

Monalise Costa Batista Berbert

**Efeitos do anestésico S+ cetamina em sinaptosomas de
córtex cerebral de ratos**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
Instituto de Ciências Biológicas / Escola de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Monalise Costa Batista Berbert

**Efeitos do anestésico S+ cetamina em sinaptosomas de
córtex cerebral de ratos**

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

Orientadora: Dr^a Cristina Guatimosim Fonseca
Co-orientador: Dr. Renato Santiago Gomez

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
Instituto de Ciências Biológicas / Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte 2009**

Apoio Institucional

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

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

Portanto, quer comais, quer bebais ou façais outra coisa qualquer,
fazei tudo para a glória de Deus.
ICo 10:31

Parte dos resultados desta dissertação foi apresentada no seguinte encontro:

XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular

Pôster: The presynaptic effects of the general anesthetic Ketamine on synaptic vesicles exocytosis.

Batista MC, Gomez RS, Gomez MV, Guatimosim CF

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e o extremo cuidado comigo. A Ele seja dada toda honra e glória por este trabalho. Ele é um instrumento para demonstrar como é perfeita é toda criação.

Ao Jeiverson, meu esposo, amor da minha vida, pela compreensão e pelo apoio. Por fazer sentir-me “a cientista”. Por me buscar no laboratório tão tarde, por entender minha ausência quando estava estudando. Por acolher meu estresse dizendo que valeria a pena e me dizer que eu era capaz. Te amo, Momo!!

Aos meus pais, João e Armanda, pelo apoio incondicional, por ser meu porto seguro. Tenho muito orgulho de carregar meus sobrenomes Costa e Batista, sinto neles uma parte de vocês em mim. Quero trazer-lhes orgulho e demonstrar os princípios que recebi.

Aos meus irmãos Filipe e André por, mesmo distante, me apoiarem com atenção.

A minha orientadora Cristina Guatimosim, por me receber como aluna, por me incentivar a buscar o conhecimento. Por estar sempre por perto, orientando atentamente, por não medir esforços para que eu continuasse.

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

Ao prof. Marcus Vinícius Gomez por ser como um avô científico. Foi ele meu primeiro orientador e passou a ser alvo da minha admiração pelo comprometimento, seriedade e lucidez. Muito obrigada!

Aos professores Luiz Armando e Marco Aurélio pela acolhida no laboratório de neurociências para que eu pudesse concluir os dados.

A Ana Cristina por ser uma amiga e irmã científica. Os seus passos foram os primeiros que segui no laboratório. Você sempre me apoiou e me ensinou que a gente continua “gente” quanto é cientista.

Aos amigos de laboratório, Ernane, Bento, Grazi, Luara, Luciana, Maíla, Michele, Hermann, Fabiana, Vinícius, Bruno Resende, Cristina, Magda, Cristiane, Patrícia, Daniela Valadão, Alessandra, Nancy, Bruno Leles, Paulo, Eloah, Allan, Bernardo, Janice, Jarbas, Bruno Pinheiro, Iaci, Luciene, Ricardo e Eder. Eu nem tenho belas palavras, com certeza tenho um pouco de vocês em mim. À Jomara companheira de experimentos. Muito obrigada Jo, pelo seu carinho, por dividir ansiedades, conquistas. Crescemos juntas!

Aos amigos da ABU por me acolherem durante o mestrado. Foi divinamente providencial o apoio e o carinho de todos.

Aos amigos da Moradia universitária por me ajudarem tanto! Por transformarem momentos de apreensão em doces demonstrações de verdadeiras amizades. Ao Silas por

me fazer acreditar todos os dias que era possível conseguir. À amiga Fabíola pela fiel amizade, pelo companheirismo, pelo apoio, pelas orações, por me fazer acreditar não em mim, mas num Deus que capacita.

Ao meu amigo Anderson que também merece o título de mestre. Por acompanhar experimentos, por me ajudar em TUDO. Pela amizade leal e sincera.

À Paola pelo carinho e pelas orações que sustentaram meus experimentos. Às amigas Janine, Sue Helen, Simone por me agüentarem. Obrigada amigas!

A Dri, minha acessora de assuntos “informáticos”. Obrigada amiga!

À Wolfanga, pelo carisma e por me inspirar.

Aos meus familiares pelas orações, pelo carinho, por fazerem me sentir tão importante na família.

Aos funcionários: Carlos, Sônia, Darcy e Adriane. Vocês facilitaram meu caminho.

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

Sumário

Lista de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
1 Introdução	1
1.1 Aspectos básicos da neurotransmissão	1
1.2 Transmissão glutamatérgica	4
1.3 Íons sódio	6
1.4 Íons cálcio.....	8
1.5 Cetamina	9
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 Material e Método	14
3.1 Equipamentos	14
3.2 Soluções	14
3.3 Drogas e Reagentes:.....	15
3.4 Animais	15
3.5 Modelo experimental – Sinaptosomas.....	15
3.5.1 Preparação do sinaptosoma.....	16
3.6 Estímulos despolarizantes:.....	17
3.6.1 Veratridina	17
3.6.2 KCl.....	17
3.7 Exocitose	18
3.7.1 Uso de FM2-10 para o estudo da exocitose de vesículas sinápticas	18
3.7.2 Ensaio para exocitose de vesículas sinápticas	19
3.8 Liberação de glutamato	20
3.8.1 Método espectrofluorimétrico para dosagem da liberação contínua de glutamato.....	20
3.8.2 Ensaio para a liberação de glutamato	21
3.9 Ca ²⁺ interno sinaptosomal	21
3.9.1 Uso do FURA-AM para o estudo da concentração de cálcio intrasinaptosomal.....	21

3.9.2 Medida do Ca ²⁺ interno sinaptosomal	22
3.10 Na ⁺ interno sinaptosomal	22
3.10.1 Uso do SBFI-AM para o estudo dos níveis de Na ⁺ interno sinaptosomal	23
3.10.2 Ensaio para mensuração do Na ⁺ interno sinaptosomal	23
3.11 Análise estatística dos resultados	24
4 Resultados	25
4.1 Efeito da cetamina no Na ⁺ intrasinaptosomal	25
4.2 Efeito da cetamina na [Ca ²⁺] _i	29
4.3 Efeito da cetamina na [Ca ²⁺] _i evocada por KCl 30mM	31
4.4 Efeito da cetamina na [Ca ²⁺] _i evocada por veratridina 10 μM	33
4.5 Efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas	35
4.6 Efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas evocadas por KCl	37
4.7 Efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas evocadas por veratridina 10 μM	39
4.8 Efeito da cetamina na liberação de glutamato	41
4.9 Efeito da cetamina na liberação de glutamato evocada por KCl 30 mM e veratridina 10 μM	43
5 Discussão	46
6 Conclusão	52
7 Referências Bibliográficas	53

Lista de Figuras

Figura 01 - O ciclo de vesículas sinápticas.....	4
Figura 02 - Representação esquemática de um único canal para sódio.....	7
Figura 03 - Representação esquemática de canal para cálcio.....	10
Figura 04 - Estrutura química da molécula FM2-10.....	20
Figura 05 - Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas por FM2-10.....	22
Figura 06 - Efeito da cetamina sobre o sódio interno sinaptosomal.....	29
Figura 07 - Efeito da cetamina na concentração do Na ⁺ interno na presença de VR10 µM.....	30
Figura 08 - Cetamina não interfere na concentração de Ca ²⁺ intrasinaptosomal.....	32
Figura 09 - Efeito da cetamina no aumento do Ca ²⁺ intrasinaptosomal evocado por KCl 30 mM.....	34
Figura 10 - Efeito da cetamina no aumento de Ca ²⁺ intrasinaptosomal evocado por VR 10 µM.....	36
Figura 11 - Cetamina não evoca a exocitose de vesículas sinápticas.....	38
Figura 12 - Cetamina não inibe exocitose evocada por KCl 30 mM.....	40
Figura 13 - Cetamina 500 µM inibe a exocitose de vesículas sinápticas evocadas por VR10 µM.....	42
Figura 14 - Cetamina não produz alteração na liberação basal de glutamato.....	44
Figura 15 - Cetamina não inibe a liberação de glutamato evocada por KCl 30 mM.....	47
Figura 16 - Cetamina 500 µM inibe a liberação de glutamato evocada por VR 10 µM.....	48

Lista de Abreviaturas

DMSO	Dimetil sulfóxido
min	Minuto
mL	Mililitro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EGTA	Etilenoglicol-bis- β -aminoetil éster
seg	Segundo
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
SNC	Sistema Nervoso Central
Ca ²⁺	Íons cálcio
Na ⁺	Íons sódio
K ⁺	Íons potássio
VR	veratridina
EPM	Erro padrão médio
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNF	Proteína de fusão sensível à N-etil-maleimida
α -SNAP	Proteína associada ao sinaptosoma
TTX	Tetrodotoxina
NMDA	N-metil-D-aspartato
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intrasinaptosomal livre
[Na ⁺] _i	Concentração de sódio intrasinaptosomal livre
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole-propionato
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
CCSV	Canais para cálcio sensíveis a voltagem
DTT	Dithioeritrol
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
GDH	Enzima glutamato desidrogenase
GRAM	Gramicidina
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazina-N' -[2-ácido etano sulfônico])
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% da ação máxima efetiva de uma determinada droga

Resumo

Os anestésicos gerais modulam a transmissão sináptica no sistema nervoso central. Esta modulação pode ocorrer no terminal pré-sináptico pela alteração na liberação do neurotransmissor e também no terminal pós-sináptico pela modulação da resposta aos neurotransmissores. Muitos estudos dos efeitos sinápticos do anestésico têm focado o sítio pós-sináptico de ação dos mesmos. Desta forma os efeitos pré-sinápticos da Cetamina ainda não foram bem caracterizados. Nosso objetivo neste trabalho foi, então, investigar a existência de efeito pré-sináptico do anestésico venoso cetamina em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos. Utilizando método de fluorescência nós testamos doses sub-anestésica ($1\mu\text{M}$), anestésica ($30\mu\text{M}$) e supra-anestésica ($500\mu\text{M}$) de cetamina nos níveis de sódio interno sinaptosomal, cálcio livre interno sinaptosomal, exocitose de vesículas sinápticas e liberação de glutamato. Este estudo demonstra que o anestésico venoso cetamina apresenta efeitos pré-sinápticos mediante estímulo despolarizante dependente de canais para sódio – veratridina $10\mu\text{M}$. Os efeitos ocorreram com o uso de concentração supra-anestésica de $500\mu\text{M}$. Demonstrou-se nessas condições: inibição do aumento dos níveis de sódio interno sinaptosomal, inibição do aumento da concentração de cálcio interno sinaptosomal, inibição da exocitose de vesículas sinápticas, e inibição da liberação de glutamato. Não foram observados efeitos em concentrações anestésicas e sub-anestésicas, ou mediante estímulo induzido por KCl. Estes dados em conjunto mostram que cetamina $500\mu\text{M}$ em sinaptosomas de córtex de ratos interfere no estímulo evocado por veratridina e compromete o funcionamento dos eventos que levam a liberação de glutamato.

Abstract

General anesthetics have potent effects on synaptic transmission, both on presynaptic synaptic terminals, by altering neurotransmitter release, and on postsynaptic neurons, by modulating their responses to neurotransmitters. Most studies of synaptics effects of general anesthetics have focused on postsynaptics sites of action. However, the presynaptics effects of ketamine have not been well characterized. We provide evidences for presynaptic effects of intravenous anesthetic ketamine in rat cerebral synaptosomes (isolated presynaptic nerve terminal). We tested low concentration (1 μ M), clinically relevant concentrations (30 μ M) and supra-anesthetic concentration (500 μ M) in order to verify the intrasynaptosomal sodium and calcium concentrations, synaptic vesicles exocytosis and glutamate release by fluorescent methods. The highest concentration of ketamine (500 μ M) inhibited the veratridine stimulus whereas other two concentrations tested did not show any effect. The anesthetic inhibited all of events induced by veratridine 10 μ M: the sodium and calcium intrasynaptosomal increase, the evoked vesicle synaptic exocytosis and the glutamate release. KCl stimulus was unaffected by ketamine. These results indicate that ketamine 500 μ M acts in sodium channels and affects the steps that culminate with the neurotransmitter release.

1 Introdução

Os anestésicos são utilizados na anestesia geral com o objetivo de se obter analgesia, amnésia, inconsciência, inibição dos reflexos sensoriais e autonômicos e imobilidade. O anestésico geral ideal é aquele que induz uma perda rápida e uniforme da consciência, permitindo, ao mesmo tempo, a rápida recuperação da função cognitiva após a interrupção da sua administração. O fármaco deve também ter uma ampla margem de segurança e ser desprovido de efeitos secundários (Caton e Antognini, 2002).

Os anestésicos gerais modulam a transmissão sináptica no sistema nervoso central. Esta modulação pode ocorrer no terminal pré-sináptico através da alteração na liberação de neurotransmissores e, também, no terminal pós-sináptico através da modulação da resposta aos neurotransmissores. Entretanto, os mecanismos dos efeitos sinápticos celulares e moleculares dos anestésicos gerais continuam em fase de elucidação (Hemmings e cols., 2005a; Richards, 1995).

