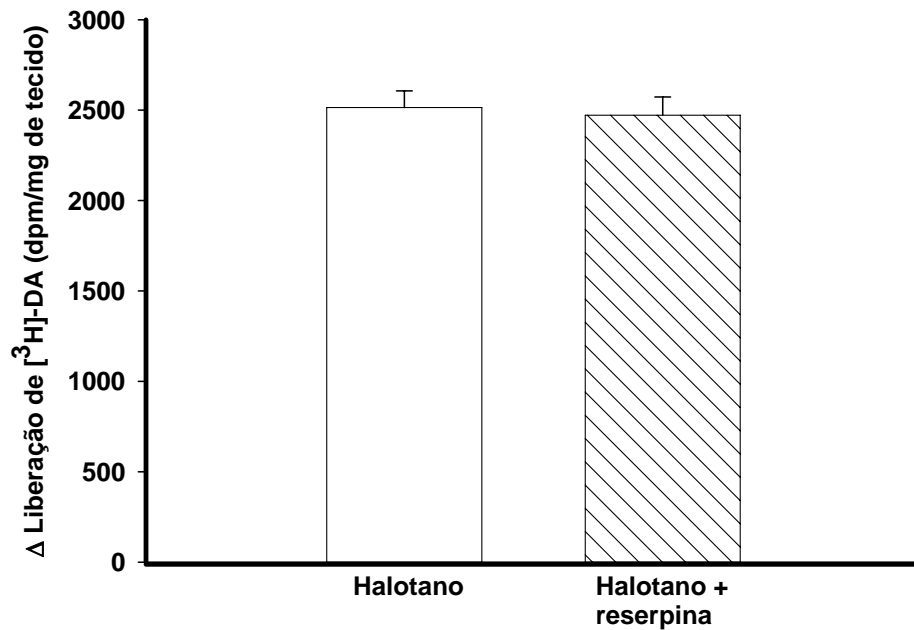
**Figura 10: Efeito da reserpina na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) foram pré-incubadas por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da reserpina (0,03  $\mu$ M), posteriormente marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA e, subseqüentemente, incubadas novamente por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da reserpina (0,03 $\mu$ M) e estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos. Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de [<sup>3</sup>H]dopamina que corresponde à seguinte relação:

sevoflurano - controle

(sevoflurano + reserpina)- reserpina.

Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas



**Figura 11: Efeito da reserpina na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) foram pré-incubadas por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da reserpina (0,03 $\mu$ M), posteriormente marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA e, subseqüentemente, incubadas novamente por 15 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da reserpina (0,03 $\mu$ M) e estimuladas com halotano (0,048mM) durante 10 minutos. Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de [<sup>3</sup>H]DA que corresponde à seguinte relação:

halotano - controle

(halotano + reserpina) - reserpina.

Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas

#### **4.6 Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (12 °C)**

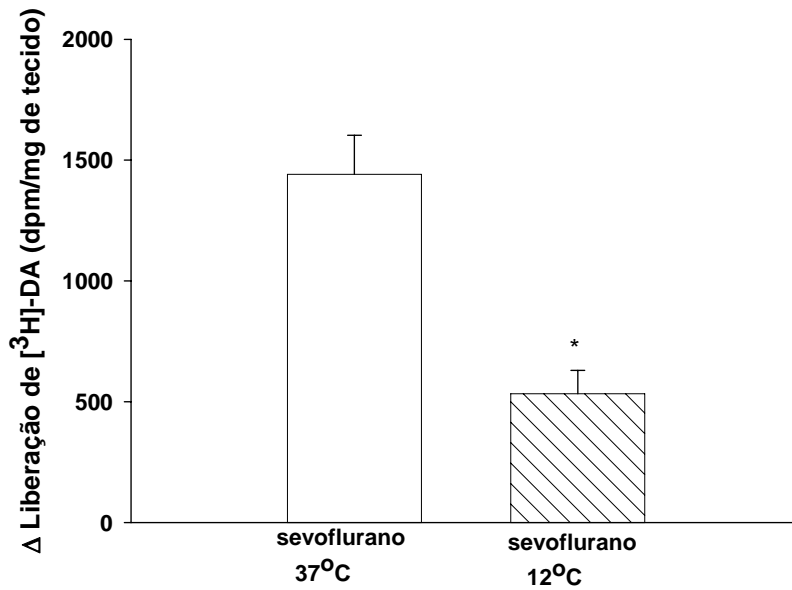
O principal papel do DAT é terminar a ação da DA, através da sua recaptação. Assim, uma inibição do DAT causa aumento da concentração da DA na fenda sináptica, prolongando sua ação (Engberg e cols., 1997). Além disso, o DAT também é responsável por um aumento da concentração de DA extracelular através de uma liberação extravesicular desse neurotransmissor, denominada TR (como já citado anteriormente). Logo, estudamos a participação do DAT na liberação de DA induzida por sevoflurano e halotano.

Estudos já mostraram que em baixas temperaturas (12 a 17 °C) ocorre uma inibição do DAT, afetando suas funções nos neurônios dopaminérgicos (Gerevich e cols., 2001). Assim, avaliamos se a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos é alterada em baixa temperatura.

Nestes experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C ou 12 °C, e subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048 mM) durante 10 minutos.

A Figura 12 mostra que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos em meio de incubação a 12 °C foi significativamente reduzida. (63,1% de inibição) ( $p < 0,05$ ).

A Figura 13 mostra que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por halotano também foi inibida em 39,7% em relação ao experimento realizado em meio de incubação a 37°C ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12 : Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (12 °C)**

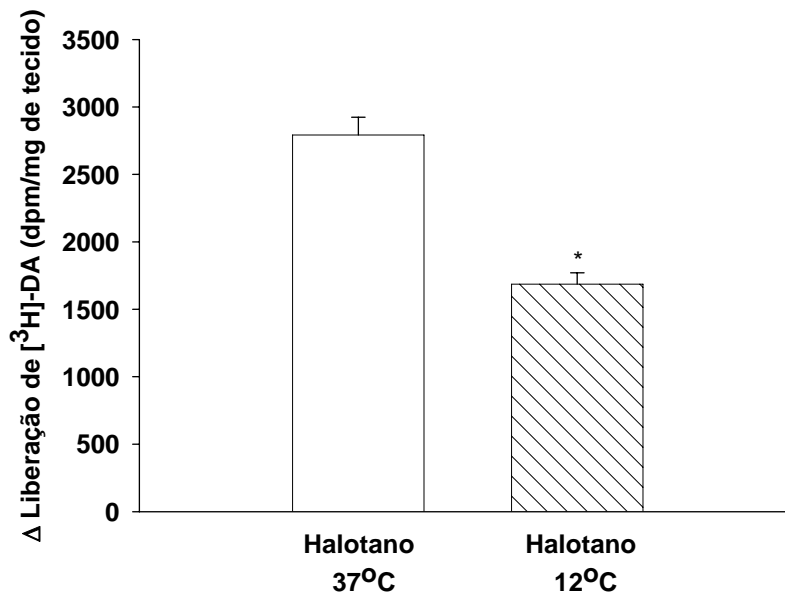
Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C ou 12 °C, e subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [<sup>3</sup>H]dopamina que corresponde à seguinte relação:

sevoflurano 37°C - controle 37°C

sevoflurano 12°C - controle 12°C.

\* Estatisticamente diferente do sevoflurano 37°C, p<0,05.



**Figura 13 : Liberação de  $[^3\text{H}]$ -DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos em baixa temperatura (12 °C)**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com  $[^3\text{H}]$ -DA foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de incubação a 37°C ou 12 °C, e subsequentemente, estimuladas com halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de  $[^3\text{H}]$ dopamina que corresponde à seguinte relação:

halotano 37°C - controle 37°C

halotano 12°C - controle 12°C.

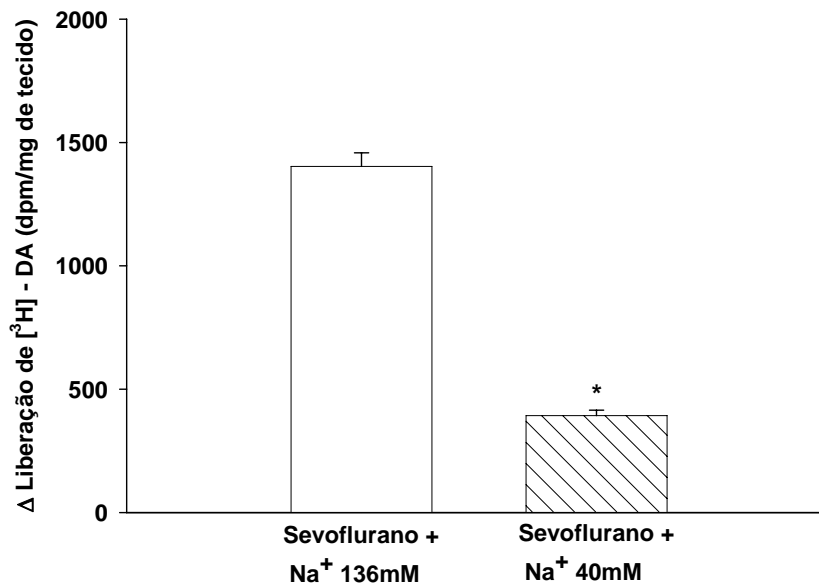
Estatisticamente diferente do halotano 37°C,  $p < 0,05$ .

#### **4.7 Efeito do gradiente de Na<sup>+</sup> na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

O DAT é uma glicoproteína de membrana plasmática que pertence a uma superfamília de transportadores de membrana dependentes de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (Krueger, 1990). Como, o funcionamento do DAT está diretamente relacionado com o gradiente de Na<sup>+</sup> extra e/ou intracelular, investigou-se o papel do mesmo na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos.

As fatias de córtex cerebral foram incubadas em meio de incubação contendo 136 mM (controle) ou 40 mM de Na<sup>+</sup> e subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Nesses experimentos o Na<sup>+</sup> do meio de incubação foi parcialmente substituído por cloreto de colina, para manter a isotonicidade da solução.

As Figuras 14 e 15 mostram que a diminuição do Na<sup>+</sup> no meio de incubação inibiu significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos, sugerindo o envolvimento do DAT ( $p > 0,05$ ). A figura 14 mostra que os experimentos nos quais houve redução do Na<sup>+</sup> no meio de incubação, a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano foi inibida (71,99%). A figura 15 mostra que a resposta do halotano também é dependente do Na<sup>+</sup>, pois, verifica-se uma inibição de 56,2% na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo halotano.



**Figura 14: Efeito do gradiente de  $\text{Na}^+$  na liberação de  $[^3\text{H}]$ -DA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

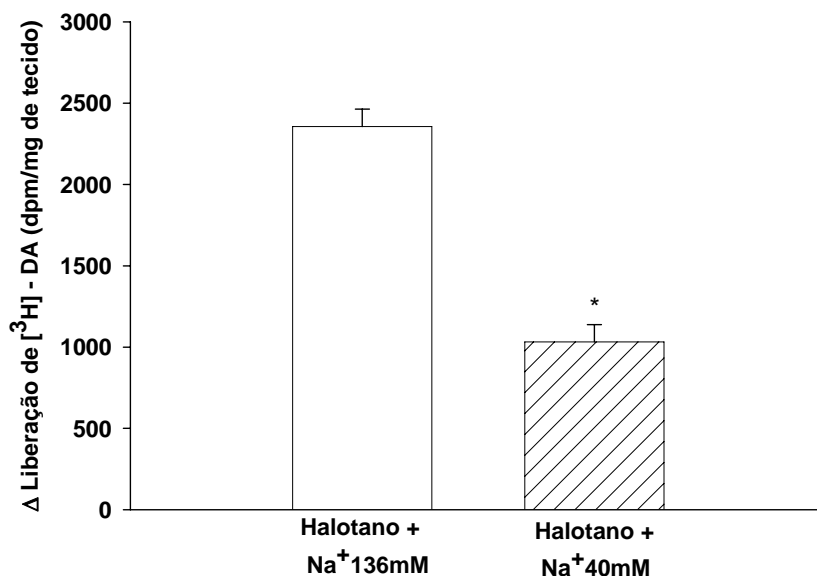
Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com  $[^3\text{H}]$ -DA foram incubadas em meio contendo 136mM (controle) ou 40 mM de  $\text{Na}^+$  e subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,48mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de  $[^3\text{H}]$ DA que corresponde à seguinte relação:

sevoflurano +  $\text{Na}^+$  136mM - controle

sevoflurano +  $\text{Na}^+$  40mM -  $\text{Na}^+$  40mM.

\* Estatisticamente diferente do sevoflurano em meio contendo 136mM,  $p < 0,05$ .





**Figura 15: Efeito do gradiente de Na<sup>+</sup> na liberação de [3H]-DA induzida pelo halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [3H]-DA foram incubadas em meio contendo 136 mM (controle), ou 40 mM de Na<sup>+</sup> e subsequentemente, estimuladas com halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [3H]-DA que corresponde à seguinte relação:

halotano + Na<sup>+</sup> 136mM - controle

halotano + Na<sup>+</sup> 40mM - Na<sup>+</sup> 40mM.

\*Estatisticamente diferente do halotano em meio contendo 136 mM, p<0,05.

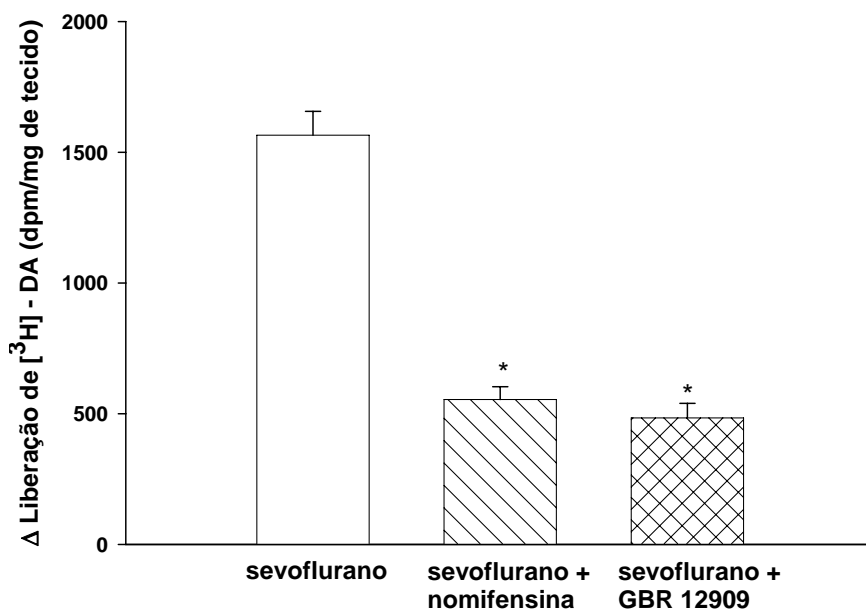
#### **4.8 Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de inibidores do DAT**

Para avaliarmos de forma direta se o DAT estaria realmente envolvido na liberação de DA induzida pelos anestésicos, estudamos o efeito da nomifensina, inibidor de alta afinidade desse transportador (Herdon & Nahorski, 1987) e o GBR12909, inibidor seletivo do DAT, atuando por inibição competitiva (Andersen, 1989).

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 20 minutos em meio de incubação na presença ou ausência da nomifensina (10  $\mu$ M) ou GBR12909 (10  $\mu$ M), e subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048 mM) durante 10 minutos.

A Figura 16 mostra que a nomifensina e o GBR12909 inibiram significativamente a resposta do sevoflurano ( $p < 0,05$ ). A nomifensina inibiu 64,7 % e o GBR12909 inibiu 69,1 % a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano.

A Figura 17 mostra que as drogas inibidoras do DAT utilizadas também inibiram significativamente a resposta do halotano ( $p < 0,05$ ). A nomifensina inibiu 49,3 % e o GBR12909 inibiu 67,6 % a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo halotano. Esses dados sugerem, portanto, que o aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos ocorre, principalmente, a partir de uma ação direta no DAT.

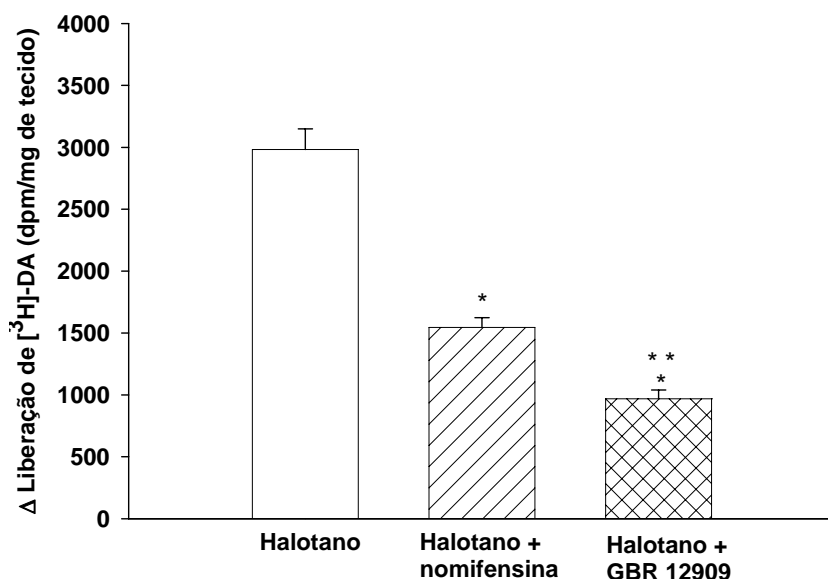


**Figura 16 : Efeito da nomifensina e do GBR12909 na liberação de [3H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [3H]-DA foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência da nomifensina (1 μM) ou GBR12909 (10 μM) e subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [3H]-DA que corresponde à seguinte relação:

- sevoflurano - controle
- (sevoflurano + nomifensina) - nomifensina
- (sevoflurano + GBR12909) - GBR12909.

\* Estatisticamente diferente do sevoflurano,  $p < 0,05$ .



**Figura 17 : Efeito da nomifensina e do GBR12909 na liberação de [3H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [3H]-DA foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência da nomifensina (1  $\mu$ M) ou GBR12909 (10  $\mu$ M) e subseqüentemente, estimuladas com halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de [3H] DA que corresponde à seguinte relação:

halotano - controle

(halotano + nomifensina) - nomifensina

(halotano + GBR12909) - GBR12909.

\* Estatisticamente diferente do halotano,  $p < 0,05$ .

\*\* Estatisticamente diferente do halotano + nomifensina,  $p < 0,05$ .

#### **4.9 O papel do transportador de noradrenalina (NET) na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.**

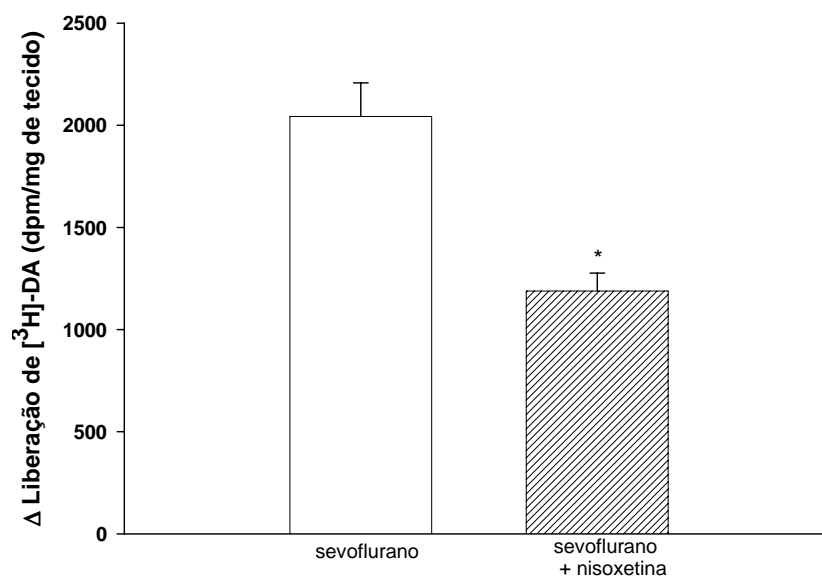
Estudos demonstraram que a DA pode ser co-transportada pelo transportador de noradrenalina (NET) em diversas regiões cerebrais, principalmente no córtex pré-frontal. (Morón e cols., 2002; revisto por Torres e cols., 2003).

Desta forma, avaliamos o envolvimento do transportador de noradrenalina (NET) na liberação de dopamina induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos, utilizando nisoxetina, um inibidor desse transportador.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas em meio de incubação por 30 minutos na presença ou ausência de nisoxetina (10  $\mu$ M), em experimentos independentes e, subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048 mM) durante 10 minutos.

A Figura 18 mostra que a nisoxetina inibiu significativamente a resposta do sevoflurano ( $p < 0,05$ ). A nisoxetina inibiu 41,86 % a liberação de [ $^3$ H]-DA induzida pelo sevoflurano.