1.1 Aspectos básicos da neurotransmissão

Desde as primeiras descobertas de Ramón y Cajál (1852-1934), sabe-se que o cérebro não é uma rede contínua e que cada neurônio funciona como um elemento individual o qual se comunica com outros neurônios através de zonas especializadas do terminal sináptico denominadas por Sherrington, em 1947, de sinapses. A maioria dos neurônios no SNC forma centenas de terminações nervosas as quais são comumente separadas dos corpos celulares neuronais e que funcionam como máquinas secretórias capazes de realizar repetidos ciclos de liberação de neurotransmissores.

Sinapse química é uma junção célula-célula altamente especializada propiciando uma comunicação eficiente entre células nervosas e suas células-alvo, que podem ser outro neurônio, uma célula muscular ou uma célula glandular (Gundelfinger e cols., 2003). Apesar da existência de dois tipos de sinapses, a química e a elétrica, as sinapses químicas estão presentes em maior número do que as elétricas, sendo as primeiras a principal forma de comunicação entre neurônios no SNC (Eccles, 1976). Através das sinapses químicas, a exocitose de uma única vesícula sináptica pode desencadear a abertura de milhares de canais iônicos pós-sinápticos. Esta propriedade de amplificação do sinal pré-sináptico nas sinapses químicas e, a capacidade de resposta diferenciada às

alterações na frequência e intensidade de uso das mesmas caracterizam a plasticidade sináptica (Jessell e Kandel, 1993).

De uma maneira geral, a transmissão sináptica envolve a fusão de vesículas, contendo neurotransmissores, com a membrana plasmática e a ligação destes com os receptores pós-sinápticos. Os neurotransmissores clássicos são sintetizados na própria terminação axonal, são armazenados no interior de vesículas e liberados na fenda sináptica, próximo aos seus receptores, através de áreas especializadas do terminal, as zonas ativas. É a passagem de um potencial de ação, desencadeando a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem e o influxo desse íon para o citoplasma do terminal axonal, que promove o disparo da liberação de neurotransmissores (Katz e Miledi, 1969; revisado por Murthy e De Camilli, 2003).

Os terminais nervosos estão preparados para repetidos ciclos de liberação de neurotransmissores. Quando a vesícula sináptica se funde com a membrana do terminal pré-sináptico, os constituintes da vesícula são reciclados para garantir a liberação de neurotransmissores sempre que necessária e, conseqüentemente, impedir a interrupção desse processo (Heuser e Reese, 1973, Ceccarelli e cols., 1973). As vesículas sinápticas seguem uma rota de tráfego cíclica no terminal nervoso a qual pode ser dividida em passos seqüenciais (Sudhof, 2004; Ryan, 2006). Primeiro, os neurotransmissores são ativamente transportados para dentro das vesículas sinápticas que, em seguida, migram para a zona ativa e, após essa etapa, passam por um estágio conhecido como amadurecimento ou *priming* quando se tornam competentes para formar um poro de fusão em resposta ao Ca^{2+} intracelular. Após a abertura do poro de fusão, as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclam através de três mecanismos prováveis: (a) endocitose mediada por capa de clatrina (Heuse e Reese, 1973; Richards e cols., 2000); (b) endocitose por meio de amplas invaginações de membrana e formação de cisternas (Takei e cols., 1996; Richards e cols., 2000; Richards e cols., 2003); (c) endocitose designada como *Kiss and Run* na qual as vesículas liberam seu conteúdo sem se integrarem completamente à membrana pré-sináptica, sendo reacidificadas e novamente preenchidas por neurotransmissores (Ceccarelli e cols., 1973; Pyle e cols., 2000; Gandhi e Stevens, 2003) (Figura 1).

A maquinaria exo-endocítica dos terminais nervosos é mantida devido à existência de uma gama de proteínas com características e funções distintas, estrategicamente localizadas em regiões específicas dos terminais nervosos e cujo papel, de várias delas,

já está elucidado (Takamori e cols., 2006). A ancoragem das vesículas é mediada por pequenas GTPases que são membros da família Rab, as quais agem em conjunto com várias proteínas efetoras Rab ou com fatores de ancoragem (Zerial e McBride, 2001). Isso é seguido pelo alinhamento específico de três proteínas conhecidas como SNAREs: sinaptobrevina/VAMP, SNAP-25 e syntaxina as quais estão ancoradas nas membranas da vesícula sináptica e do terminal nervoso (SNAP-25 e syntaxina) (Söllner e cols., 1993). O entrelaçamento das proteínas do complexo SNARE promoverá a fusão das membranas da vesícula e da membrana plasmática em resposta ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (Weber e cols., 1998, Jahn e Sudhof, 1999; Slepnev e De Camilli, 2000). A montagem do complexo SNARE-trans é regulada pelas proteínas Munc-18/Sec 1 (revisado por Jahn e cols., 2003) e a desmontagem é regulada pela NSF e pela α -SNAP (Söllner e cols.,1993). A proteína ligante de Ca^{2+} e fosfolípidos, sinaptotagmina, é considerada como sendo o sensor de Ca^{2+} no processo de fusão das vesículas disparado por este íon (Perin e cols., 1991; Chapman e Davis, 1998; revisado por Chapman, 2008).

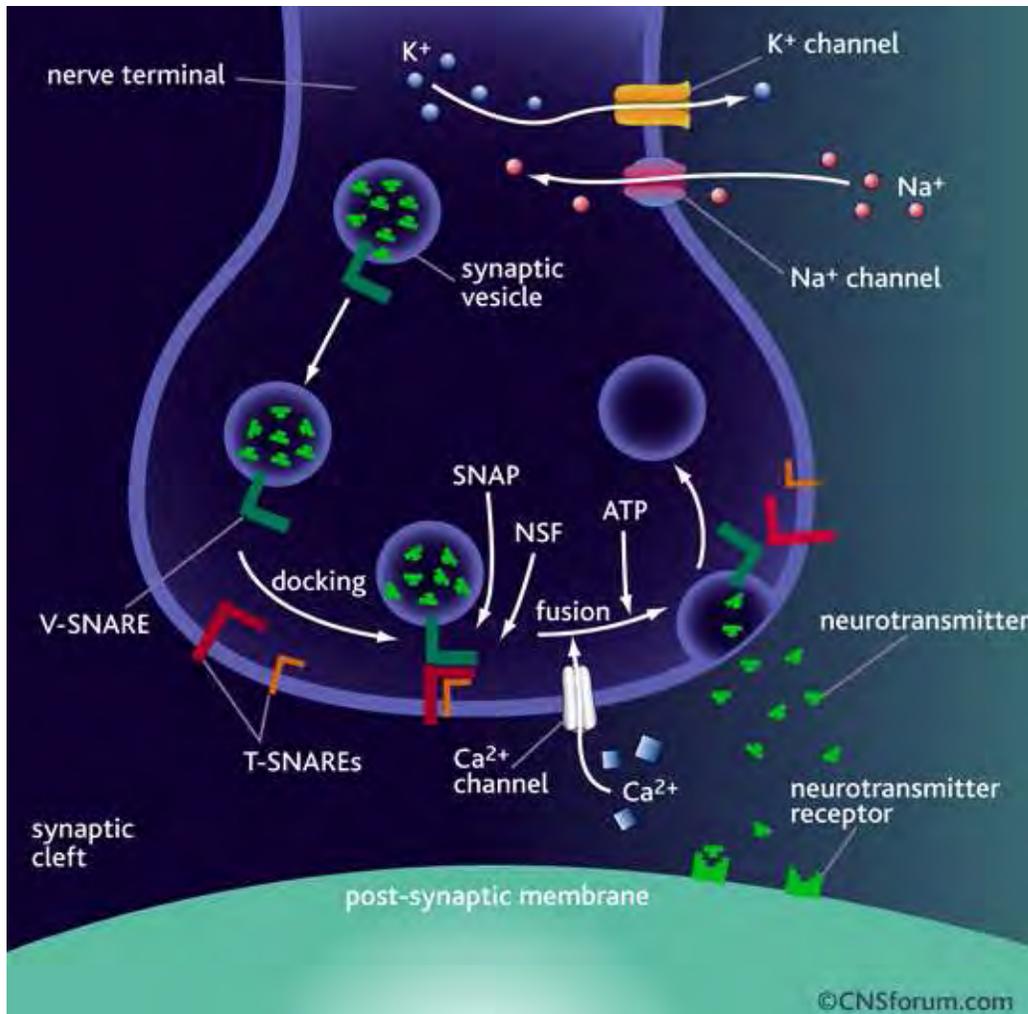


Figura 1: O ciclo de vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas são preenchidas com neurotransmissor através de transporte ativo e migram para a zona ativa, se ancorando. Nas zonas ativas, as vesículas tornam-se competentes para a fusão (amadurecimento). Após a abertura do poro de fusão e exocitose, disparado por Ca^{2+} , as vesículas sinápticas sofrem endocitose. Observe a formação de complexo heterotrimérico entre *t*-SNAREs e *v*-SNARE. (www.cnsforum.com/hirespng/vesicle-fusion.png).

1.2 Transmissão glutamatérgica

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos. Além de ter papel importante na sinalização excitatória, ele é importante na sinaptogênese, plasticidade sináptica e na patogênese de doenças neurológicas (revisado por Conti e Weinber, 1999).

O cérebro contém grandes quantidades de glutamato, mas somente uma pequena fração está presente extracelularmente. As maiores concentrações de glutamato são encontradas nos terminais nervosos (Ottersen e cols., 1996). Dois processos contribuem para a síntese desse neurotransmissor. No primeiro, o glutamato é formado a partir da glicose via ciclo de Krebs e da transaminação do α -cetoglutarato. No segundo, o glutamato é formado diretamente a partir da glutamina. Esta é formada na glia, transportada para o terminal e convertida localmente pela glutaminase em glutamato (revisado por Conti e Weinber, 1999). O glutamato pode ser liberado por meio de dois mecanismos: via exocitose de vesículas sinápticas (Ca^{2+} dependente) ou através de liberação não vesicular (Ca^{2+} independente) (Nicholls e cols., 1987).

A ação excitatória do glutamato se dá através de sua ligação a receptores específicos. Uma família de receptores glutamatérgicos pode ser ativada pelo análogo de glutamato, o *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e esses receptores (NR1, NR2A, B, C e D) são coletivamente denominados de receptores NMDA. Outra família de receptores é ativada por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiônico (AMPA) e por kainato. De acordo com sua preferência por AMPA ou kainato, esses receptores são subdivididos em receptores AMPA (GluR1-4) e receptores kainato (GluR5-9, KA1 e KA2). Os receptores NMDA e AMPA/kainato são receptores glutamatérgicos ionotrópicos sendo este, de baixa afinidade e dessensibilização rápida, enquanto aquele possui alta afinidade e lenta dessensibilização (Von Gersdorff e cols., 1998). Para ativação, ambas as classes de receptores necessitam de ligação direta por parte do glutamato e uma prévia despolarização da membrana. Existe ainda uma terceira família de receptores glutamatérgicos, os metabotrópicos associados à proteína G, que podem ser subdivididos nos grupos I (mGluR1 e 5), II (mGluR2 e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8).

A sinalização do glutamato deve ser controlada devido à dessensibilização dos receptores e de seu efeito tóxico em altas concentrações. Esse transmissor deve ser removido de todo espaço extracelular devido à presença de receptores glutamatérgicos na maioria dos elementos celulares (dendritos, terminais nervosos, corpos neuronais bem como nas células da glia). Como não existe uma enzima que metabolize o glutamato extracelular em um nível satisfatório, a remoção deste neurotransmissor nos arredores dos receptores se dá por recaptação do glutamato. Esse transporte ocorre em menor escala por difusão e ocorre, principalmente, através de proteínas transportadoras as quais usam o gradiente próton-eletroquímico através da membrana plasmática para direcionar a

captação desse neurotransmissor. Existem vários carreadores na membrana plasmática como o transportador glutamatérgico de alta afinidade (também conhecido como EAATs e dependente de sódio e potássio), o transportador de baixa afinidade (sódio-independente) e o carreador independente da internalização de sódio e trocador de glutamato-cistina (Danbolt, 2001). Como esperado, quando se inibem os transportadores glutamatérgicos da membrana aumenta-se a concentração de glutamato no espaço extracelular em segundos (Jabaudon e cols., 1999). O glutamato recaptado pelas células pode ser usado para propósitos metabólicos (síntese protéica, metabolismo energético, fixação de amônia) ou reutilizado como neurotransmissor (Danbolt, 2001).

1.3 Íons sódio

Os canais para sódio dependentes de voltagem não são responsáveis apenas pelo influxo inicial de sódio durante a fase de despolarização, mas também pela condução e propagação do sinal através da membrana. A cada potencial de ação ocorre o influxo de Na^+ através dos canais para sódio levando à despolarização da membrana plasmática (Stämpfli, 1981).

Há duas classes gerais de canais iônicos seletivos a sódio em humanos. A primeira classe é composta por canais para sódio epiteliais (ENaCs – Epithelial Na^+ Channels) que facilitam o fluxo de Na^+ através da membrana de células epiteliais (Hughey e cols., 2003 e Diakov e Korbmacher, 2004). A segunda classe é composta pelos canais para sódio ativados por voltagem. Estes canais passam transitoriamente pelo estado ativado, ou seja, o estado que conduz íons em resposta à despolarização da membrana que os contém. Logo após a sua ativação, estes canais passam para um estado não-condutor chamado “inativado”. Desta forma, a ativação destes canais conduz a uma despolarização transitória da membrana plasmática (revisado por Pearce e Kleyman, 2007).

A estrutura dos canais para sódio é semelhante à estrutura dos canais para cálcio, ambos dependentes de voltagem. A principal subunidade do canal, chamada α , é formadora do poro condutor e possui aproximadamente 260 kDa.

A subunidade α de canais para sódio e cálcio apresenta-se em quatro módulos simétricos (chamados domínios), que sofrem mudanças conformacionais em resposta a alterações no potencial de membrana (Catterall e cols., 2002). Estudos que correlacionam estrutura e função têm mostrado a importância de várias partes da subunidade α (figura

2). Alças presentes em cada um dos quatro domínios se juntam para formar o poro, cuja constituição central determina as propriedades de seletividade e condutância do canal. Uma parte desse poro, a região do “segmento P”, exibe refinada conservação entre canais de mesma seletividade, mas não entre canais com diferentes seletividades. Canais para sódio existentes em diversas espécies como águas-vivas, enguias, drosófila e humanos têm segmentos P muito semelhantes, e mutações nessa região alteram a seletividade (Heinemann e cols., 1992), sugerindo que o segmento P determina, pelo menos parcialmente, a seletividade do canal. Além disso, a estratégia geral da comporta de ativação é altamente conservada: o quarto segmento transmembrana (S4), dotado de resíduos positivamente carregados movem-se para fora em resposta à despolarização (Kontis e cols., 1997; Mitrovic e cols., 1998). O movimento do segmento S4 dos domínios I, II e III está associado com a ativação do canal (Stühmer e cols., 1989), enquanto o segmento S4 do domínio IV está relacionado com a inativação do canal (Chanda e Bezanilla, 2002). Além das subunidades α , existem polipeptídios auxiliares que são multifuncionais e são designadas subunidades β (Sharkey e cols., 1984). Elas modulam as propriedades biofísicas das subunidades α (Patton e cols., 1994), regulam o nível da expressão deste canal na membrana plasmática; funcionam como molécula para adesão de células, permitindo interações com a matriz extracelular; estão envolvidas na regulação da migração e agregação celular; além de interagir com o citoesqueleto (Isom, 2002). A modulação nas subunidades α pelas subunidades β é manifestada de diversas formas, como por exemplo, na cinética e na dependência de voltagem da ativação e inativação (Patton e cols., 1994).

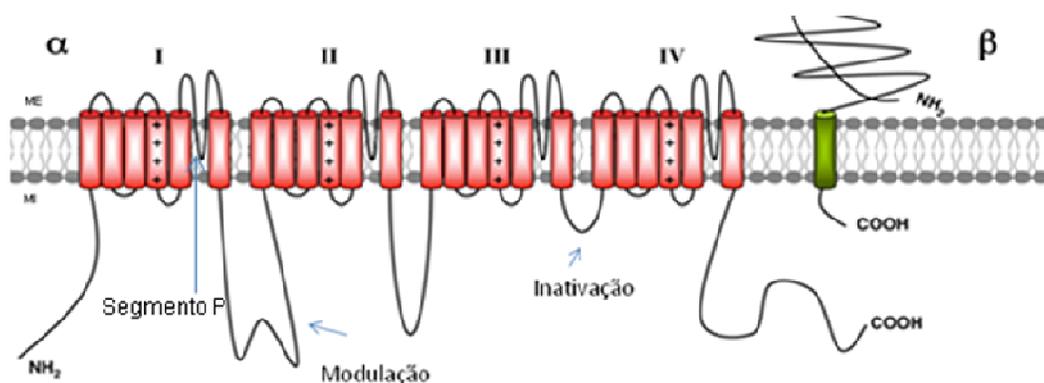


Figura 2: Representação esquemática de um único canal para sódio. Estruturas primárias das subunidades dos canais iônicos ativados por voltagem. ME representa o meio extracelular e MI, o meio Intracelular. Os cilindros representam os segmentos α -

helicoidais. As linhas cheias representam as cadeias polipeptídicas de cada subunidade com um tamanho aproximadamente proporcional para o número de resíduos de aminoácidos nos subtipos de canais para sódio cerebrais. Figura baseada em dados de Vacher e cols., 2008.

Um aumento na condutância ao Na^+ promovido pela abertura de alguns canais para este íon deflagra uma despolarização, e isso aumenta a probabilidade de outros canais se abrirem. Devido a este ciclo, uma despolarização modesta pode desencadear uma despolarização progressivamente maior, deflagrando um potencial de ação. Devido ao fenômeno da inativação, a condutividade dos canais para sódio durante um potencial de ação é transitória. Na inativação, porções citoplasmáticas do canal ocluem o seu poro resultando em estado não condutor, o que permite que se estabeleça a fase de repolarização da membrana (Hille, 2001) e, conseqüentemente, o seu retorno ao potencial de repouso (Anderson e cols., 2005). O estado inativado é distinto do estado fechado, e a volta para o estado fechado acontece à medida que a inativação é removida. Dessa forma, a inativação contribui para o período refratário (intervalo de tempo imediatamente após um potencial de ação no qual um neurônio é menos excitável), e assim determina a frequência máxima do potencial de ação (Leão e cols., 2005). Como as informações no sistema nervoso são codificadas pela frequência de potenciais de ação, a cinética e a dependência de voltagem da inativação são parâmetros importantes para entender as funções fisiológicas e patológicas dos canais para sódio dependentes de voltagem.

1.4 Íons cálcio

O Ca^{2+} desempenha um importante papel na regulação de uma grande variedade de processos neuronais. Os neurônios utilizam fontes extra e intracelular deste íon. O influxo de Ca^{2+} através dos canais operados por voltagem desencadeia a liberação de neurotransmissores (Katz, 1969). Tal influxo leva à formação dos microdomínios de Ca^{2+} que se localizam, preferencialmente, nas zonas ativas dos terminais pré-sinápticos, em correspondência com os aglomerados de vesículas sinápticas (Llinas e cols., 1995). A excitose requer alta concentração de cálcio, a qual sobe de seu nível basal de 100 nM para acima de 200 μM . Esse aumento na concentração de Ca^{2+} ocorre apenas nas proximidades dos canais, gerando microdomínios que seriam aumentos transientes da concentração deste íon (Heidelberger e cols., 1994; Llinas e cols., 1992).

Os canais para Ca^{2+} são membros de uma super família de canais catiônicos sensíveis à voltagem e são compostos por 4 ou 5 diferentes subunidades: α_1 , β_1 , α_2 - δ e γ . A subunidade α_1 é a maior das subunidades com peso molecular de 190-250 kDa. Ela incorpora o poro condutor, o sensor de voltagem, o aparato de *gating* e os sítios de regulação do canal por segundo mensageiro, drogas e toxinas. A subunidade α_1 é estruturalmente organizada em quatro domínios homólogos (domínio I-IV), cada um contendo três segmentos transmembrana (S1-S6). O segmento S4 serve como sensor de voltagem. A alça do poro entre o segmento S5 e S6 de cada domínio determina condutância iônica e a seletividade. Assim, mudanças em três aminoácidos na alça do poro entre os domínios I, III e IV convertem um canal seletivo a Na^+ para um canal seletivo a Ca^{2+} (Herlitz, 2003; Klugbauer e cols., 2003).

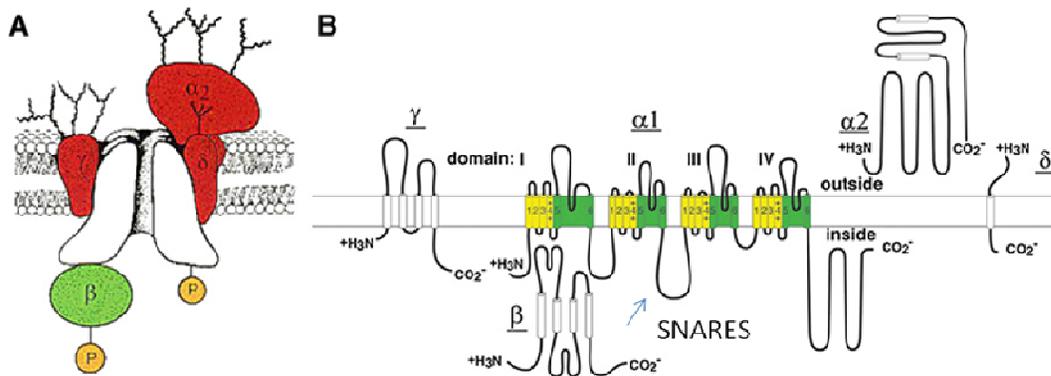


Figura 3: Representação esquemática de canal para cálcio. A composição das subunidades e estruturas de canais para cálcio ativados por voltagem é ilustrada em A. (B) As hélices são representadas pelos cilindros. As linhas cheias correspondem aos segmentos de polipeptídeos. Os sensores de voltagem são representados pelos cilindros amarelos e o poro formador do canal em verde. A seta indica o sítio de interação das proteínas SNARES na superfície intracelular da unidade α do canal. Figura baseada em Catterall e Few, 2008.

As correntes de Ca^{2+} em neurônios são divididas em: corrente ativada por grandes despolarizações e corrente ativada por baixas despolarizações. Os canais são classificados em vários subtipos. Os canais Ca_v1 ($\text{Ca}_v1.1$ a $\text{Ca}_v1.4$) conduzem correntes do tipo L. Canais do tipo Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$ a $\text{Ca}_v2.3$) conduzem correntes do tipo P/Q, N e R. Ca_v3 ($\text{Ca}_v3.1$ a $\text{Ca}_v3.2$) conduzem correntes do tipo T. As correntes L, P/Q, N e R são ativadas por grande despolarização e a corrente T por baixa despolarização (Vacher e

cols., 2008).

1.5 Cetamina

Este anestésico intravenoso foi sintetizado em 1963 por Stevens e utilizado pela primeira vez como mistura racêmica em humanos em 1965 (Craven, 2007; Kohrs e Durieux, 1998). Naquela época, a intenção era criar uma substância que substituísse a fenciclidina e que fosse capaz de induzir analgesia, amnésia, perda de consciência e imobilidade. Os resultados não foram exatamente os esperados. O anestésico provocou diversos efeitos psicomiméticos e, em virtude disso, não conseguiu ampla aceitação clínica. Entretanto, os efeitos analgésicos manifestaram-se atrativos. Com a introdução de outros anestésicos o uso da cetamina foi rapidamente diminuído. Em 1992, a Food and Drug Administration iniciou a separação dos isômeros abrindo novos horizontes terapêuticos. A S(+) cetamina foi considerada 3-4 vezes mais potente que o isômero levógiro para alívio da dor e apresenta menor incidência de efeitos psicomiméticos do que a mistura racêmica. Estes resultados motivaram a retomada do interesse pelo estudo deste fármaco (Kohrs R, Durieux ME, 1998).

A cetamina é utilizada em indução de anestesia em pacientes com choque hemodinâmico, crise asmática e como sedativa em pacientes não cooperativos, suplemento da anestesia local, sedação de pacientes com cuidados intensivos, analgesia em pacientes queimados, procedimentos odontológicos e em anestesia veterinária (Kohrs e Durieux, 1998; Haas e Harper, 1992; Lamont, 2008). Doses sub-anestésicas são utilizadas na terapia de dor pós operatória e dor crônica (Craven, 2007). Também tem sido utilizada, em pesquisas laboratoriais, como modelo para induzir esquizofrenia em animais (Becker e cols., 2003). Além do uso terapêutico, a droga tem sido utilizada, ilicitamente, por jovens produzindo efeito alucinógeno.

O mecanismo de ação da cetamina é complexo. Este anestésico interage com múltiplos sítios de interação incluindo receptores glutamatérgicos NMDA e não NMDA, receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, receptores monoaminérgicos e opióides. Além disso, parece bloquear canais iônicos para sódio e cálcio do tipo L provocando modesto efeito anestésico local e vasodilatação cerebral, respectivamente (Kohrs R, Durieux ME, 1998).

A administração de cetamina em humanos promove o bloqueio não- competitivo de

receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (Haas e Harper, 1992). No corno dorsal da medula, o bloqueio destes receptores inibe a hiperatividade de neurônios secundária à ativação prolongada de neurônios aferentes primários e inibe o comportamento nociceptivo induzido por lesões nos tecidos periféricos ou nervos (Dickenson, 1997). A administração intravenosa do anestésico potencializa o efeito de drogas bloqueadoras neuromusculares de maneira dose-dependente, possivelmente interagindo com receptores colinérgicos (Hass, 1992; Tsai, 1989, Maleque e cols., 1981). A S(+) cetamina mostra duas vezes maior afinidade por receptores muscarínicos que a S(-). Por outro lado, a afinidade pelos receptores muscarínicos é 10-20 vezes menor que pelos receptores NMDA (Kohrs R, Durieux ME, 1998).