A figura 19 mostra que a droga inibidora do NET utilizada também inibiu significativamente a resposta do halotano ( $p < 0,05$ ). A nisoxetina inibiu 44.23% a liberação de [ $^3$ H]-DA induzida pelo halotano. Esses dados sugerem, o envolvimento também do NET no aumento da liberação de [ $^3$ H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos.



**Figura 18 : Efeito da nisoxetina na liberação de [3H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos**

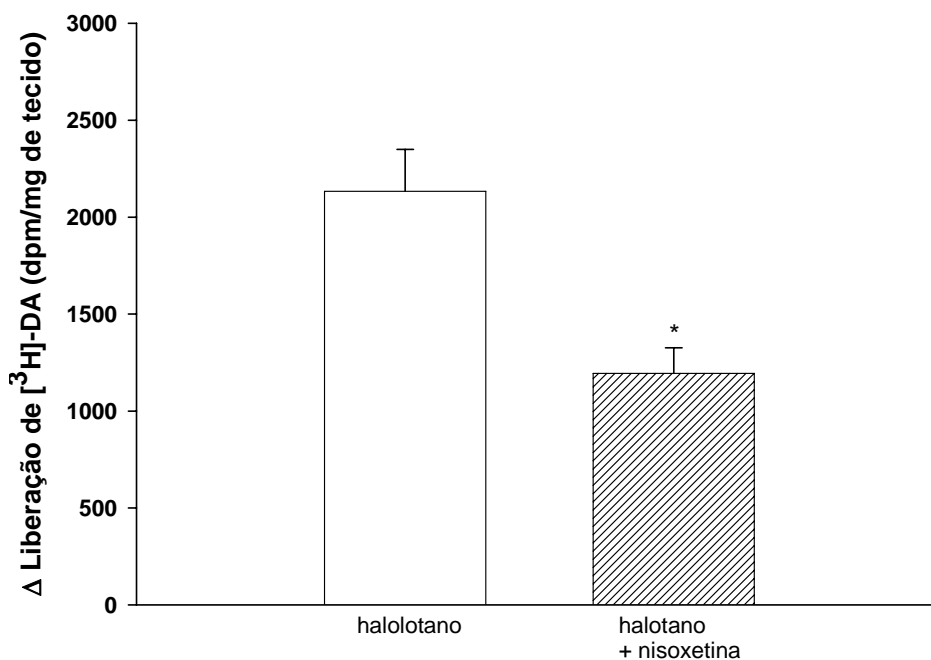
Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [3H]-DA foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência da nisoxetina (10  $\mu$ M) e subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,63 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de [3H]-DA que corresponde à seguinte relação:

halotano - controle

(halotano + nisoxetina) - nisoxetina.

\* Estatisticamente diferente do halotano,  $p < 0,05$ .



**Figura 19 : Efeito da nisoxetina na liberação de  $[^3\text{H}]\text{-DA}$  induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com  $[^3\text{H}]\text{-DA}$  foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência da nisoxetina (10  $\mu\text{M}$ ) e subsequente, estimuladas com halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo  $\Delta$  da liberação de  $[^3\text{H}]\text{-DA}$  que corresponde à seguinte relação: halotano - controle

(halotano + nisoxetina) - nisoxetina.

\* Estatisticamente diferente do halotano,  $p < 0,05$ .

#### **4.10 Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença da ouabaína.**

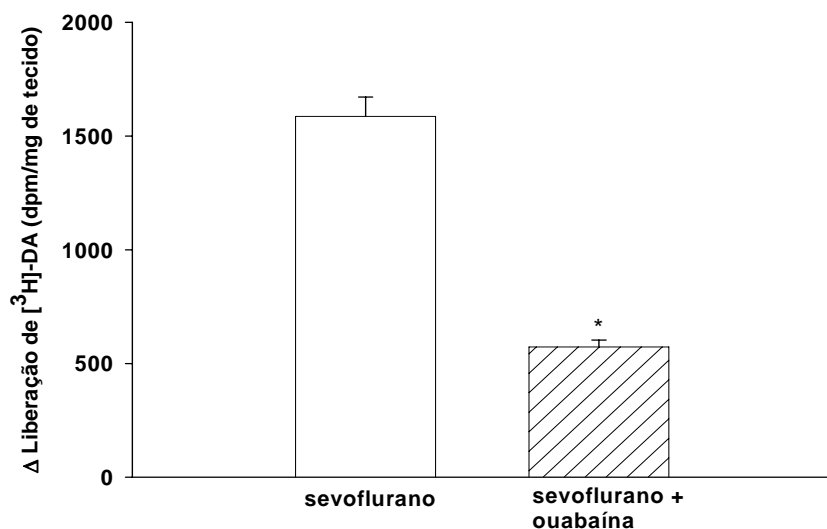
Como já citado anteriormente o ciclo do transporte de DA pelo transportador de membrana é caracterizado por um processo eletrogênico que possibilita a entrada de uma molécula de DA com duas moléculas de Na<sup>+</sup> e uma de Cl<sup>-</sup>, que são co-transportadas (Kruger, 1990).

Estudos já mostraram que a ouabaína, potente e seletivo inibidor da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, pode aumentar a liberação de DA, uma vez que o gradiente de Na<sup>+</sup> é alterado na presença dessa droga (revisto por Leviel, 2001). Os resultados mostrados anteriormente evidenciaram que a diminuição do Na<sup>+</sup> no meio de incubação interferiu significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos, sugerindo o envolvimento transportadores de membrana dependentes de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, o DAT e o NET. Dessa forma, resolvemos estudar se a ouabaína interfere na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença da ouabaína.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 20 minutos em meio de incubação na presença ou ausência de ouabaína (100 μM), e subseqüentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46mM) durante 20 minutos ou halotano (0,048mM) durante 10 minutos. As figuras 20 e 21 mostram que o sevoflurano e o halotano foram menos eficazes em liberar DA quando pré-incubamos as fatias com ouabaína (redução de 63,9% e 69,2% respectivamente). De fato, a ouabaína aumenta a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos (dados não mostrados), logo



essa droga diminui a probabilidade de liberação de DA induzida pelos anestésicos. Esses dados sugerem, mais uma vez, que o sevoflurano e halotano induzem um aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos principalmente a partir de transportadores de membrana.



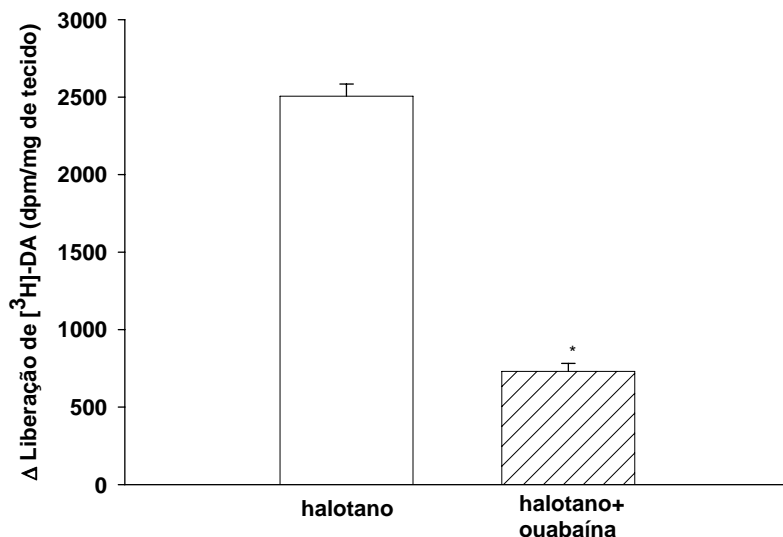
**Figura 20: Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]-DA foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência da ouabaína (100 μM) e subsequentemente, estimuladas com sevoflurano (0,46 mM) durante 20 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA que corresponde à seguinte relação:

sevoflurano - controle

(sevoflurano + ouabaína) - ouabaína.

\* Estatisticamente diferente do sevoflurano,  $p < 0,05$ .



**Figura 21: Liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) marcadas com [<sup>3</sup>H]-dopamina foram pré-incubadas por 20 minutos na presença ou ausência da ouabaína (100 μM) e subseqüentemente, estimuladas com halotano (0,048 mM) durante 10 minutos. Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA que corresponde à seguinte relação:

halotano - controle

(halotano + ouabaína) - ouabaína.

\* Estatisticamente diferente do halotano,  $p < 0,05$ .

#### **4.11 A participação da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase na liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.**

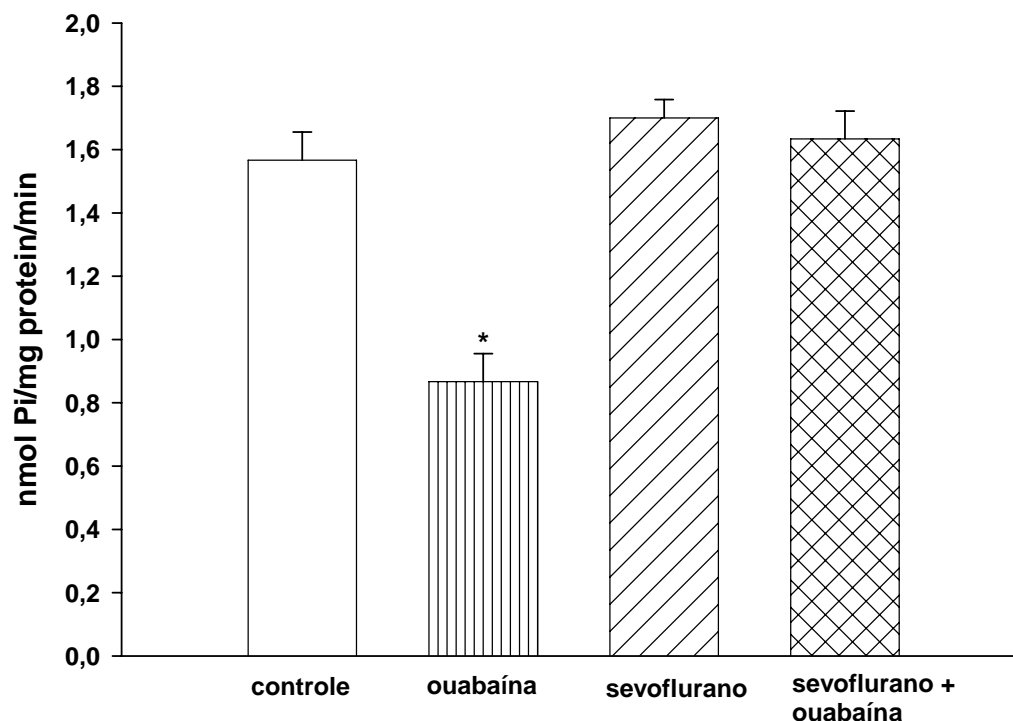
Estudos demonstraram que a ouabaína aumenta a liberação de DA através da reversão dos transportadores de membrana em consequência do aumento intracelular do  $\text{Na}^+$ , na presença desta droga (Fairbrother e cols., 1990). Já foi mostrado anteriormente que a ouabaína interfere com a liberação de DA induzida pelos anestésicos. Assim, uma das possibilidades é que o halotano e sevoflurano estariam aumentando a liberação de DA através de um mecanismo semelhante ao da ouabaína, ou seja, inibindo a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

Grande parte da energia produzida pela célula, adenosina trifosfato (ATP), é utilizada pela bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. A medida que o ATP é quebrado pela célula para o funcionamento das ATPases, o fosfato inorgânico gerado é utilizado para a formação de mais ATP ou pode extravazar para o meio extracelular através da membrana plasmática.