Em relação à liberação de neurotransmissores sabe-se que a cetamina (6,9 μM) reduz a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) evocada por pilocarpina em fatias de *striatum* de ratos utilizando-se HPLC para a quantificação de GABA liberado (Grasshoff e cols., 2005). Em estudos com sinaptosomas cerebrais, cetamina (100 μM) inibiu a liberação de GABA evocada por veratridina (10 μM). Em concentrações maiores que 500 μM bloqueou modestamente o efluxo de GABA evocado por altas concentrações de KCl (Erecinska e cols., 1988). O anestésico também previne a secreção de catecolaminas induzida por agonistas nicotínicos em cultura de células adrenais bovinas (Purifoy e Holz, 1984). Por outro lado, em concentrações anestésicas (5-30 μM) a cetamina não afetou a liberação basal de [^3H]norepinefrina, a liberação estimulada por KCl (15-20 mM) ou 4-AP (0,5 mM) em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos (Pashkov e Hemmings, 2002).

Em 1978, Amaki e cols. demonstraram, utilizando hemi-diafragmas de ratos, que a cetamina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diminuiu em 30% a liberação pré-sináptica de acetilcolina. Entretanto, não puderam definir se o efeito inibitório era na síntese ou liberação do neurotransmissor. Em 1979, Torda e Murphy observaram que em junção neuromuscular de camundongos, concentrações baixas de cetamina (3,6 $\mu\text{mol/litro}$) aumentam o conteúdo quântico e o potencial evocado de placa motora. Por outro lado, na mesma preparação, cetamina em altas concentrações (116 $\mu\text{mol/litro}$), causou redução do conteúdo quântico.

A cetamina pode atuar também em canais iônicos. A cetamina bloqueou canais para sódio operados por voltagem em neurônios e em células de músculo esquelético (Haeseler e cols., 2003). Além desse dado o anestésico inibiu a condutância do sódio em canais para sódio em neuroblastomas (Reckiegel e cols., 2002). Foram observados,

também, efeitos em canais iônicos pós-sinápticos. De fato, investigou-se a ação da cetamina em canais para sódio e potássio em neurônios do corno dorsal da medula de ratos. O anestésico determinou o bloqueio dos canais para sódio com IC_{50} de 128 μ M. (Schnoebel e cols., 2005). Corroborando com estes achados, estudos relacionados ao efeito da cetamina em canais iônicos têm demonstrado que este anestésico bloqueia canais para sódio nos sistemas nervoso central e periférico (Seeler e cols., 1996), bloqueia canais para potássio (Brau e cols., 1997) e canais para cálcio sensíveis a voltagem (Hirota e Lambert 1996).

O mecanismo pelos quais os anestésicos gerais atuam ainda não está completamente elucidado. Estes fármacos podem alterar a neurotransmissão atuando em alvos pré - e pós-sinápticos. A compreensão dos mecanismos de ação pós-sinápticos da cetamina em receptores e canais iônicos é bem caracterizado. Entretanto, as informações sobre as ações pré-sinápticas da cetamina são bastante escassas. Assim, no presente trabalho, investigamos os efeitos da cetamina na liberação de glutamato, exocitose de vesículas sinápticas e, concentração intracelular de Na^+ e Ca^{2+} em sinaptosomas córtico-corticais de ratos com o objetivo de identificar efeitos pré-sinápticos da cetamina que possam contribuir para sua ação anestésica no SNC.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos pré-sinápticos do anestésico cetamina em doses anestésica, sub-anestésica e supra-anestésica nos terminais nervosos cérebro-corticais de ratos (sinaptosomas).

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito da cetamina nos níveis basais de Na^+ interno sinaptosomal e mediante estimulação com veratridina.
- Investigar o efeito da cetamina na concentração basal de Ca^{2+} intrasinaptosomal e mediante estímulo de veratridina e KCl.
- Investigar o efeito da cetamina na exocitose espontânea de vesículas sinápticas e na exocitose de vesículas sinápticas evocada por veratridina e KCl.
- Investigar o efeito da cetamina na liberação basal de glutamato e induzida por veratridina e KCl.

3 Material e Método

3.1 Equipamentos

- Banho-maria regulado na temperatura de 35°C

Modelo: 1050/270 da Biomatic

- Homogeneizador

Modelo: Glass Col 099C

- Bomba peristáltica

Modelo 7533-80 – Cole Parmer

- Centrífuga refrigerada

Modelo: HIMAC CR 21E da HITACHI KOKI CO, LTDA, Japão.

- Microcentrífuga refrigerada

Modelo 5415R, Eppendorf.

- Espectrofluorofotômetro

Modelo RF-5301 PC. Shimadzu.

-Balança eletrônica de precisão milesimal

OHAUS modelo A560

3.2 Soluções

-Solução Gradiente

Composição: Sacarose 0,32M, EDTA 1,0 mM, DTT (ditiotreitól) 0,25 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 0,1N.

- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH)

Composição: NaCl 124mM, KCl 4mM, MgSO₄ 1,2mM, HEPES 25mM, Glicose 10 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 5M.

- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) Colina

Composição: Cloreto de colina 124mM, KCl 4mM, MgSO₄ 1,2mM, HEPES 25mM, Glicose 10 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com solução Trizma base 1mM.

- Soluções Percoll

Composição: 3, 10, 15, 23% (v/v) de Percoll[®] diluídos em solução de sacarose.

- Solução KRH-albumina 1mg/mL

Composição: Albumina sérica bovina 1mg/ml diluída em solução KRH.

3.3 Drogas e Reagentes:

- NaCl, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, HEPES, glicose, DMSO, l-glutamina, Pluronic, Tetrodotoxina, Veratridina, Cloreto de Colina, Fura-2 acetoximetil éster (AM), sacarose, Percoll[®] (solução em sílica coloidal), SDS (dodecil sulfato de sódio), EGTA (etileno-bis-β-aminoetil éster), gramicidim D, Glutamato desidrogenase tipo II – GDH - (EC 1.4.1.3), NADP (α-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (Mo, USA). SBFI-AM e FM2-10 foram adquiridos da Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA. Ketamin-S(+)(cloridrato de S(+)) cetamina), 50 mg/ml, solução injetável - 10 ml, Lab. Cristália.

3.4 Animais

Os procedimentos foram realizados conforme o Comitê Ético de uso de animais de experimentação (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de cobaias, sendo utilizado um animal por experimento. Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 180-200 gramas, tratados sob ciclo 14/10h luz/noite, alimentação e água livre, fornecidos pelo CEBIO – ICB/UFMG.

3.5 Modelo experimental – Sinaptosomas

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

O terminal sináptico *in situ* pode funcionar independente do corpo celular exceto

pela substituição de proteínas e de componentes de membrana via processo de transporte axonal. Estes terminais representam um sistema simplificado que comporta a maquinaria para recaptar, sintetizar, estocar e liberar neurotransmissores. Por este motivo, esta preparação é capaz de permanecer viável por até 6 horas sem perder a capacidade de manter seus níveis de ATP, gradientes iônicos e a liberação de neurotransmissores. Nos experimentos deste trabalho, eles foram utilizados até, no máximo, 4 horas após a preparação.

As preparações neuronais são heterogêneas no que se refere ao tipo de neurotransmissor contido nas vesículas. Entretanto, é possível maximizar o neurotransmissor de interesse, escolhendo áreas cerebrais específicas que contenham maior concentração do neurotransmissor. Por outro lado, não é possível separar subpopulações de sinaptosomas com neurotransmissor específico baseado em diferenças físicas como tamanho ou densidade (Nicholls, 1994)

3.5.1 Preparação do sinaptosoma

Os animais eram decaptados com o uso de guilhotina. O cérebro era removido rapidamente e transferido para o meio contendo solução gradiente mantido no gelo. Após o isolamento dos hemisférios cerebrais, estes eram dissecados individualmente sobre placa de Petri contendo papel de filtro embebido com solução gradiente. O córtex era dissecado e todo o cuidado foi tomado durante remoção de principalmente mielina, porque em experimentos de exocitose, retém grandes quantidades do corante FM2-10, resultando em alta fluorescência no controle e, portanto sinal muito ruidoso (Marks e McMahan, 1998).

O córtex dissecado era transferido para tubo Potter-Elvehjen contendo 8 mL de solução gradiente. O tecido era, então, homogeneizado com pistilo de teflon acoplado ao homogeneizador Glass Col modelo 099C fazendo-se 14 movimentos de homogeneização. Nesta cuidadosa homogeneização, a terminação pré-sináptica é rompida dos processos axonais. Posteriormente, essa membrana do terminal pré-sináptico sofre um selamento formando uma vesícula.

Em seguida o homogenato era centrifugado a 1000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante desta primeira centrifugação era coletado e aplicado em um gradiente descontínuo de Percoll® (23, 15, 10 e 3% v/v em solução gradiente) como previamente

descrito (Dunkley e cols., 1986) e submetido à centrifugação a 37000 g a 4°C, por 15 min. O Percoll é um meio usado para o fracionamento de células e organelas subcelulares de uma variedade de tecidos. A maior vantagem deste meio é sua alta viscosidade que permite sedimentação mais rápida e o uso de baixas forças para centrifugação. Outra vantagem, é que a isotonicidade, encontrada no método baseado em sacarose, é mantida (Dunkley e cols., 1986).

As frações P3 e P4 (que constituem os sinaptosomas) eram recolhidas em conjunto e submetidas à outra centrifugação a 37000 g a 4°C, por 20 min, agora em solução KRH sem cálcio (ver Soluções) para a retirada do excesso de Percoll® e precipitação dos sinaptosomas. O precipitado (fração sinaptosomal purificada) era ressuspenso e aliqotado em volumes que variaram conforme o tipo de experimento realizado seja exocitose, captação de Ca^{2+} ou Na^+ e liberação de glutamato.

Em todos os experimentos, as alíquotas eram transferidas para tubos cônicos de micro-centrífuga e mantidas no gelo até a realização dos experimentos. Amostras de aproximadamente 50 μ L eram reservadas e congeladas a -20°C para posterior dosagem de proteínas segundo método de Bradford (Bradford e cols., 1976).

3.6 Estímulos despolarizantes:

3.6.1 Veratridina

A veratridina é uma toxina lipossolúvel que tem como alvo canais para sódio. Ela liga-se preferencialmente ao canal para sódio no seu estado ativado, no sítio 2 do mesmo, causando persistente ativação deste através de um mecanismo alostérico que leva ao bloqueio da inativação e, mudança da dependência de voltagem do canal para um potencial de membrana mais negativo. A veratridina mantém estes canais para sódio voltagem dependentes ativados, o que leva ao influxo deste íon e conseqüente despolarização do terminal nervoso e influxo de Ca^{2+} através de canais para cálcio voltagem dependente. Estes efeitos podem ser inibidos por tetrodotoxina (TTX), um bloqueador do canal para sódio voltagem dependente (Catteral ,1980; Hille e cols., 1987).

3.6.2 KCl

A despolarização por KCl induz o influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio

dependentes de voltagem aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Esta pode estar aumentada através do influxo deste íon como também pela liberação de Ca^{2+} de estoques internos, inibição do efluxo ou seqüestro do mesmo. Os antagonistas de canais para cálcio voltagem dependentes induzem a diminuição no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ secundária a despolarização provocada pelo KCl devido à inibição do influxo de Ca^{2+} através destes canais (Kobayashi e cols., 1992).

3.7 Exocitose

3.7.1 Uso de FM2-10 para o estudo da exocitose de vesículas sinápticas

Com o desenvolvimento dos marcadores “FM”, tornou-se possível o estudo de vários aspectos da transmissão sináptica. Marcadores FM são comumente usados como indicadores da exocitose e, em associação com outras técnicas tais como indicadores fluorescentes de Ca^{2+} e técnicas eletrofisiológicas, ajudam a elucidar os mecanismos da homeostase pré-sináptica de Ca^{2+} (Cochilla e cols., 1999). Esses marcadores foram inicialmente desenvolvidos para serem sensores de potencial de membrana, mas com o passar do tempo, foram se tornando ferramentas úteis no estudo da transmissão sináptica e da reciclagem de vesículas sinápticas. A grande utilidade dos FM's reside na observação de que essas moléculas se ligam reversivelmente a membranas e, principalmente, por emitir fluorescência consideravelmente maior quando ligadas do que quando desligadas das membranas (Betz e cols., 1996). Moléculas FM têm caráter anfipático e consistem em uma cauda lipofílica ligada (via uma ou múltiplas ligações duplas) a uma cabeça positivamente carregada (figura 4.).

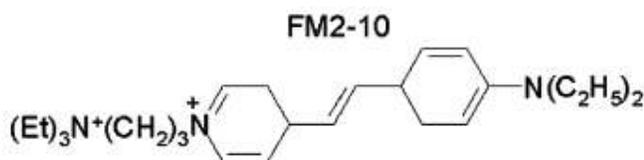


Figura 4: **Estrutura química da molécula FM2-10:** Moléculas anfipáticas nas quais uma cauda lipofílica está ligada a uma cabeça carregada positivamente via ligações duplas. A cabeça carregada positivamente impede o marcador de atravessar livremente as membranas celulares, mantendo-o preso no interior de endossomas ou vesículas. Por sua vez, o comprimento da cauda lipofílica determina a afinidade da molécula por membranas.