Assim, para avaliarmos o envolvimento da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase na resposta dos anestésicos mensuramos o fosfato inorgânico liberado em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína e/ou halotano ou sevoflurano.

Nesses experimentos as fatias foram colocadas em banho com agitação (120 rpm), pré-incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 minutos na presença ou ausência de ouabaína e subsequentemente, administrado os anestésicos sevoflurano ou halotano (após o período de incubação as reações foram interrompidas com ácido tricloroacético a 10%). O fosfato presente no sobrenadante (meio de incubação 2) após a incubação foi expresso em nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína.

Conforme podemos observar nas figuras 22 e 23 os anestésicos, diferentemente da ouabaína, não diminuíram a quantidade de fosfato inorgânico liberado das fatias em relação ao controle. Esses resultados sugerem que os anestésico halotano e sevoflurano não inibem a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

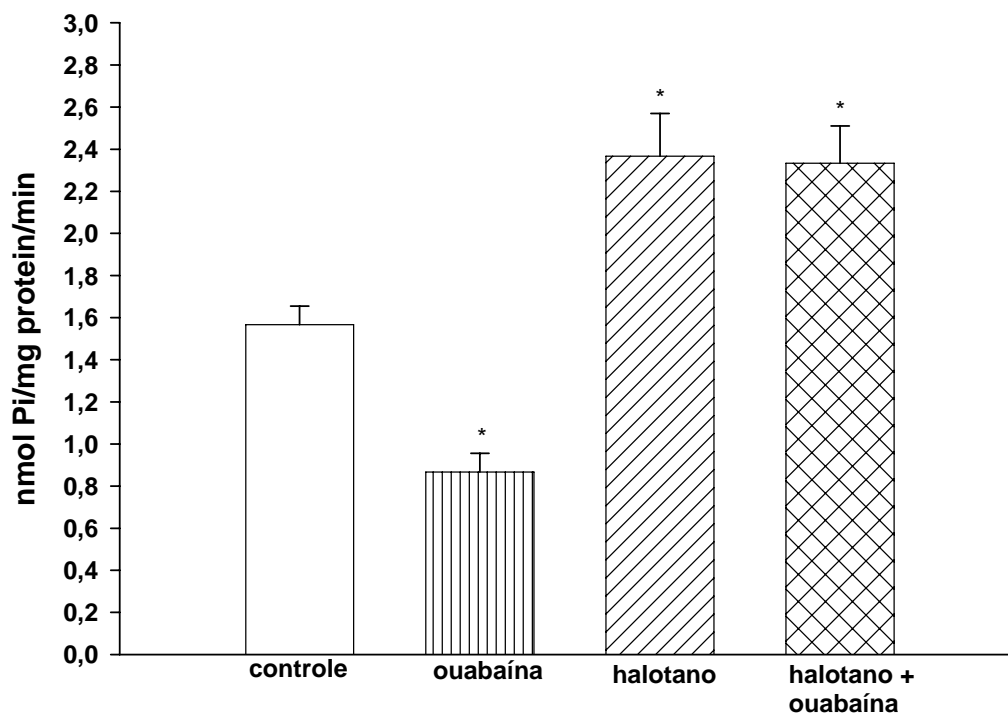


**Figura 22: Liberação de fosfato inorgânico em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína e/ou sevoflurano.**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) foram estimuladas a 37°C durante 20 minutos na presença ou ausência de ouabaína (100  $\mu$ M) e subseqüentemente, administrado o anestésico sevoflurano durante 20 minutos. O fosfato presente no sobrenadante após a centrifugação foi mensurado a partir do método Chan et al. (1986). A liberação de fosfato foi expressado em nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína.

Para a dosagem de proteína das fatias de córtex cerebral de ratos foi utilizado o método Bradford. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos quatro experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* Estatisticamente diferente do controle,  $p < 0,05$ .



**Figura 23: Liberação de fosfato inorgânico em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína e halotano**

Fatias de córtex cerebral de ratos (40 mg) foram estimuladas a 37°C durante 20 minutos na presença ou ausência de ouabaína (100  $\mu$ M) e subseqüentemente, administrado o anestésico halotano durante 10 minutos. O fosfato presente no sobrenadante após a centrifugação foi mensurado a partir do método Chan et al. (1986). A liberação de fosfato foi expressado em nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína.

Para a dosagem de proteína das fatias de córtex cerebral de ratos foi utilizado o método Bradford. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de pelo menos quatro experimentos individuais realizados em duplicatas.

\* Estatisticamente diferente do controle,  $p < 0,05$ .

#### **4.12: Efeito do sevoflurano, halotano e GBR12909 na captação da DA em fatias de córtex cerebral de ratos**

A metodologia utilizada para o estudo de liberação de DA é baseada na captação do [<sup>3</sup>H]-DA (atividade específica 49.0 Ci/mmol) pela fatia, a partir do DAT. Assim, as fatias de córtex cerebral de ratos são incubadas por 30 minutos com [<sup>3</sup>H]-DA. É justamente nessa fase que ocorre a captação do [<sup>3</sup>H]-DA pelo tecido. De acordo com os nossos resultados, os anestésicos sevoflurano e halotano induzem um aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos principalmente a partir do DAT. Logo, avaliamos o efeito do sevoflurano, halotano e GBR12909 (controle) na captação da DA em fatias de córtex cerebral de ratos.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas por 20 minutos em meio de incubação na presença ou ausência do sevoflurano (0,46 mM) ou GBR12909 (10 µM) ou por 10 minutos na presença ou ausência de halotano (0,048 mM), e subseqüentemente, marcadas com 0,20 µCi de [<sup>3</sup>H]-DA durante 30 minutos. Após a marcação, as fatias foram transferidas para tubos de centrífuga que já se encontravam em gelo e, logo após, centrifugadas a 3300 g por cinco minutos, a 4°C. Após a retirada do sobrenadante, as fatias do controle e as pré-incubadas com o halotano, sevoflurano e GBR 12909 foram colocadas em 2000 µL de ácido tricloroacético a 10%, deixadas por 44 horas em temperatura ambiente, agitadas no vórtex por cinco vezes neste espaço de tempo. As fatias foram, então, centrifugadas à temperatura ambiente, e do sobrenadante retirados 100 µL que foram levados ao espectrofotômetro de cintilação líquida para leitura da radioatividade.



Os resultados obtidos são mostrados nas TABELAS 1 e 2. Ocorreu uma diminuição de 40,3% e 44,7% na captação de [<sup>3</sup>H]-DA nas fatias pré-tratadas com o sevoflurano ou GBR12909 respectivamente. (TAB 1). Nos experimentos realizados com o anestésico halotano foi observada uma inibição de 69,45 % da captação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos (TAB. 2). Portanto, o DAT parece, realmente, ser um dos alvos moleculares de ação dos anestésicos inalatórios sevoflurano e halotano na transmissão dopaminérgica em fatias de córtex cerebral de ratos.

**TABELA 1 - Contagem da radioatividade das fatias de córtex cerebral de ratos do sevoflurano**

Amostras	[ <sup>3</sup> H]-DA (dpm/mg de tecido)		
	Controle 20 min	Sevoflurano (0,46 mM)	GBR12909
Fatia	8418 ± 129,3	5031.3 ± 331,4*	4657 ± 79,8*

Os resultados são expressos em dpm/mg de tecido e mostram a média ± EPM de pelo menos cinco (n=5) experimentos diferentes, realizados em duplicata. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle.

**TABELA 2 - Contagem da radioatividade das fatias de córtex cerebral de ratos na presença do halotano**

Amostras	$[^3\text{H}]\text{-DA}$ (dpm/mg de tecido)		
	Controle 10 min	Halotano (0,048 mM)	GBR12909
Fatia	7815 $\pm$ 222,3	2428 $\pm$ 78,07*	4376 $\pm$ 79,8*

Os resultados são expressos em dpm/mg de tecido e mostram a média  $\pm$  EPM de pelo menos três (n=5) experimentos diferentes, realizados em duplicata. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle.

## **5 Discussão e Conclusão**

Apesar de passado mais de um século da descoberta das propriedades dos anestésicos inalatórios, o mecanismo de ação desses agentes ainda não está bem esclarecido. Entretanto, existe uma questão especial sobre a influência desses agentes na neurotransmissão e um componente importante de suas ações parece ser a alteração da função sináptica no SNC (Griffiths & Norman, 1993). Evidências indicam que as ações dos anestésicos gerais resultam em uma depressão das sinapses excitatórias e/ou potencialização das sinapses inibitórias e a magnitude dessa resposta pode ser modulada através da liberação de neurotransmissores. Porém, estudos demonstram que os anestésicos gerais modulam a transmissão sináptica no SNC através de mecanismos tanto pré-sinápticos (liberação de neurotransmissores) como pós-sinápticos, afetando diretamente os receptores pós-sinápticos (Westphalen & Hemmings, 2002). Portanto, a investigação dos efeitos dos anestésicos na liberação de neurotransmissores pode fornecer informações adicionais em relação aos mecanismos que contribuem com as ações desses agentes durante a anestesia. Em estudos anteriores foi observado que os anestésicos sevoflurano, halotano e isoflurano aumentam a liberação exocitótica de acetilcolina em fatias de córtex cerebral de ratos (Gomez e cols, 1999, Gomez e cols., 2000; Silva e cols., 2005).

A DA é um neurotransmissor que exerce importantes funções no SNC tais como atividade motora, consciência e processos cognitivos. Assim, a modulação da transmissão dopaminérgica pode ser um alvo de ação dos anestésicos inalatórios (Keita e cols., 1999; Adachi e cols., 2001; Miyano e cols., 1993). Para compreendermos melhor como esses agentes podem afetar a liberação de neurotransmissores no SNC, avaliamos, neste

trabalho, o efeito do sevoflurano e halotano na liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos.

No presente estudo demonstramos que o anestésico sevoflurano (0,058, 0,11, 0,23, 0,46 e 0,93 mM) aumentou significativamente a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos (Figura 1). Os resultados obtidos com o halotano (Figura 2) mostram que esse anestésico também foi capaz de induzir um aumento na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA, de forma que todas as concentrações do halotano utilizadas (0,012, 0,024, 0,048, 0,072 e 0,096 mM) aumentaram significativamente a liberação basal de [<sup>3</sup>H]-DA ( $p < 0.05$ ). Keita e cols. (1999) também demonstraram que os anestésicos halotano e isoflurano aumentaram a liberação espontânea de DA em fatias de neostriado de ratos. Em sinaptosomas de corpo estriado de ratos obteve-se resultado semelhante: os anestésicos halotano, enflurano e isoflurano induziram um aumento significativo da liberação espontânea de DA. Alguns estudos *in vivo* também demonstraram um aumento na concentração de DA no SNC após anestesia induzida pelo halotano e isoflurano (Miyano e cols., 1993; Stahle e cols., 1990).

Os resultados obtidos com o halotano e sevoflurano sugerem que a anestesia pode estar associada ao aumento significativo da liberação de DA no córtex cerebral. Durante a recuperação da anestesia induzida por agentes inalatórios pode ser observada uma hiperlocomoção. Sabe-se que a DA exerce importante função no controle da atividade motora, assim é possível que esse efeito clínico observado possa estar associado com um aumento da DA extracelular (Irifune e cols., 1997). Além disso, o estudo de Becker e cols. (2003) sugere que doses subanestésicas de cetamina, anestésico intravenoso, induzem aumento da atividade motora e gera alterações comportamentais diretamente

relacionadas com a esquizofrenia. Tem sido proposto por vários trabalhos que transtornos psicóticos como a esquizofrenia estão relacionados com alterações na transmissão dopaminérgica. Essa hipótese tem sido reforçada pela observação de que sinais positivos da esquizofrenia podem ser induzidos por drogas psicoestimulantes, como a anfetamina, que aumentam a transmissão dopaminérgica (Goldstein e cols., 1997).

Após a observação de que o sevoflurano e halotano levam a um aumento da liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos, investigou-se como esses anestésicos estariam interferindo na liberação basal desse neurotransmissor. A liberação estimulada de DA no SNC pode ser desencadeada por diversos mecanismos. O usual é que ocorra liberação pela exocitose das vesículas sinápticas, que é dependente de cálcio extracelular (Drapeal & Blaustein, 1983). Assim, estudou-se a participação do cálcio extracelular na liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano.

A partir dos resultados do presente trabalho observou-se que o  $\text{Cd}^{2+}$  e o EGTA não afetaram a liberação de DA induzida pelo sevoflurano (figura 5) e halotano (figura 6). Esses dados indicam que a liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos induzida pelos anestésicos é independente do cálcio externo e não envolve a entrada desse íon através dos CCSV. Entretanto, Xu F. e cols (1998) demonstraram que concentrações clinicamente relevantes do halotano ou isoflurano inibem os CCSV tipo N. Yamakage e cols. (1995) também demonstraram que esses anestésicos voláteis podem deprimir as correntes dos canais de cálcio voltagem dependente e, conseqüentemente, inibir a transmissão sináptica. No entanto, Hall e cols (1994), investigando o efeito de vários anestésicos inalatórios e intravenosos em células de purkinje do cerebelo, observaram que os CCSV do tipo P são insensíveis a uma variedade de anestésicos gerais

(halotano, isoflurano, thiopental, pentobarbital e propofol). Além disso, a liberação de ACh induzida pelo sevoflurano, halotano e isoflurano em fatias de córtex cerebral de rato também é independente da presença do  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Gomez e cols., 1999, 2000; Silva e cols., 2005).

A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  exerce um papel importante na regulação da função das diferentes células incluindo a liberação de hormônios e neurotransmissores. Como em outras células, os neurônios utilizam fontes externas e internas de cálcio. Recentemente, foi descrito que a liberação excitotóxica de DA pode ser mediada por estoques de cálcio intracelulares (Bonanno e cols., 2000; Fernandes e cols., 2004). Existem vários trabalhos mostrando que os anestésicos inalatórios estimulam a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares em diversas células, incluindo, por exemplo, sinaptossomas de cérebro de camundongos (Daniell & Harris, 1988), fatias de hipocampo de ratos (Mody e cols., 1991) e em linhagem celular SN56 que apresentam fenótipo colinérgico (Gomez e cols., 2001; Pinheiro e cols., 2006). Além disso, já foi observado que o aumento da liberação de acetilcolina induzida pelo sevoflurano, halotano e isoflurano pode ser devido ao aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via estoques intracelulares (Gomez e cols., 1999, 2000; Silva e cols., 2005). Dessa forma, avaliamos se o gatilho para a liberação de DA induzida pelo sevoflurano seria o cálcio liberado a partir de estoques intracelulares desse íon.

Assim, investigamos se um quelante do cálcio intracelular, o BAPTA-AM (Adler e cols., 1991), interferiria na liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano. Nossos resultados mostram que a liberação de DA induzida pelos anestésicos não foi afetada pelo BAPTA-AM (Figura 5), sugerindo que a liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano, diferentemente da acetilcolina, é independente do cálcio



proveniente de estoques intracelulares. Assim, a liberação de DA induzida pelos anestésico é independente de cálcio do meio extra e intracelular.

A entrada do íon sódio através dos canais de sódio sensíveis à voltagem (CSSV) produz um aumento na concentração desse íon no terminal nervoso, causando a despolarização e a abertura dos CCSV e conseqüentemente a liberação vesicular de neurotransmissores (Jackson, 1995). Experimentos utilizando técnicas de eletrofisiologia indicam que os CSSV são alvos de ação dos anestésicos voláteis (Rehberg e cols., 1996; Ratnakumari e cols.,1998). No entanto, essa hipótese não é consistente com os achados do presente estudo, pois nossos resultados (figuras 8 e 9) mostram que a liberação de DA induzida pelos anestésicos sevoflurano e halotano não foi alterada pela presença TTX ( $p>0,05$ ), sugerindo que a liberação de DA induzida pelos anestésicos é independente da despolarização de membrana. Os nossos resultados são concordantes com os obtidos por Keita e cols.(1999) que demonstraram que o halotano e o isoflurano aumentam a liberação de dopamina em fatias de corpo estriado pré-tratadas com TTX.

Tem sido amplamente documentado que durante a liberação de neurotransmissores evocada por despolarização, uma fração de neurotransmissores é liberada para o espaço extracelular via exocitose, enquanto uma fração de alguns neurotransmissores, sódio-dependente, é liberada a partir do citoplasma via uma reversão dos transportadores de membrana (Adam-Vizi, 1992). Assim, nossos dados sugerem que a liberação de DA induzida pelos anestésicos sevoflurano e halotano parece ser de origem extravesicular.

Para investigar esta hipótese, utilizamos um inibidor do transportador vesicular das monoaminas, a reserpina. Pode-se observar pelas figuras 10 e 11 que a reserpina não

interferiu na resposta do sevoflurano e halotano, reforçando a hipótese de que o mecanismo de exocitose, dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ , realmente não está envolvido com a ação desses anestésicos.

A liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano poderia ser secundário à ação destes agentes no DAT, uma vez que já está bem estabelecido que a inibição do DAT ou liberação de DA via reversão desse transportador causa aumento da concentração do neurotransmissor na fenda sináptica, prolongando sua ação (Nelson, 1998; Engberg e cols., 1997; Adam-vizi, 1992).

Estudos, a partir de microdiálise *in vivo*, mostraram um aumento da concentração de DA em corpo estriado de ratos durante a anestesia induzida por halotano (Stahle e cols.,1990; Miyano e cols.,1993). Keita e cols. (1999) também demonstraram que os anestésicos inalatórios halotano e isoflurano aumentam a liberação espontânea de DA em fatias de neostriado de ratos. Além disso, Shahani e cols. (2002) observaram que a captação de DA foi inibida pelo halotano e isoflurano em células LLC-PK1 transfectadas DAT humano. Assim, passamos a investigar o papel do DAT na liberação de DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.

O DAT é uma glicoproteína de membrana plasmática que pertence a uma superfamília de transportadores de membrana dependentes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (Krueger, 1990) cuja principal função é terminar a ação do neurotransmissor através da recaptação, além de ser responsável também pela liberação da DA citosólica para a fenda sináptica (Leviel, 2001). Esse tipo de liberação de DA, denominado TR, ainda é bastante desconhecida, mas sabe-se que esse mecanismo exerce um papel fisiológico muito importante na liberação de DA somatodendrítica (Falkenburger e cols., 2001)

Dados da literatura sugerem que em baixas temperaturas (12 -17°C) somente o mecanismo exocitótico de liberação está operando, enquanto a liberação e captação via transportador de membrana está inibida, sendo a mudança de temperatura uma ferramenta alternativa para diferenciar a liberação exocitótica da não exocitótica (Vizi, 1998).

Variações na temperatura exercem efeitos na duração e na amplitude do potencial de ação (revisado por Vizi, 1998). Em baixas temperaturas a liberação exocitótica de neurotransmissores pode ocorrer. No entanto, a liberação de neurotransmissores através de transportadores de membrana é um processo ativo que requer, muitas vezes, energia e, portanto dependente de temperatura. Segundo Gerevick e cols. (2001) as propriedades da membrana plasmática em baixas temperaturas são alteradas e a rigidez da membrana está aumentada, dificultando a eficácia da liberação de neurotransmissores citoplasmáticos. Dessa forma, avaliamos se a liberação de DA induzida pelos anestésicos em baixa temperatura (12 °C).

Pode-se verificar pelas figuras 12 e 13 que a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos em meio de incubação a 12 °C foi significativamente reduzida. No entanto, a inibição não foi total ( $p < 0,05$ ). Diferentemente dos dados obtidos nesse estudo, Geverich e cols. (2001), observaram, em baixa temperatura (12 °C), uma inibição completa da liberação de noradrenalina evocada por veratridina em fatias de hipocampo pré-tratadas com BAPTA-AM. Mas, surpreendentemente, o efeito do halotano foi consideravelmente menos afetado (39.7% de inibição) em relação à inibição da liberação de DA induzida pelo sevoflurano (63.1%).