Marcadores com uma longa cauda lipofílica marcam membranas com uma maior afinidade do que marcadores com cauda curta. Finalmente, o número de duplas ligações unindo a cabeça à cauda determina as propriedades espectrais da sonda (retirado de Brumback e cols., 2004).

3.7.2 Ensaio para exocitose de vesículas sinápticas

Os experimentos de exocitose foram realizados de acordo com metodologia descrita por De Castro Junior e cols., 2008. Os sinaptosomas (alíquotas de 500µL contendo aproximadamente 1mg/ml de proteína sinaptosomal) foram diluídos para 1mL com solução KRH e transferidos para uma cubeta de fluorímetro contendo um agitador magnético. Foi adicionado FM2-10 50µM (solução estoque a 25 mM) às alíquotas e CaCl₂ 5mM (solução estoque a 1M). Estas eram incubadas a 37°C sob agitação e ao abrigo da luz, por 3 minutos, para a marcação dos sinaptosomas com o FM2-10. Foi adicionado KCl 30mM (solução estoque a 3M) para estimular a captação do marcador. Após 45 seg o material foi transferido para tubo tipo eppendorf e centrifugado a 10000 rpm por 15 seg. O sobrenadante era descartado e depois ressuspensionado com 1mL de solução KRH contendo albumina bovina 1mg/mL, sendo novamente centrifugado a 10000 rpm por 15seg. A albumina bovina contribui para a lavagem do excesso de FM2-10 que ficou ligado na membrana externa do sinaptosoma e que não foi internalizado após estímulo com KCl 30mM. O sobrenadante era descartado e novamente ressuspensionado com 1 mL de KRH-albumina e centrifugado a 10000 rpm por 15seg em um total de 3 lavagens. Após desprezar o sobrenadante, os sinaptosomas eram ressuspensionados com 2 mL de solução KRH sem albumina e incubados durante 15 min em banho a 35°C e, posteriormente, transferidos para a cubeta de fluorímetro contendo agitador magnético. Iniciou-se a leitura no espectrofluorímetro com a excitação ajustada em um comprimento de onda de 488 nm e a emissão em 570 nm. A taxa de aquisição foi de 1 ponto por seg.

Durante a coleta de dados no espectrofluorímetro foram adicionados reagentes na seguinte seqüência:

Início	0 s.
Estímulo Cetamina , KCl ou Veratridina	200 s
Término do registro	500 s

Inicialmente, a cetamina foi utilizada como estímulo. Nos experimentos com KCl ou

veratridina os sinaptosomas eram pré-incubados com o anestésico durante 15 min antes da leitura no espectrofluorímetro.

A análise dos dados consistiu na normalização dos valores e subtração da fluorescência final da fluorescência inicial.

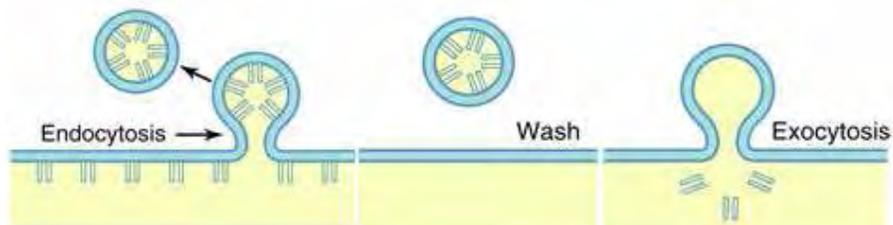


Figura 5: **Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas por FM2-10.** (A) Marcação da membrana do terminal pré-sináptico com o FM2-10 adicionado ao meio externo. A membrana recebeu um estímulo despolarizante na presença do FM2-10. (B) Três centrifugações (lavagens) são realizadas para remover as moléculas de FM que não foram internalizadas. (C) Um segundo ciclo de exocitose induzido por estímulo despolarizante resulta na liberação da sonda que foi internalizada durante a endocitose. (Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by Siegel e cols., 2006).

3.8 Liberação de glutamato

3.8.1 Método espectrofluorimétrico para dosagem da liberação contínua de glutamato

Este procedimento baseia-se na reação química que envolve GDH, NADP⁺, NADPH e glutamato. O glutamato que é liberado pelos sinaptosomas de córtex de ratos sofre oxidação pela enzima GDH. O NADP⁺ é o aceptor do elétron desprendido que ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360 nm, emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro. Dessa maneira pode-se quantificar o neurotransmissor excitatório liberado pela preparação de sinaptosomas (Nicholls e cols., 1987; Romano-Silva e cols., 1993).

A reação, descrita abaixo, pode ocorrer tanto para a formação de α -cetogluturato ou L-glutamato, dessa forma um excesso de NADP⁺ favorece o sentido da reação para a formação de α -cetogluturato.

GDH



Equação 1. Oxidação do glutamato pela GDH em presença de NADP⁺ e água, para a formação de NADPH e α -cetogluturato. A reação é reversível, podendo ocorrer a formação de α -cetogluturato e L-glutamato.

3.8.2 Ensaio para a liberação de glutamato

Os experimentos de medida da liberação de glutamato foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Romano-Silva e cols., 1993. Os sinaptosomas de córtex cerebral de rato (alíquotas de 200µL contendo aproximadamente 1,5 mg/ml de proteína sinaptosomal) foram incubados durante 30 min. Após este período foram diluídos para 1,5mL com KRH sem cálcio e mantidos por mais 30 minutos em incubação. Ao término da incubação os tubos foram centrifugados a 15000 g à temperatura ambiente, o sobrenadante desprezado e os sinaptosomas ressuspendidos em 2,0ml de KRH sem cálcio numa cubeta de plástico descartável e levada ao espectrofluorímetro. Neste, a temperatura foi mantida 37°C e agitação com barra magnética. A adição dos reagentes para o registro de dados no espectrofluorímetro ocorreu na seguinte ordem:

Início		0 s.
CaCl ₂	1 mM	30 s
NADP	1 mM	90 s
GDH	5 U/µL	150 s
Cetamina, KCl ou Veratridina		200 s
Padrão de Glutamato	5 nmol	800 s
Término do registro		900 s

A ordem dos experimentos para o estudo da liberação de glutamato iniciava com cetamina como estímulo. Nos experimentos com KCl 30mM ou veratridina 10µM o anestésico era adicionado à suspensão sinaptosomal nos últimos 15 min de incubação.

3.9 Ca²⁺ interno sinaptosomal

3.9.1 Uso do FURA-AM para o estudo da concentração de cálcio intrasinaptosomal

A sonda FURA 2-AM (forma acetoximetilester) é um importante indicador de Ca²⁺ e tem contribuído para significativos avanços no estudo do papel do mesmo em diversos tipos celulares (Nakamura e cols.,1996). A sonda atravessa a membrana plasmática, sendo posteriormente desesterificada no citosol por esterases específicas. Esta sonda é seletiva para o Ca²⁺, sendo que a sua ligação altera o espectro de excitação em aproximadamente 30nm de modo que a intensidade obtida na faixa de excitação de 340 e 380nm permite a medida da [Ca²⁺]_i

3.9.2 Medida do Ca²⁺ interno sinaptosomal

Os experimentos de medidas de Ca²⁺ intrasinaptosomal foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Romano-Silva e cols., 1993. Os sinaptosomas foram diluídos e aliqotados (200µL), sendo que Fura2-AM (solução estoque a 1mM em DMSO) foi adicionado à suspensão sinaptosomal em uma concentração final de 5 µM, incubada a 37°C por 30 min e em seguida diluída para 1200µL, seguida por mais 30 min de incubação. Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 10000 rpm durante 30 segundos para a retirada do excesso de FURA2-AM não incorporado aos sinaptosomas. O precipitado foi ressuspenso em 2mL de KRH sem Ca²⁺ e a preparação transferida para a cubeta fluorimétrica plástica descartável e levada ao espectrofluorímetro com agitação e temperatura controlada. Em seguida, foram adicionadas as seguintes substâncias nos respectivos intervalos de tempo:

Início		0 s.
CaCl ₂	1 mM	30 s
Estímulo	Cetamina, KCl ou Veratridina	360 s
SDS (10%)	20 µL	510 s
EGTA	4 mM	570 s
Término do registro		640 s

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

A cetamina foi utilizada como estímulo nas concentrações de 1 µM, 30 µM e 500 µM. Nos demais experimentos, os sinaptosomas eram incubados durante 15 min com cetamina e o estímulo despolarizante utilizado era o KCl 30mM ou veratridina 10 µM.

3.10 Na⁺ interno sinaptosomal

3.10.1 Uso do SBFI-AM para o estudo dos níveis de Na⁺ interno sinaptosomal

O influxo de Na⁺ pode ser determinado pelo uso de indicadores fluorescentes deste íon (Deri e Adam-Vizi, 1993). O SBFI-AM (sodium-binding benzofuran isophthalate) é um

indicador de Na⁺ permeável a membrana sinaptosomal. A sonda deve ser excitada em 330/370 nm e a fluorescência emitida é coletada em 500 nm.

3.10.2 Ensaio para mensuração do Na⁺ interno sinaptosomal

Os experimentos de mensuração do Na⁺ intrasinaptosomal foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Massensini e cols., 1998. Os sinaptosomas obtidos foram ressuspensos em KRH-colina sem cálcio (para se manter o equilíbrio iônico NaCl foi substituído por cloreto de colina em concentração equimolar) e divididos em seis tubos com 200µL cada uma. Estes pontos foram incubados a 35°C com a sonda SBFI-AM (10µM) juntamente com Pluronic® (concentração final 1%) a 1:1(v/v). Após 30 minutos de incubação os sinaptosomas foram diluídos para 1,5mL de KRH-colina e continuaram em incubação por mais 30 min. Os sinaptosomas foram centrifugados a 15000 g por 15 s e ressuspensos em 2mL de KRH sem cálcio em cubeta fluorimétrica plástica descartável. O ponto era levado ao fluorímetro com agitação e temperatura 37°C constantes. Em cada cubeta foram adicionados as seguintes substâncias nos respectivos intervalos de tempo:

Início		0 s.
CaCl ₂	1 mM	30 s
Estímulo	Cetamina ou Veratridina	180 s
Gramicidina D	2 mM	510 s
Término do registro		630 s

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

O tratamento com o anestésico era realizado nos últimos 15 min de incubação e após a centrifugação o anestésico era novamente aplicado à solução sinaptosomal no início da leitura no espectrofluorímetro.

3.11 Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em dias independentes e repetidos no mínimo três vezes. Os resultados foram analisados por análise de variância pelo programa Graph Pad Prism versão 4.0, por ANOVA de uma via, após constatação que as variâncias entre grupos diferiam significativamente, foi feito teste Newman Keuls para comparação entre

grupos, considerando diferenças entre grupos estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Efeito da cetamina no Na⁺ intrasinaptosomal

A transmissão sináptica inicia-se com a geração do potencial de ação no axônio do neurônio pré-sináptico que envolve mudanças nas concentrações Na⁺ e K⁺. Esse potencial se propaga ao longo do terminal e promove a abertura de canais para cálcio regulados por voltagem. O aumento transiente da concentração de Ca²⁺ intracelular induz a exocitose de vesículas sinápticas com conseqüente liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. Todo esse processo que envolve a liberação do neurotransmissor pode ser um alvo de ação dos anestésicos como a cetamina. Assim, nesta série de experimentos avaliamos o efeito da cetamina na concentração intrasinaptosomal de Na⁺. Inicialmente, foi avaliado o efeito isolado da cetamina nos níveis intrasinaptosomal de Na⁺ e, posteriormente o efeito deste agente na concentração intrasinaptosomal de Na⁺ evocada pela veratridina

Os sinaptosomas foram incubados durante 60 min a 35°C com a sonda SBFI-AM em KRH modificado. Durante a leitura de fluorescência no espectrofluorímetro a suspensão sinaptosomal foi incubada com cetamina 1 µM, 30 µM e 500 µM. A tabela 1 e a figura 6 (A e B) demonstram que a cetamina não alterou os níveis de Na⁺ interno quando comparado com o valor basal do Na⁺ interno sinaptosomal, sugerindo que este agente não interfere na concentração basal intrasinaptosomal de Na⁺ pré-sináptico.