A potência dos agentes anestésicos pode estar diretamente relacionada com a sua lipossolubilidade, uma vez que eles podem interagir com a bicamada lipídica (hipótese

lipídica) ou com regiões hidrofóbicas das proteínas de membrana (hipótese protéica). O sevoflurano possui lipossolubilidade consideravelmente menor que o halotano (aproximadamente 3,5 vezes) e, devido a esse fator, pode ser mais sensível à diminuição de temperatura que o halotano. De qualquer forma, esses dados reforçam a idéia de que o sevoflurano e halotano podem induzir um aumento da liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos a partir do DAT.

A liberação de neurotransmissores a partir do citoplasma via reversão dos transportadores de membrana envolve um co-transporte de sódio. Assim, resolvemos pesquisar o papel do íon sódio na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelo sevoflurano em fatias de córtex cerebral de ratos. Como pode-se verificar na Figura 14, ao realizarmos o experimento com a diminuição do íon sódio no meio de incubação (40mM) a capacidade do sevoflurano de induzir um aumento da liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos foi inibida em 71,99%. Os resultados mostrados na Figura 15 evidenciam que a resposta do halotano também é dependente do íon sódio, pois pode-se verificar uma inibição de 56,2% na liberação de DA induzida pelo halotano.

Hurd e Ungersted (1989) ao estudarem a dependência do sódio na liberação de DA via DAT *in vivo* observaram que em baixas concentrações extracelulares desse íon também ocorre a alteração do gradiente de sódio e, conseqüentemente, a liberação de DA. Esse estudo também demonstrou que o efluxo de DA induzido pela baixa concentração do sódio extracelular foi drasticamente inibido pelo pré-tratamento com nomifensina. Baixas concentrações de Cl<sup>-</sup>, por um mecanismo semelhante, também induzem uma liberação de DA em fatias de striatum de coelhos. Diliberto e cols (1989) demonstraram que esse aumento de liberação de DA em baixa [Cl<sup>-</sup>] extracelular permanece inalterado

até mesmo quando as reservas de DA vesiculares são depletadas com reserpina ou quando as fatias são pré-tratadas com TTX, sugerindo que essa fração de DA liberada é via reversão do DAT, ou seja, uma DA citoplasmática.

Os resultados mostrados nas Figuras. 14 e 15 evidenciaram que ao pré-incubar as fatias em meio de incubação com baixa concentração de sódio, os anestésicos reduziram drasticamente sua capacidade em aumentar a liberação de DA, sugerindo que seu mecanismo de ação parece realmente envolver o DAT .

Para confirmar a participação do DAT na liberação de DA induzida pelos anestésicos halotano e sevoflurano, as fatias foram pré-incubadas na presença da nomifensina e do GBR 12909, inibidores desse transportador de membrana (Herdon & Nahorski, 1987; Andersen, 1989). Na presença dessas drogas observou-se uma significativa inibição na liberação de DA induzida pelo sevoflurano (Figura. 16 ) e halotano (Figura 17). A redução da liberação de DA induzida pelos anestésicos obtida com GBR12909 foi maior que a da nomifensina, principalmente com o halotano. Estudos demonstraram que o GBR 12909 é inibidor potente e seletivo do DAT, atuando por inibição competitiva (Andersen, 1989). Esses resultados sugerem, portanto, que o aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos ocorre, principalmente, a partir de uma ação direta no DAT.

Vários estudos sugerem que bloqueadores do transportador de noradrenalina (NET) aumentam os níveis de DA extracelular em algumas regiões cerebrais, principalmente no córtex frontal (Pozzi e cols., 1994). Mazei e cols. (2002) observaram que o GBR 12909 foi incapaz de aumentar o efluxo de DA em córtex pré-frontal de ratos. A partir desse dado sugeriu-se que drogas bloqueadoras seletivas do DAT, em áreas com

baixa densidade desse transportador (córtex pré- frontal), não são eficientes para produzir mudanças na concentração de DA extracelular. Além disso, Williams e cols. (2004) demonstraram que uma quantidade significativa de DA captada em córtex pré-frontal de ratos foi consideravelmente mais inibida por uma droga bloqueadora de NET (nisoxetina) quando comparado ao GBR12909, sugerindo que o NET desempenha um papel importante na concentração de DA extracelular nessa região do córtex cerebral.

Quando a nisoxetina foi acrescentada ao meio de incubação, observamos uma inibição significativa (41,86 %) na resposta do sevoflurano (Figura 18). A figura 19 mostra que a nisoxetina também inibiu significativamente a resposta do halotano (44,23%). Esses dados sugerem a participação do NET no aumento da liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida pelos anestésicos em fatias de córtex cerebral de ratos. Vale a pena ressaltar que Shahani e cols. (2002) também propuseram que as catecolaminas podem contribuir para as ações sinápticas de alguns anestésicos gerais. Esses autores observaram que o halotano inibiu significativamente o NET e o DAT humano em células transfectadas com esse transportador. Nesse estudo também foi mostrado que o NET humano foi inibido, de forma dose-dependente, pelos anestésicos gerais propofol e cetamina. Esses resultados podem parcialmente explicar porque durante a recuperação do estado anestésico observa-se hiperlocomoção e porque doses até mesmo subanestésicas de cetamina induzem aumento da atividade motora e gera alterações comportamentais diretamente relacionadas com a esquizofrenia (Becker e cols., 2003).

Além da inibição da captação de DA, o TR via DAT ou NET também representa uma via para o aumento da concentração de DA no meio extracelular. O efluxo de DA via DAT é observado na presença de anfetamina, uma liberação insensível à reserpina.

Enquanto a cocaína, nomifensina e GBR12909 exercem sua ação na transmissão dopaminérgica exclusivamente bloqueando o DAT, a anfetamina é carregada como substrato pelo DAT, e subsequentemente reverte a direção do transportador, aumentando, assim, a DA no espaço extracelular. De fato, estudos já mostraram que [<sup>3</sup>H]-anfetamina é incorporada nas fatias de córtex cerebral de ratos. No entanto, surpreendentemente, a cocaína não inibiu essa incorporação. Logo, a anfetamina pode entrar por livre difusão pela membrana plasmática sem, necessariamente, utilizar o DAT. Mas, os mecanismos intracelulares através dos quais a anfetamina reverte o DAT ainda não estão bem esclarecidos. A ativação da PKC e conseqüentemente o cálcio intracelular parecem ser importantes para a liberação de DA mediada pela anfetamina via DAT e NET (Kantor e cols., 2001; revisto por Leviel, 2001). Dados da literatura sugerem que inibidores da PKC alteram a liberação de DA induzida pela anfetamina (Kantor e cols., 2001), sugerindo que o Ca<sup>2+</sup> interno é importante para a liberação de DA evocada pela presença dessa droga. De fato, diferentemente dos nossos resultados, Kantor e cols. (2001) observaram que o BAPTA-AM (50 µM) inibiu a liberação de DA induzida pela anfetamina via NET em células PC12. Assim, pode-se sugerir que o aumento de liberação de DA induzida pelos anestésicos sevoflurano e halotano não envolve a ativação de PKC.

De qualquer forma, nossos resultados indicam o envolvimento do DAT e do NET na liberação de [<sup>3</sup>H]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos. O DAT e o NET são glicoproteínas de membrana plasmática que pertencem a uma superfamília de transportadores de membrana dependentes de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>. A ouabaína, potente e seletivo inibidor da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, pode aumentar a liberação de neurotransmissores via TR, através dos transportadores de membrana dependentes de

$\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , uma vez que o gradiente de sódio é alterado na presença dessa droga (revisto por Leviel, 2001; Milusheva e cols., 1996).

Fairbrother e cols. (1990) demonstraram que a liberação de DA induzida pela ouabaína em fatias de neostriado de ratos foi significativamente reduzida pela nomifensina e pouco alterada pela presença da TTX e reserpina, sugerindo que a ouabaína induz uma liberação de DA via TR. Dessa forma, estudamos a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos na presença dessa droga. Nas figuras 20 e 21 verifica-se que, após uma pré- incubação das fatias de córtex cerebral por 20 minutos na presença da ouabaína, a resposta do sevoflurano (63,9%) e halotano (69,2%) foi significativamente inibida. Observa-se que a ouabaína não inibiu totalmente a capacidade dos anestésicos de aumentar a liberação de DA em fatias de córtex cerebral de ratos, sugerindo que os anestésicos podem utilizar outros mecanismos para induzir liberação de DA. Uma possibilidade seria aumentar a concentração extracelular de DA através da inibição da recaptação desse neurotransmissor. No entanto, a partir desses resultados podemos propor que a ouabaína, sevoflurano e o halotano parecem liberar DA através de um mecanismo semelhante. Porém, restava a dúvida se esses anestésicos teriam como alvo de ação a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

No cérebro, pelo menos 40% da produção da energia é utilizada pela atividade da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A medida que o ATP é quebrado pela célula para o funcionamento das bombas ATPases, o fosfato inorgânico gerado é utilizado para a formação de mais ATP ou pode extravazar para o meio extracelular através da membrana plasmática (Milusheva e cols., 1996).



Para avaliarmos, de forma indireta, a participação da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na resposta dos anestésicos, mensuramos o fosfato inorgânico liberado em fatias de córtex cerebral de ratos na presença de ouabaína e/ou halotano ou sevoflurano. Os resultados obtidos nas figuras 22 e 23 mostram que nossa metodologia realmente avalia de forma indireta a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, pois verifica-se que na presença da ouabaína, ocorreu uma redução significativa na quantidade de fosfato inorgânico liberado em fatias de córtex cerebral de ratos em relação ao controle. Além disso, nossos dados evidenciaram também que os anestésicos, diferentemente da ouabaína, não diminuíram a quantidade de fosfato inorgânico liberado das fatias em relação ao controle (Figuras 22 e 23). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase também não está envolvida com a liberação de  $[\text{H}^3]$ -DA induzida por sevoflurano e halotano em fatias de córtex cerebral de ratos.

Nenhum estudo *in vitro*, relacionando anestésicos inalatórios e reversão do transportador de membrana foi encontrado na literatura. El-Maghrabi e cols. (1993) demonstraram que o halotano, mas não o isoflurano, inibiu a captação de  $[\text{H}^3]$ -DA em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos. No entanto, Shahani e cols. (2002) observaram que a captação de DA foi inibida pelo halotano e isoflurano em células LLC-PK1 transfectadas com DAT humano. Assim, estudamos o efeito do sevoflurano e halotano na captação da DA em fatias de córtex cerebral de ratos.