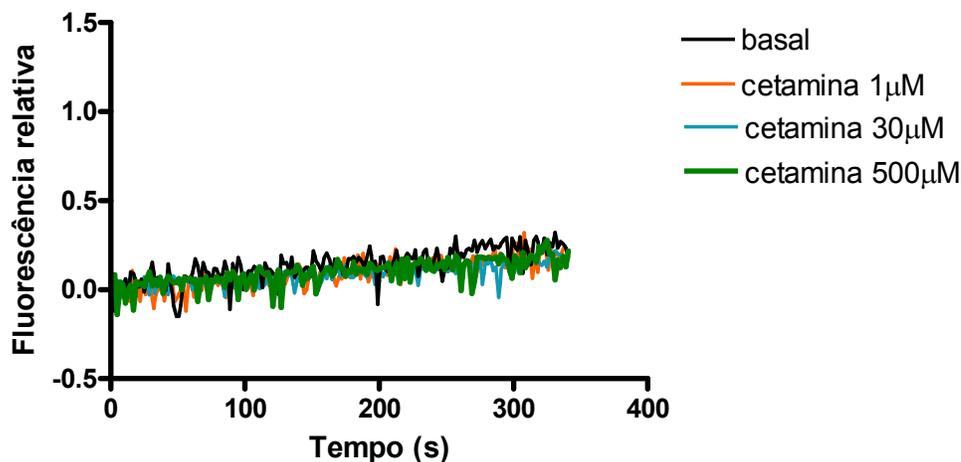
Em seqüência foi avaliado o efeito da cetamina na presença de veratridina. Assim, nestes experimentos os sinaptosomas foram incubados durante 60 min a 35°C com a sonda SBFI-AM em KRH modificado na ausência ou presença de cetamina 1 µM, 30 µM e 500 µM. Após 180s de leitura no espectrofluorímetro a suspensão sinaptosomal foi estimulada com veratridina (10 µM). Observou-se que o alcalóide foi capaz de induzir um aumento significativo na concentração de Na⁺ interno nos sinaptosomas de córtex cerebral de ratos (Tabela 2, figura 7 A e B; p<0,05 comparado com o basal). Esse efeito foi completamente bloqueado quando os sinaptosomas foram pré-incubados com TTX (Tabela 2, Figura 7A e B). Concentrações de 1 µM e 30 µM não inibiram o efeito da veratridina. Entretanto, cetamina (500 µM) inibiu em 3,4 vezes o aumento dos níveis de Na⁺ evocado pela veratridina 10 µM (figura 7 B). Esses resultados sugerem que, em

concentrações supra-anestésicas, a cetamina inibe o aumento de Na^+ induzido pela veratridina em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.

Tabela 1 - Fluorescência do SBFI mediante estímulo com cetamina. Os resultados representam a média±EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	cetamina 1 μM	cetamina 30 μM	cetamina 500 μM
Fluorescência SBFI	0,24±0,04	0,21±0,01	0,19±0,04	0,13±0,02

A



B

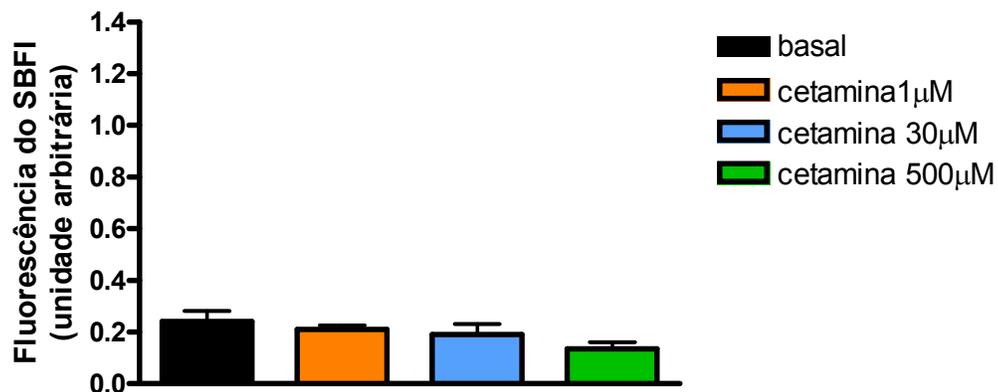
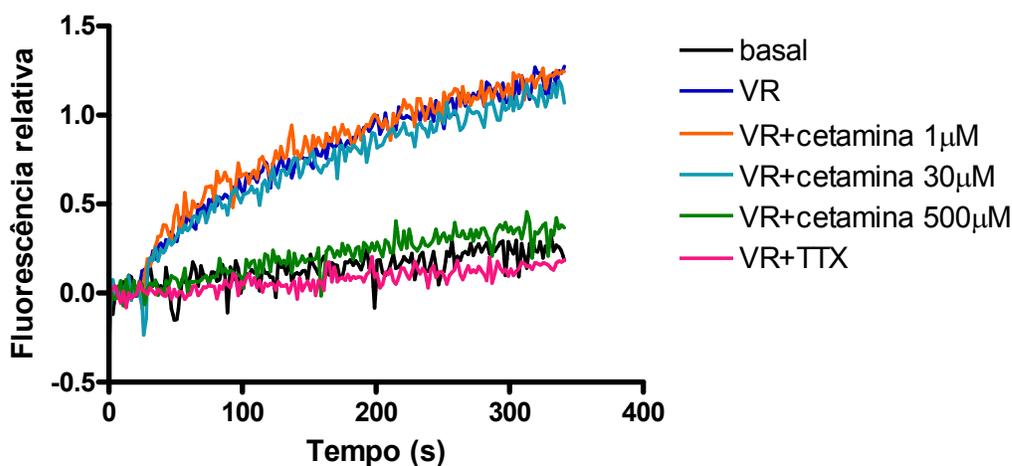


Figura 6 - Efeito da cetamina sobre o sódio interno sinaptosomal. Os sinaptosomas foram incubados com a sonda SBFI (10 μM). Cetamina 1 μM , 30 μM e 500 μM foram adicionados a suspensão sinaptosomal. (A) mostra as curvas do aumento da fluorescência da sonda SBFI, obtida após a aplicação dos estímulos de acordo com a legenda. (B) mostra Δ Fluorescência do SBFI. As barras e as curvas correspondem às médias de pelo menos três experimentos independentes.

Tabela 2 - Fluorescência do SBFI mediante estimulação com Veratridina 10 μ M na presença de cetamina. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	VR	VR+cetamina 1 μ M	VR+cetamina 30 μ M	VR+cetamina 500 μ M	VR+TTX
Fluorescência SBFI	0,24 \pm 0,04	1.23 \pm 0,09	1,24 \pm 0,03	1,12 \pm 0,06	0.36 \pm 0.02	0,17 \pm 0,01

A



B

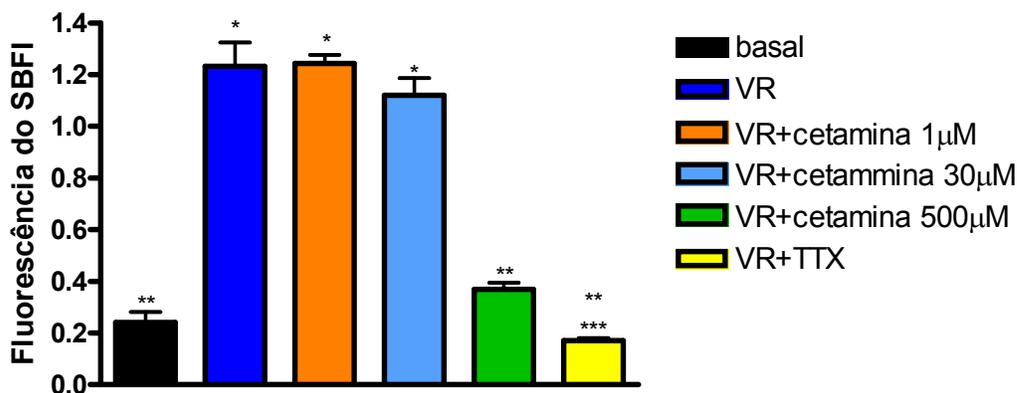


Figura 7- Efeito da cetamina na concentração do Na⁺ interno na presença de veratridina (VR). Os sinaptosomas foram incubados com a sonda SBFI (10 μ M) na ausência ou presença de cetamina 1 μ M, 30 μ M e 500 μ M. VR foi adicionada a suspensão sinaptosomal. (A) mostra as curvas do aumento da fluorescência da sonda SBFI, obtida após a aplicação dos estímulos de acordo com a legenda. (B) mostra Δ Fluorescência do SBFI. As barras e as curvas correspondem às médias de pelo menos três experimentos independentes. (*) p <0,05 em relação ao basal. (**) p <0,05 em relação à VR. (***) p <0,05 em relação à VR+Cetamina 500 μ M.

4.2 Efeito da cetamina na $[Ca^{2+}]_i$

A entrada transitória de Ca^{2+} para o interior do terminal nervoso pré-sináptico é necessária para disparar a liberação de neurotransmissores (Katz, 1969). Este é o passo seqüencial após a entrada de Na^+ . O aumento do Ca^{2+} intrasinaptosomal via Ca^{2+} extrasinaptosomal depende da abertura dos canais para cálcio sensíveis a variação de voltagem. A inibição do aumento do Na^+ intrasinaptosomal evocado por veratridina na presença de alta concentração de cetamina sugere um possível efeito deste agente na concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal. Assim, a suspensão sinaptosomal foi incubada a $37^{\circ}C$ durante 1 hora com Fura2-AM ($5 \mu M$). Em seguida os sinaptosomas foram transferidos para a cubeta e a leitura de fluorescência no fluorímetro foi realizada na presença ou ausência de cetamina. Cetamina nas concentrações de $1 \mu M$, $30 \mu M$ e $500 \mu M$ não alterou a concentração intrasinaptosomal de Ca^{2+} em relação ao basal (Tabela 3 e figura 8 A e B).

Tabela 3 – Efeito da cetamina na concentração de Ca^{2+} interno sinaptosomal. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	cetamina 1 μM	cetamina 30 μM	cetamina 500 μM
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	46,91 \pm 4,81	34,71 \pm 1,91	40,36 \pm 3,84	67,45 \pm 4,20

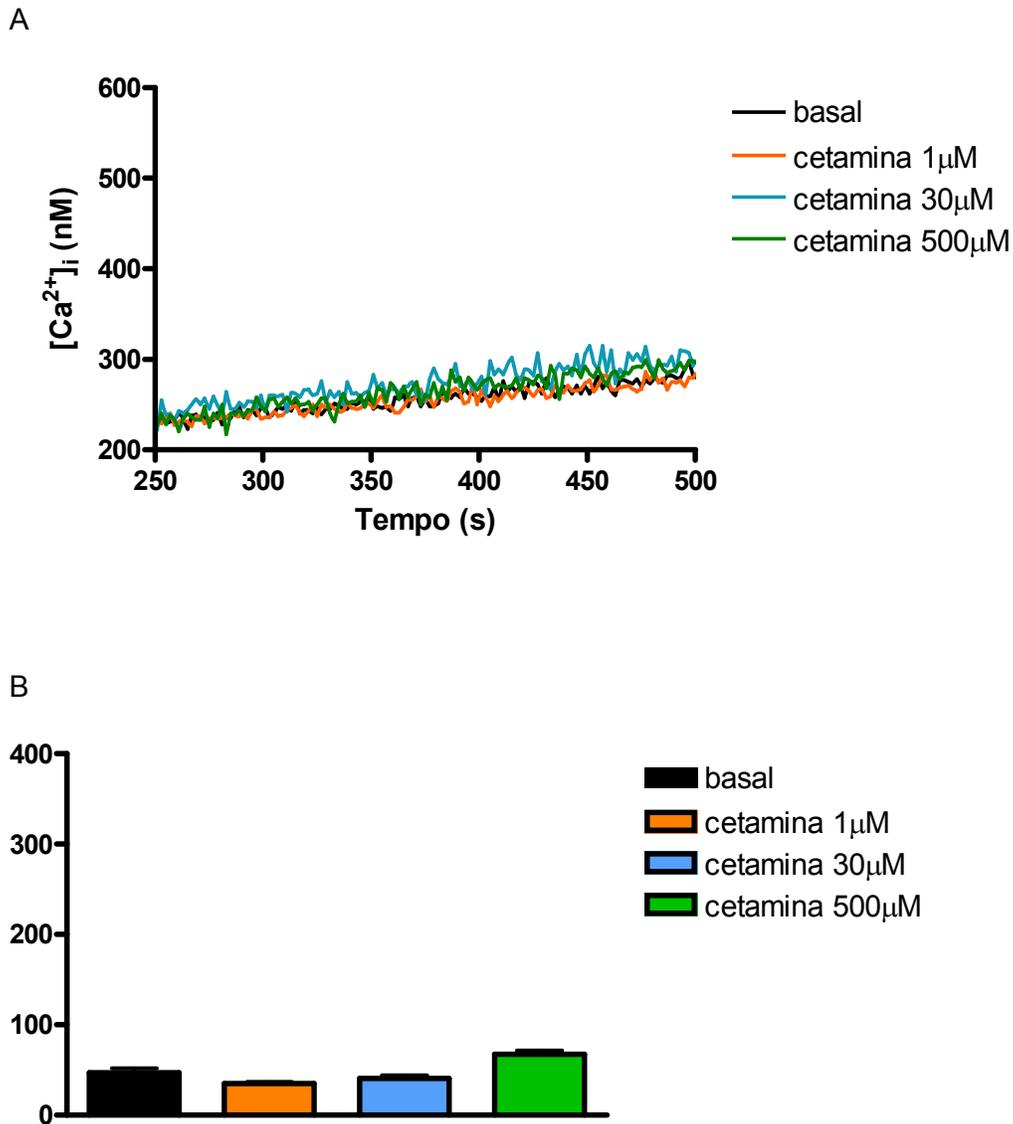


Figura 8 – Cetamina não interfere na concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal. Os sinaptosomas de córtex cerebral foram incubados com FURA2-AM (excitação 340/380nm e emissão em 510nm). Cetamina 1 μM , 30 μM e 500 μM foram adicionados a suspensão sinaptosomal (A). (A) mostra as curvas de concentração interna de Ca^{2+} mediante aplicação de cetamina nas concentrações estudadas. (B) mostra em barras a variação da fluorescência mediante os estímulos indicados pela legenda. As barras e as curvas correspondem às médias de pelo menos três experimentos independentes.