Nesses experimentos, as fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas na presença do sevoflurano ou halotano e, subseqüentemente, marcadas com  $[\text{H}^3]$ -DA. Nossos dados mostram que ocorreu uma diminuição de 40,3% na captação de  $[\text{H}^3]$ -DA nas fatias pré-tratadas com o sevoflurano (Tabela. 1) e 69,045 % nas fatias pré-tratadas

com o halotano (Tabela 2).

Nossos resultados sugerem que o efeito do sevoflurano e halotano nos neurônios dopaminérgicos ocorre principalmente a partir do DAT. No entanto, a preparação de fatias de córtex cerebral mantém algumas das conexões funcionais *in vivo* e é possível que os anestésicos inalatórios possam afetar indiretamente a liberação de DA através da interferência na liberação de outros neurotransmissores. Em estudos anteriores já observamos que o halotano e o isoflurano aumentam a liberação de acetilcolina. As terminações dopaminérgicas possuem receptores para GABA, glutamato, acetilcolina e serotonina (Raiteri e cols., 2000). Estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” demonstraram que a liberação de DA é estimulada pela ativação de receptores glutamatérgicos NMDA (Cheramy e cols., 1986), GABA<sub>A</sub> (Giorguieff e cols., 1978) e colinérgicos (Lehmann & Langer, 1982); entretanto observou-se inibição da liberação ao estimular receptores GABA<sub>B</sub> (Giorguieff e cols., 1978).

Além disso, em nosso protocolo experimental o meio de incubação possui pargilina, inibidor da MAO, droga essencial para a nossa metodologia, pois evita a degradação da [<sup>3</sup>H]-DA captada pelo tecido. Porém, a pargilina deve ocasionar um aumento da DA citoplasmática, o que pode contribuir para a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA independente de Ca<sup>+2</sup> induzida pelos anestésicos halotano e sevoflurano.

Concluindo, este estudo indica que o sevoflurano e o halotano aumentam a liberação de [<sup>3</sup>H]-DA em fatias de córtex cerebral de ratos. Além disso, nossos resultados sugerem que esse efeito ocorre principalmente a partir do DAT. Entretanto, futuras investigações são necessárias para uma melhor compreensão do efeito dos anestésicos inalatórios na neurotransmissão dopaminérgica no SNC e para se identificar os possíveis

alvos através dos quais esses agentes anestésicos podem levar a uma reversão de transportadores de membrana, principalmente o DAT.

## **6. Referências Bibliográficas**

- ADACHI, Y. U.; YOSHIHIKO A.; HIGUCHI, H.; SATOH, T. & ZSILLA, G. 2003.  
Halothane attenuated and enhanced clozapine-induced dopamine release in rat striatum  
*Neurochemistry International*. **43**; 113-119.
- ADACHI, Y. U.; WATANABE K.; HIGUCHI, H.; SATOH, T. & VIZI E. I., G. 2001  
Halothane potentiates the effect of methamphetamine and nomifensine on extracellular  
dopamine level in rat striatum. *British Journal of Anesthesia*. 86 (6): 837-45.
- ADACHI, Y. U.; YOSHIHIKO A. & SATOH, T.. 2000.  
Halothane anesthesia decreases the extracellular level of dopamine in rat striatum: a  
microdialysis study in vivo. *journal of anesthesia*. 14; 82-90.
- ADAM-VIZI, V. 1992. External Ca<sup>2+</sup>-Independent release of neurotransmitters. *J. Neurochem.*, 58(2): 395-405.
- ADLER, E. M.; AUGUSTINE, G .J.; DUFFY, S. N.; & CHARLTON, M. P. 1991. Alien  
intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant  
synapse. *J. Neurosci.*11:1496-1507.
- AMARA, S. G. & KUHAR, M. J. 1993a. Neurotransmitter transporters: recent progress.  
*Annu. Rev. Neurosci.*,16: 73-93.
- AMARA, S. G. & ARRIZA, J. L. 1993b. Neurotransmitter transporters: three distinct  
gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 3: 337-344.
- AMARA, S. G. 1996. Neurotransmitter transporters: new insights into structure, function  
and pharmacology. *Rev. Bras. Biol.*, 56: Su 1 Pt 1, 5-19.
- ANDERSEN, P. H. 1989. The dopamine inhibitor GBR 12909: selectivity and molecular  
mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*,166: 493-504.

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

ANTOIGNINI, J. F.; WANG, X. W & CARSTENS, E. 2000. Isoflurane action in the spinal cord blunts electroencephalographic and thalamic-reticular formation responses to noxious stimulation in goats. *Anesthesiology*, 92: 559-566

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

BECKER A, PETERS B, SCHROEDER H, MANN T, HUETHER G, GRECKSCH G 2003. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 687-700.

BONANNO G, SALA R, CANCEDDA L, CAVAZZANI P, COSSU M, RAITERI M 2000. Release of dopamine from human neocortex nerve terminals evoked by different stimuli involving extra- and intraterminal calcium. *British Journal of Pharmacology* 129: 1780-1786.

BRADFORD MM .1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

BRUNO AN, BONAN CD, WOFCHUK ST, SARKIS JJF, BATTASTINI AMO .2002. ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Sciences* 71: 215-225.

CAMPAGNA, J.A.; MILLER, K.W. & FORMAN, S.A. 2003 Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N. Engl. J. Med*, 348: 2110-2124.

CARLSSON, A. & WALDECK, B. 1958. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand.*, 44: 293-298.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. & WALDECK, B. 1958. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Scien*, 127: 471.

CHAN KM, DELFERT D, JUNGER KD 1986 A Direct Colorimetric Assay for Ca-2+-Stimulated Atpase Activity. *Analytical Biochemistry* 157: 375-380.

CHEN, N. & REITH M,E. 2000. Structure and function of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol.* 405:329-339.

CHERAMY, A.; BARBEITO, L.; ROMO, R.; GODEHEU, G. & GLOWINSKI, J. 1986. Involvement of cortico-striatal "glutamatergic" neurons in the presynaptic control of dopamine release in the cat caudate nucleus. *Clin Neuropharmacol.* 9: 500-502.

CLARK, D. L.; ROSNER, B. S. Neurophysiologic effects of general anesthetics. I. The electroencephalogram and sensory evoked responses in man. *Anesthesiology*, v. 38, p. 564-582, 1973.

COLLINS, J. G.; KENDIG, J. J.& MASON, P. 1995. Anesthetic actions within the spinal cord: contributions to the state of general anesthesia. *Trends Neurosci.*, 18:549-553.

DANIELL, L C.; HARRIS, R. A. Neuronal intracellular calcium concentrations are altered by anesthetics: relationship to membrane fluidization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 245, p. 1-7, 1988.

DAHLSTROM, A. & FUXE, K. 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20: 398-399.

DILIBERTO PA, JEFFS RA, CUBEDDU LX .1989. Effects of Low Extracellular Chloride on Dopamine Release and the Dopamine Transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 248: 644-653.

DRAPEAU P, BLAUSTEIN MP .1983. initial release of [h-3]dopamine from rat striatal synaptosomes - correlation with calcium entry. *Journal of Neuroscience* 3: 703-713.

DWOSKIN, L. P. & ZAHNISER, N. R 1986. Robust modulation of [3H]dopamine release from rat striatal slices by D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 239:442-453

DUNLAP, K.; LUEBKE, J. I.; TURNER, T. J. Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. 1995.*Trends Neurosci.*, 18: 89-98.

DUFFY, C. M.& ATTA, B. F. 2000 Sevoflurane and anesthesia for neurosurgery: a review. *J. Neurosurg. Anesthesiol.*, 12: 128-140.

EDELMAN, G. .M. Naturalizing consciousness: A theoretical framework. *PNAS.*, v. 100, p. 5520-5524, 2003.

ELMAGHRABI EA, ECKENHOFF RG .1993. Inhibition of Dopamine Transport in Rat-Brain Synaptosomes by Volatile Anesthetics. *Anesthesiology* 78: 750-756.

ENGBERG, G.; ELVERFORS, A.; JONASON, J. & NISSBRANDT, H. 1997. Inhibition of dopamine re-uptake: significance for nigral dopamine neuron activity. *Synapse*, 25: 215-226.

EGER, E. I.; KOBLIN, D. D.; HARRIS, R. A.; KENDIG, J. .J.; POHORILLE, A.; HALSEY, M. J. & TRUDELL, J. R. 1997 Hypothesis: inhaled anesthetics produce immobility and amnesia by different mechanisms at different sites. *Anesth. Analg.*, 84: 915-918..



ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E. & HOFFMAN, B. J. 1992. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 10993-10997.

FAIRBROTHER IS, ARBUTHNOTT GW, KELLY JS, BUTCHER SP (1990) *In vivo* Mechanisms Underlying Dopamine Release from Rat Nigrostriatal Terminals .1. Studies Using Veratrine and Ouabain. *Journal of Neurochemistry* 54: 1834-1843.

FALKENBURGER BH, BARSTOW KL, MINTZ IM .2001. Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293: 2465-2470.

FALLON, J. H. & MOORE, R. Y. 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol*, 180: 545-580.

FALLON, J. H.; KOZIELL, D. A. & MOORE, R. Y. 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J. Comp Neurol*, 180: 509-532.

FERNANDES, V. M.; MASSENSINI, A. R.; PRADO, M. A.; SILVA, M. A.; MORAES-SANTOS, T. & GOMEZ, M. V. 2004. Effects of alpha-scorpion toxin, tityustoxin on the release of [3H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. *Neurochem. Int.* 44: 91-97.

FELDMAN, S. M.; WALLER, H. J. Dissociation of electrocortical activation and behavioural arousal. *Nature*, v. 196, p. 1320-1322, 1962.

FRANKS, N.P. & LIEB, W.R. 1978. Where do general anaesthetics act?. *Nature*, 274: 339-342.

FRANKS, N. P.& LIEB, W. R. 1981. Is membrane expansion relevant to anaesthesia?. *Nature*, 292: 248-251.

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

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

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

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

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

GIORGUIEFF, M.F., KEMEL, M. L., GLOWINSKI, J. & BESSON, M. J. 1978. Stimulation of dopamine release by GABA in rat striatal slices. *Brain Res*. 139: 115-130

GIROS, B. & CARON, M. G. 1993. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14: 43-49.

GOLDSTEIN, M. & DEUTCH, A. Y. 1992. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB J.*, 6: 2413-2421.

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

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

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

HEINKE, W. & SCHWARZBAUER, C. 2001. Subanesthetic isoflurane affects task-induced brain activation in a highly specific manner: a functional magnetic resonance imaging study. *Anesthesiology*, 94 : 973-981.

HURD YL, UNGERSTEDT U .1989. Influence of A Carrier Transport Process on Invivo Release and Metabolism of Dopamine - Dependence on Extracellular Na<sup>+</sup>. *Life Sciences* 45: 283-293.