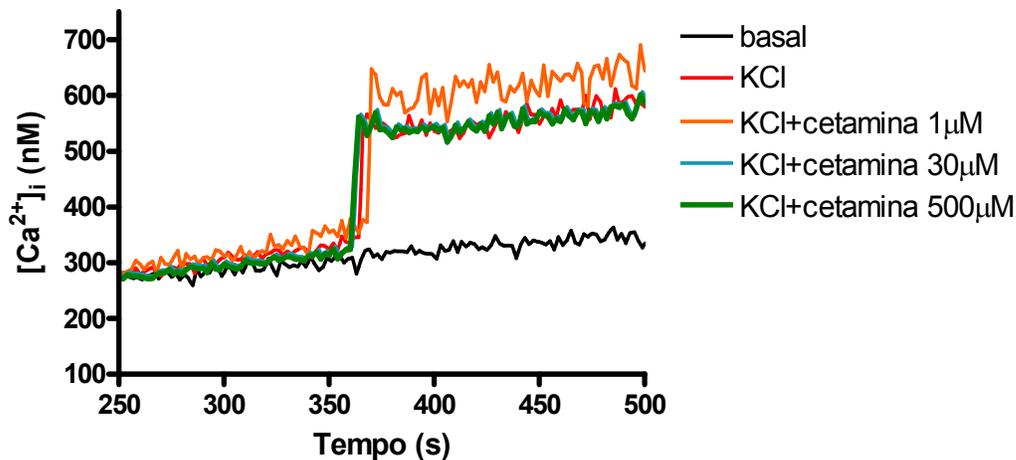
4.3 Efeito da cetamina na $[Ca^{2+}]_i$ evocada por KCl 30mM

A despolarização por KCl induz o influxo de íons Ca^{2+} através dos canais para cálcio dependentes de voltagem, e isto aumenta a concentração de Ca^{2+} no interior da célula (Kobayashi e cols., 1992). Assim, estudamos o efeito da cetamina na $[Ca^{2+}]_i$ evocado por KCl 30mM. Os sinaptosomas foram incubados com FURA2-AM durante uma hora. Nos últimos 15 min foram tratados com as concentrações de cetamina em estudo. O KCl 30 mM induziu um aumento substancial na concentração de Ca^{2+} interno da ordem de 258 nM (figura 9A). Observou-se uma tendência da cetamina 1 μ M em aumentar a concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal evocada por KCl. Entretanto, esse efeito não apresentou significância estatística ($p=0.13$) (figura 9 B). As concentrações de 30 e 500 μ M de cetamina não modificaram o aumento de Ca^{2+} intrasinaptosomal evocado por KCl (figura 9 A e B, Tabela 4). Este resultado sugere que a cetamina não interfere nos canais para cálcio sensíveis a voltagem.

Tabela 4 – Concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal mediante estímulo com cetamina e KCl. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	KCl 30mM	KCl+cetamina 1 μM	KCl+cetamina 30 μM	KCl+cetamina 500 μM
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	46,9 \pm 4,81	258,0 \pm 20,13	310 \pm 29,82	253,5 \pm 34,42	220,5 \pm 23,93

A



B

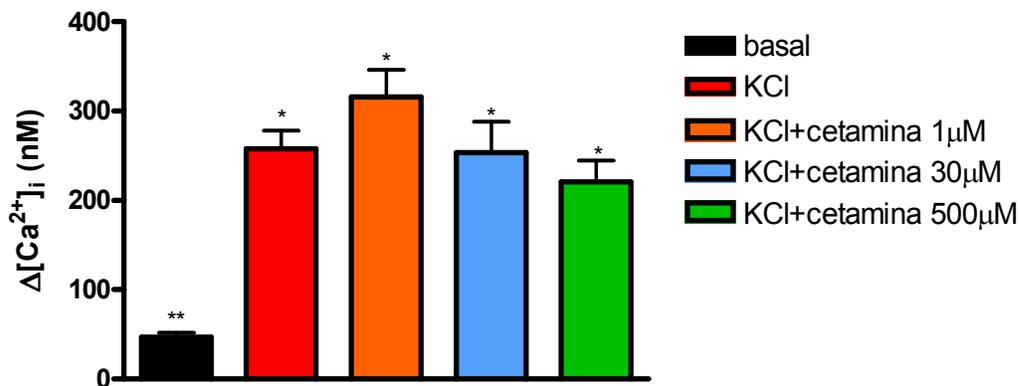


Figura 9 – Efeito da cetamina no aumento do Ca^{2+} intrasinaptosomal evocado por KCl 30 mM. Os sinaptosomas de córtex cerebral foram incubados com Fura2-AM (excitação 340/380nm e emissão em 510nm). Cetamina 1 μM , 30 μM e 500 μM foram adicionados a suspensão sinaptosomal (A). (A) mostra as curvas de concentração interna de cálcio mediante aplicação de KCl após o tratamento de 15 min com cetamina nas concentrações estudadas. (B) mostra em barras a variação da fluorescência mediante os estímulos indicados pela legenda. (*) $p < 0,05$ em relação ao basal. (**) $p < 0,05$ em relação ao KCl. As barras e as curvas correspondem às médias de pelo menos três experimentos independentes.

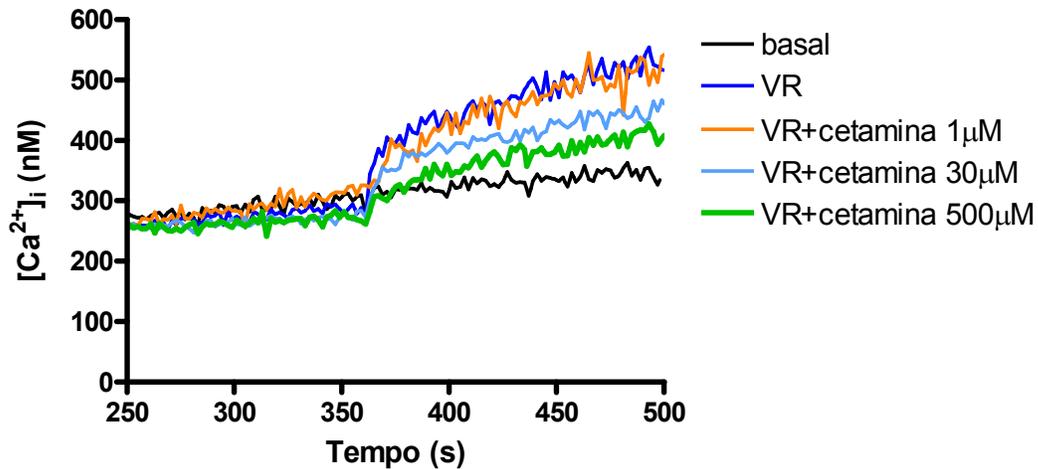
4.4 Efeito da cetamina na $[Ca^{2+}]_i$ evocada por veratridina 10 μM

A veratridina induz a despolarização pelo aumento do influxo de Na^+ através da membrana sinaptosomal. Esta despolarização leva a abertura dos canais para cálcio e o conseqüente aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Ulbricht, 1998). Uma vez que foi observado que a cetamina (500 μM) inibiu o aumento dos níveis de Na^+ induzido por veratridina, nós investigamos se este agente interfere no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada por veratridina 10 μM . Os sinaptosomas foram incubados com FURA2-AM durante uma hora. Nos últimos 15 min foram tratados com as concentrações de cetamina em estudo. A veratridina aumentou a $[Ca^{2+}]_i$ e este efeito não foi bloqueado significativamente pela cetamina nas concentrações de 1 μM e 30 μM (Tabela 5, figura 10 A e B). Entretanto, a concentração supra-anestésica de cetamina (500 μM) inibiu significativamente o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada por veratridina 10 μM (figura 10 A e B). Esses resultados sugerem que doses supra-anestésicas da cetamina interferem com o aumento da concentração intracelular de Na^+ e de Ca^{2+} induzidos pela despolarização com veratridina. Entretanto, conforme observado, este efeito pré-sináptico do anestésico ocorreu apenas em dose supra-anestésicos deste agente.

Tabela 5 – Efeito da cetamina na concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal mediante estímulo com veratridina. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	VR 10 μM	VR+cetamina 1 μM	VR+cetamina 30 μM	VR+cetamina 500 μM
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	46,77 \pm 4,46	232,8 \pm 21,8	194,5 \pm 14,0	184,7 \pm 8,21	150,5 \pm 14,47

A



B

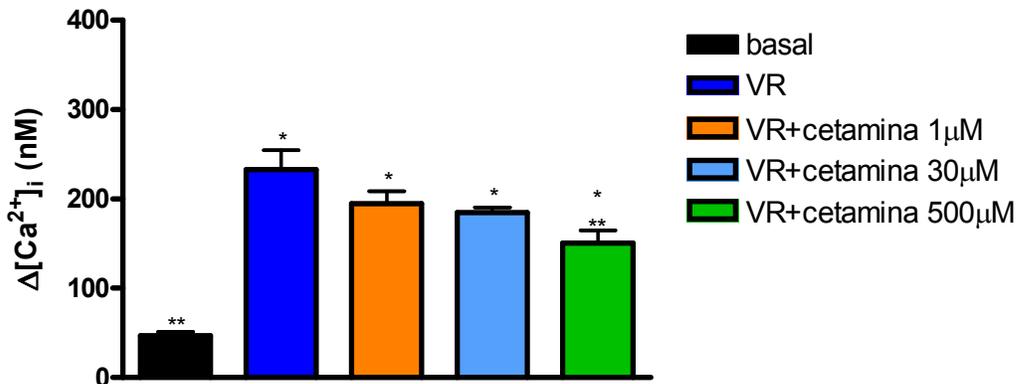


Figura 10 – Efeito da cetamina no aumento de Ca^{2+} intrasinaptosomal evocado por VR 10 μM . Os sinaptosomas de córtex cerebral foram incubados com Fura2-AM (excitação 340/380nm e emissão em 510nm). Cetamina 1 μM , 30 μM e 500 μM foram adicionados a suspensão sinaptosomal. (A) mostra as curvas de concentração interna de cálcio mediante aplicação de VR na presença de cetamina nas concentrações estudadas. (B) mostra em barras a variação da fluorescência mediante os estímulos indicados pela legenda. (*) $p < 0,05$ em relação ao basal. (**) $p < 0,05$ em relação à VR. As barras e as curvas correspondem às médias de pelo menos três experimentos independentes.

4.5 Efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas

A entrada de Ca^{2+} através de canais para cálcio voltagem dependente engatilha a fusão de vesículas sinápticas contendo neurotransmissores nas zonas ativas. Os resultados anteriores demonstraram que a cetamina interfere em dois eventos antecedentes à exocitose, ou seja, o aumento de Na^+ e Ca^{2+} interno evocado pela veratridina. Assim, nós investigamos os efeitos da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas em sinaptosomas de córtex de ratos. Primeiramente, avaliamos o efeito da cetamina na exocitose espontânea.

Providos da preparação sinaptosomal e método de liberação da sonda fluorescente FM2-10 com o objetivo de monitoração da exocitose de vesículas sinápticas, observou-se que a adição de KCl (30 mM) causou queda significativa do sinal de fluorescência (figura 11 A). A adição de KRH por sua vez, causou redução da fluorescência menor que o KCl, sugerindo que a queda de fluorescência era dependente do estímulo despolarizante (figura 11 A). A administração de cetamina 1 μM , 30 μM ou 500 μM não alterou significativamente a queda de fluorescência em relação ao basal, sugerindo que a cetamina não evoca exocitose de vesículas sinápticas nas concentrações estudadas (figuras 11 A e B, tabela 6).