REITH, M.E., XU, C. & CHEN, N.H. 1997. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter *Eur J Pharmacol.* 324:1-10

HEMMINGS, H.C. JR, AKABAS, M.H., GOLDSTEIN, P.A., TRUDELL, J.R., ORSER, B.A. & HARRISON, N.L. 2005. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci.* 26:503-10.

HENRY, J. P.; SAGNE, C.; BEDET, C. & GASNIER, B. 1998a. The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem. Int.*, 32: 227-246.

HENRY, J. P.; SAGNE, C.; BOTTON, D.; ISAMBERT, M. F. & GASNIER, B. 1998b. Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter. *Adv. Pharmacol.*, 42; 236-239.

HERDON, H., STRUPISH, J. & NAHORSKI, S. R. 1987. Endogenous dopamine release from rat striatal slices and its regulation by D-2 autoreceptors: effects of uptake inhibitors and synthesis inhibition. *Eur. J. Pharmacol.*, 138: 69-76.

HERTTING, G. & AXELROD, J. 1961. Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve-endings. *Nature*. 192:172-173.

HOFFMAN, A. F. & GERHARDT, G. A. 1999. Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: an in vivo electrochemical study. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 455-463.

HOKFELT, T.; JOHANSSON, O.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. & PARK, D. 1976. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mesand diencephalon. *Med. Biol.*, 54: 427-453.

HOWELL, M.; SHIRVAN, A.; STERN-BACH, Y.; STEINER-MORDOCH, S., STRASSER, J. E.; DEAN, G. E. & SCHULDINER, S. 1994. Cloning and functional expression of a tetrabenazine sensitive vesicular monoamine transporter from bovine chromaffin granules. *FEBS Lett.*, 338: 16-22.

HURD YL, UNGERSTEDT U. 1989. Influence of A Carrier Transport Process on Invivo Release and Metabolism of Dopamine - Dependence on Extracellular Na<sup>+</sup>. *Life Sciences* 45: 283-293.

INAZU, M.; KUBOTA, N.; TAKEDA, H.; ZHANG, J.; KIUCHI, Y.; OGUCHI, K. & MATSUMIYA, T. 1999. Pharmacological characterization of dopamine transport in cultured rat astrocytes. *Life Sci.*, 64: 2239-2245.

IRIFUNE M, FUKUDA T, NOMOTO M, SATO T, KAMATA Y, NISHIKAWA T, MIETANI W, YOKOYAMA K, SUGIYAMA K, KAWAHARA M .1997. Effects of

ketamine on dopamine metabolism during anesthesia in discrete brain regions in mice: comparison with the effects during the recovery and subanesthetic phases. *Brain Research* 763: 281-284.

IRIFUNE M, SATO T, NISHIKAWA T, MASUYAMA T, NOMOTO M, FUKUDA T, KAWAHARA M .1997. Hyperlocomotion during recovery from isoflurane anesthesia is associated with increased dopamine turnover in the nucleus accumbens and striatum in mice. *Anesthesiology* 86: 464-475.

HALL, A. C.; LIEB, W. R.; FRANKS, N. P. 1994. Insensitivity of P-type calcium channels to inhalational and intravenous general anesthetics. *Anesthesiology*, 81:117-123.

JABER M.; ROBINSON S.W.; MISSALE, C. & CARON, M.G. 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35:1503-1519.

JACKSON, D. M. & WESTLIND-DANIELSSON, A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.*, 64: 291-370.

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

JOHN, E R. 2001. A field theory of Consciousness. *Consciousness and cognition*, 10: 184-213.

KANNER, B. I. & SCHULDINER, S. 1987. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit Rev. Biochem.*, 22: 1-38.

KANTOR, L.; HEWLETT, G. H.; PARK, Y. H.; RICHARDSON-BURNS, S. M.; MELLON, M. J. & GNEGY, M. E. 2001. Protein kinase C and intracellular calcium are

required for amphetamine-mediated dopamine release via the norepinephrine transporter in undifferentiated PC12 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 297: 1016-1024.

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

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

KHOSHBOUEI, H., WANG, H., LECHLEITER, J.D., JAVITCH, J.A. & GALLI, A. 2003. Amphetamine-induced dopamine efflux. A voltage-sensitive and intracellular Na<sup>+</sup>-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 278:12070-12077.

KRUEGER, B. K. 1990. Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J. Neurochem.*, 55: 260-267.

LANG, A. E. & LOZANO, A. M. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 339: 1044-1053.

LEHMANN, J. & LANGER, S. Z. 1982. Muscarinic receptors on dopamine terminals in the cat caudate nucleus: neuromodulation of [<sup>3</sup>H]dopamine release in vitro by endogenous acetylcholine. *Brain Res*. 248:61-69.

LEVIEL, V. 2001. The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem. Int.*, 38: 83-106.

LEVITT, M., SPECTOR, S., SJOERDSMA, A. & UDENFRIEND, S. 1965. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 148:1-8.

MAZEI MS, PLUTO CP, KIRKBRIDE B, PEHEK EA. 2002. Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Research* 936: 58-67.

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

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

MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; JABER, M. & CARON, M. G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.*, 78: 189-225.

MILUSHEVA EA, DODA M, BARANYI M, VIZI ES 1996 Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and  $[Ca^{2+}]_i$ -dependent and independent release of  $[H-3]$  dopamine in rat striatal slices. *Neurochemistry International* 28: 501-507.

MIYANO K, TANIFUJI Y, EGER EI 1993 The Effect of Halothane Dose on Striatal Dopamine - An In vivo Microdialysis Study. *Brain Research* 605: 342-344.

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

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

MORÓN J. A., ALICIA BROCKINGTON, ROY A. WISE, BEATRIZ A. ROCHA, AND BRUCE T. HOPE. 2002. Dopamine uptake through the norepinephrine transporter

in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *The Journal of Neuroscience*. 22(2):389-395.

NAGATSU, T., LEVITT, M. & UDENFRIEND, S. 1964. TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS. *J Biol Chem*. 239:2910-2917.

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

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

PATEL, S. S. & GOA, K. L. 1996. Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia. *Drugs*. 51: 658-700.

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

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

POZZI L, INVERNIZZI R, CERVO L, VALLEBUONA F, SAMANIN R 1994. Evidence That Extracellular Concentrations of Dopamine Are Regulated by Noradrenergic Neurons in the Frontal-Cortex of Rats. *Journal of Neurochemistry* 63: 195-200.



RAITERI, M.; CERRITO, F.; CERVONI, A. M. & LEVI, G. 1979. Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208: 195-202.

RAITERI, M. 2000. Release of dopamine from human neocortex nerve terminals evoked by different stimuli involving extra- and intraterminal calcium. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 1780-1786.

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

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

RUTLEDGE, C. O.; SEIFEN, E.; ALPER, M. H.; FLACKE, W. 1963 Analysis of halothane in gas and blood by gas chromatography. *Anesthesiology*, 24: 862-867.

SCHULDINER, S.; GABIZON, R.; STERN, Y. & SUCHI, R. 1987. The amine transporter from bovine chromaffin granules: photolabeling and partial purification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 493: 189-193.

SARAIVA, R. A. Action mechanism of inhalational anesthetics. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 52: 114-123, 2002.

SEBEL, P. S.; LANG, E.; RAMPIL, I. J.; WHITE, P. F.; CORK, R.; JOPLING, M.; SMITH, N. T.; GLASS, P. S.; MANBERG, P. , 1997. A multicenter study of bispectral electroencephalogram analysis for monitoring anesthetic effect. *Anesth. Analg.* 84: 891-899

SEGAL IS, WALTON JK, IRWIN I, DELANNEY LE, RICAURTE GA, LANGSTON JW, MAZE M. 1990. Modulating Role of Dopamine on Anesthetic Requirements. *European Journal of Pharmacology* 186: 9-15.

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

STAHL L, COLLIN AK, UNGERSTEDT U. 1990. Effects of Halothane Anesthesia on Extracellular Levels of Dopamine, Dihydroxyphenylacetic Acid, Homovanillic-Acid and 5-Hydroxyindolacetic Acid in Rat Striatum - A Microdialysis Study. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 342: 136-140.

SILVA J.H; GOMEZ R.; PINHEIRO A. C.; GOMEZ M. V. & GUATIMOSIN C. 2005. Acetylcholine induced by the volatile anesthetic sevoflurane in rat brain cortical slices. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 25: 807-818.

SUDHOF, T.C. 2004 The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.*;27:509-547

THORPE, L. W.; WESTLUND, K. N.; KOCHERSPERGER, L. M.; ABELL, C. W. & DENNEY, R. M. 1987. Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 23-32.

TORRES, G.E., GAINETDINOV, R.R & CARON, M.G. 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*. 4(1):13-25.

TONER, C.C.; CONNELLY R. & STAMFORD J. A. 2001. effects of sevoflurane on dopamine, glutamate and aspartate release in an in vitro model. *British journal of anaesthesia*, 86: 550-4.

TORT ABL, SOUZA DO, LARA DR. 2006. Theoretical insights into the mechanism of action of atypical antipsychotics. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 30: 541-548.

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

UNDIE AS, FRIEDMAN E .1990. Stimulation of A Dopamine-D1 Receptor Enhances Inositol Phosphates Formation in Rat-Brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 253: 987-992.

VALLONE, D.; PICETTI, R. & BORRELLI, E. 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24: 125-132.

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

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. 1995. Volatile anesthetics inhibit voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 268:L187-L191

WEINBERGER, D. R.; BERMAN, K. F. & ILLOWSKY, B. P. 1988. Physiological dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. III. A new cohort and evidence for a monoaminergic mechanism. *Arch. Gen. Psychiatry*, 45: 609-615.

WESTPHALEN, R. I.; HEMMINGS, H. C. 2002. Selective depression by general anesthetics of glutamate versus Gaba release from isolated cortical nerve terminal. *The Journal Pharm. and Exp. Therapeutics*, 304: 1188-1196.

WILCOX, K. M.; PAUL, I. A. & WOOLVERTON, W. L. 1999. Comparison between dopamine transporter affinity and self-administration potency of local anesthetics in rhesus monkeys. *Eur. J. Pharmacol.*, 367: 175-181.

WILLIAMS JA, STEKETEE JD. 2004. Characterization of dopamine transport in crude synaptosomes prepared from rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 137: 161-165.

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

ZHOU, Q.Y., GRANDY, D.K., THAMBI, L., KUSHNER, J.A., VAN TOL, H.H, CONE, R., PRIBNOW, D., SALON, J., BUNZOW, J.R. & CIVELLI, O. 1990. Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*. 347:76-80.