Tabela 6 – Exocitose em sinaptosomas cérebro-corticais estimulados com cetamina. Os resultados representam a média±EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	cetamina 1 μM	cetamina 30 μM	cetamina 500 μM
$\Delta=F_0-F$	0,21±0,009	0,25±0,004	0,26±0,007	0,26±0,002

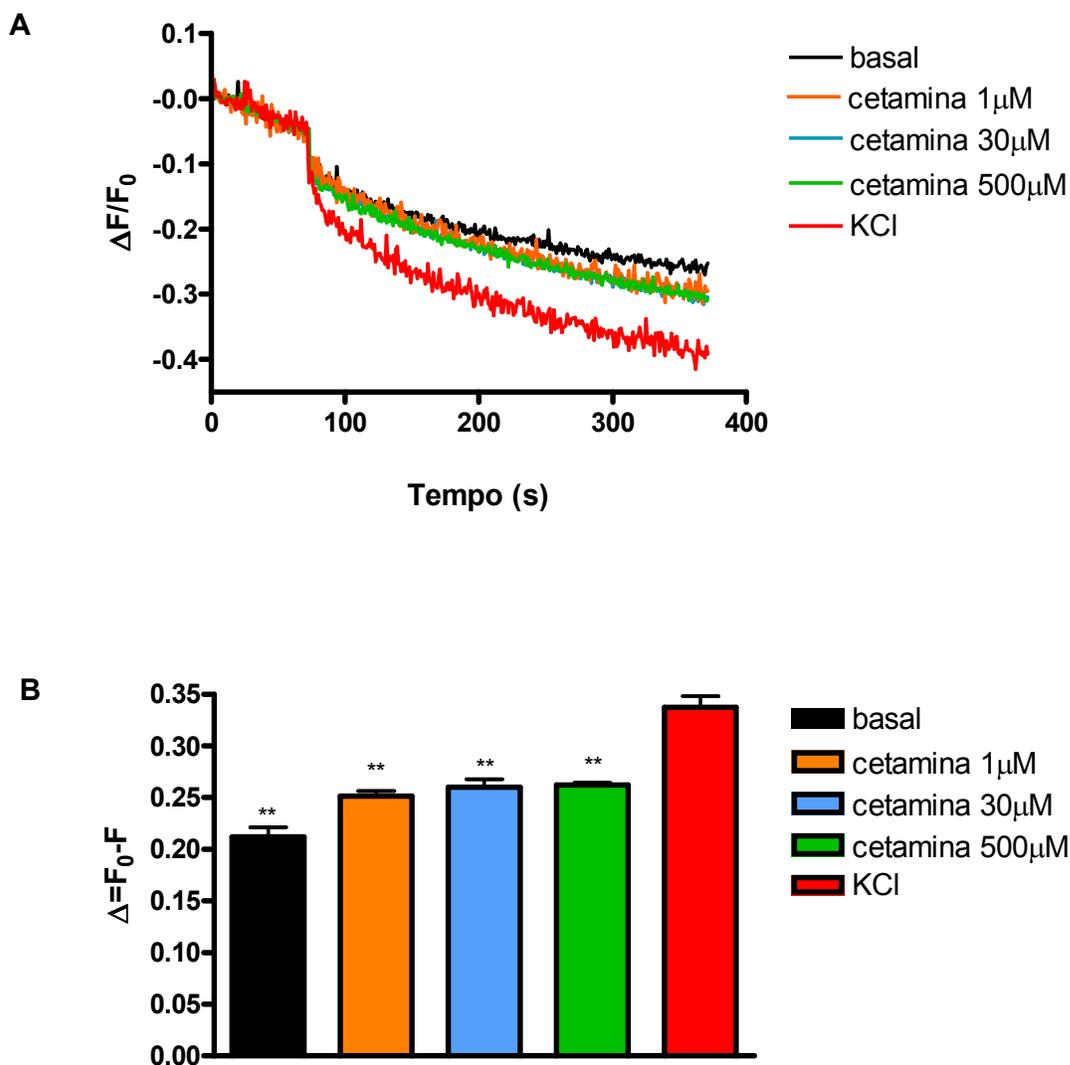


Figura 11 - Cetamina não evoca a exocitose de vesículas sinápticas. (A) Sinaptosomas cérebro-corticais foram incubados na presença de FM2-10 (50 μM) e Ca^{2+} (5mM), despolarizados com KCl (30 mM), lavados em meio livre de FM2-10, mantidos em banho 37°C por 15 minutos e transferidos para cubeta de fluorímetro para medidas de fluorescência (materiais e métodos). A liberação de FM2-10 foi monitorada após adição de cetamina nas concentrações de 1 μM , 30 μM ou 500 μM ou de meio KRH à suspensão de sinaptosomas, contendo cálcio 1,3 mM (B). Gráficos representativos de no mínimo 3 experimentos independentes. $\Delta F/F_0$, fluorescência normalizada.

4.6 Efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas evocadas por KCl

Os resultados descritos anteriormente não mostraram efeito da cetamina no aumento da concentração intracelular de Na^+ e Ca^{2+} evocada pelo KCl em sinaptosomas. Entretanto, mesmo com estes resultados, a cetamina poderia interferir na exocitose de vesículas evocada por KCl 30 mM.

Os sinaptosomas foram marcados com FM2-10 e tratados com cetamina 1, 30 e 500 μM durante 15 min. Após 200 s de estabilização da leitura de fluorescência foi adicionado KCl 30 mM na presença de cálcio 1,3 mM e cetamina nas concentrações acima.

Analisando as figuras 12 A e B e tabela 7 observa-se que nenhuma das concentrações de cetamina diminuiu a exocitose evocada por KCl 30 mM . Esses resultados apontam que a cetamina assim como observado com a concentração intracelular de Na^+ e Ca^{2+} , não interfere com a exocitose de vesículas mediante estímulo despolarizante dependente de canais para cálcio.

Tabela 7 – Exocitose de vesículas sinápticas evocada por KCl 30 mM na presença de cetamina. Os resultados representam a média±EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	KCl 30 mM	KCl+cetamina 1 μ M	KCl+cetamina 30 μ M	KCl+cetamina 500 μ M
$\Delta F/F_0$	0,22±0,005	0,34±0,010	0,32±0,002	0,32±0,016	0,31±0,011

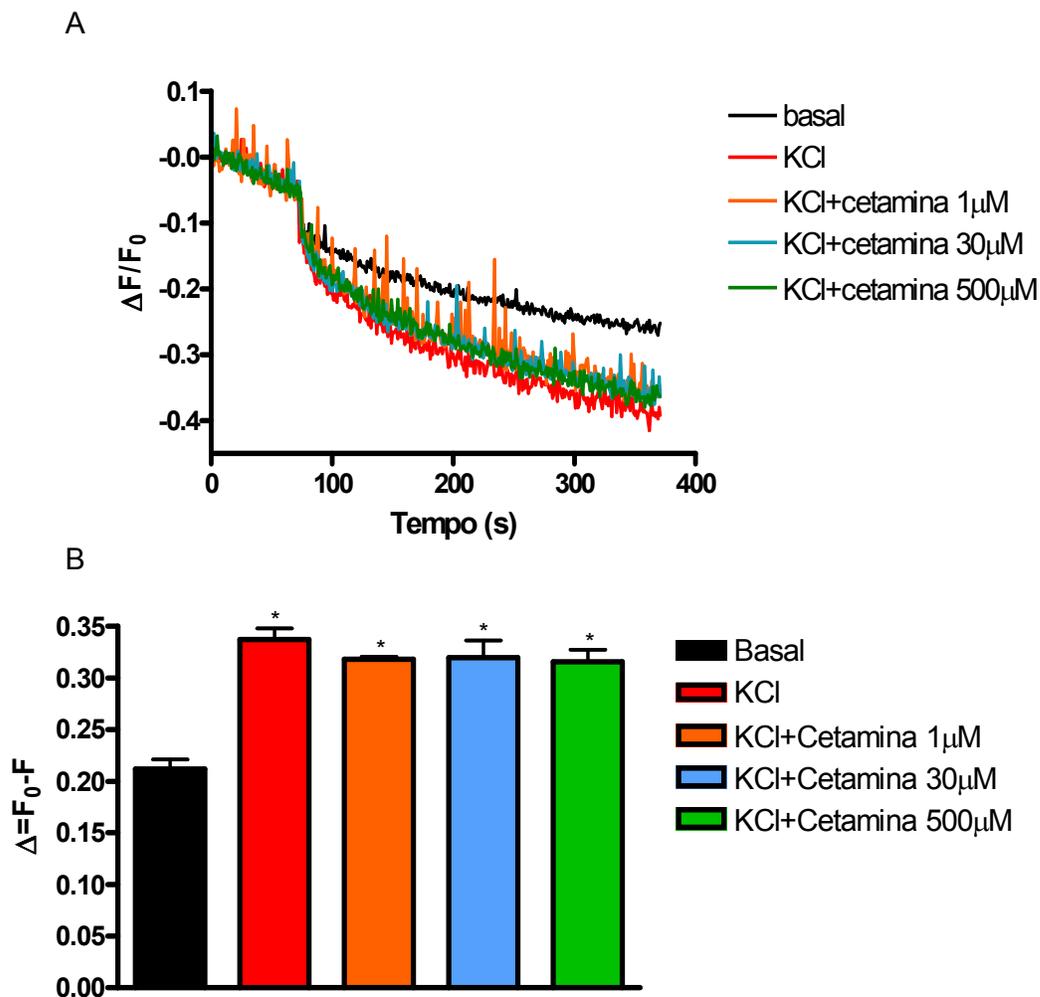


Figura 12: Cetamina não inibe exocitose evocada por KCl 30 mM. (A) Sinaptosomas cérebro-corticais foram incubados na presença de FM2-10 (50 μ M) e Ca^{2+} (5 mM), despolarizados com KCl (30 mM), lavados em meio livre de FM2-10. Em seguida os mesmos foram incubados em banho 37°C por 15 minutos com cetamina 1 μ M, 30 μ M ou 500 μ M e transferidos para cubeta de fluorímetro para medidas de fluorescência (materiais e métodos). A liberação de FM2-10 foi monitorada após adição de KCl 30 mM ou de meio KRH à suspensão de sinaptosomas, contendo cálcio 1,3 mM (B). Gráficos representativos de no mínimo 3 experimentos independentes. $\Delta F/F_0$, fluorescência normalizada.

4.7 Efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas evocadas por veratridina 10 μM

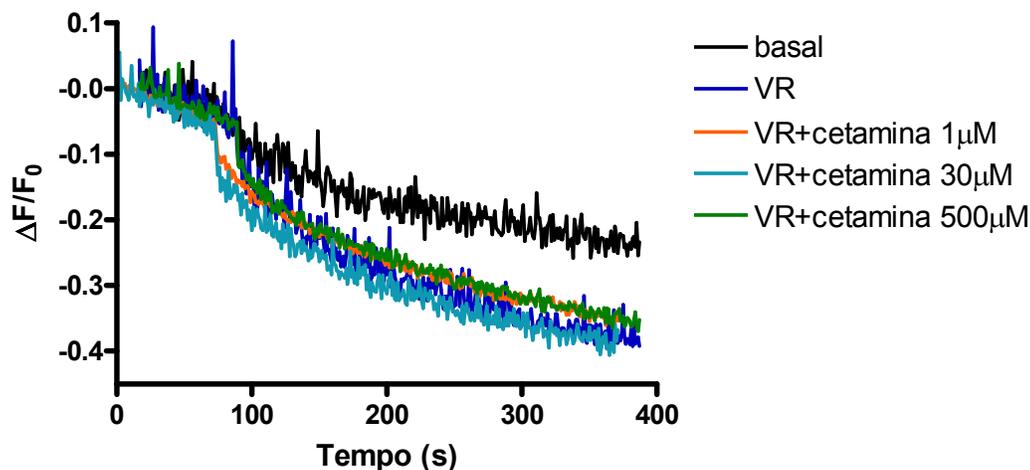
Os resultados anteriores demonstraram que a cetamina interfere em dois eventos antecedentes à exocitose, ou seja, o aumento de Na^+ e Ca^{2+} interno evocado pela veratridina. Assim, realizamos experimentos para investigar se a cetamina interfere também na exocitose de vesículas sinápticas evocada por veratridina. Neste experimento, a exocitose de vesículas da preparação sinaptosomal induzida pela veratridina 10 μM foi realizada após 15 minutos de incubação na presença ou ausência do anestésico.

Como se pode observar, a aplicação de veratridina 10 μM induziu um decaimento no sinal de fluorescência indicativo da ocorrência de exocitose de vesículas sinápticas (figura 13 A). Concentrações de 1 e 30 μM de cetamina não alteraram a fluorescência indicativa de exocitose. Por outro lado, cetamina na concentração de 500 μM inibiu a exocitose evocada por veratridina ($p= 0,003$ em relação à VR) (figura 13 B). Portanto, os dados com cetamina 500 μM demonstram que este agente interfere com eventos pré-sinápticos envolvidos com a liberação de neurotransmissores.

Tabela 8 – Exocitose evocada por veratridina 10 μM na presença de cetamina. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	VR 10 μM	VR+cetamina 1 μM	VR+cetamina 30 μM	VR+cetamina 500 μM
$\Delta F/F_0$	0,21 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01

A



B

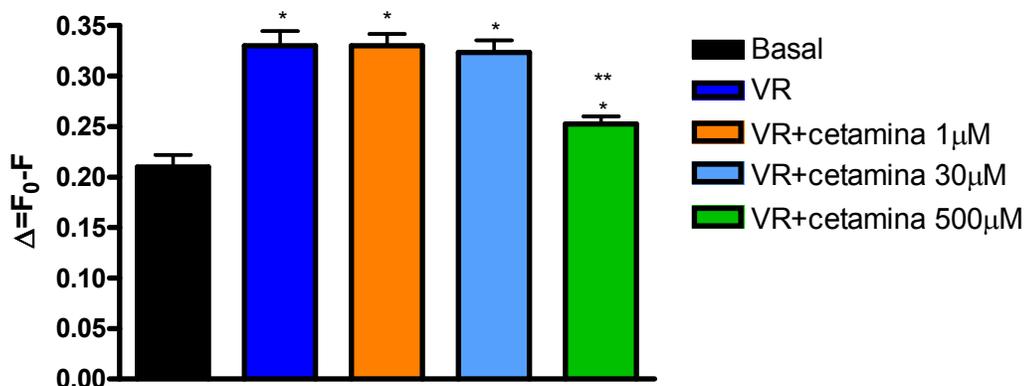


Figura 13 - Cetamina 500 μM inibe a exocitose de vesículas sinápticas evocadas por veratridina 10 μM . (A) Sinaptosomas cérebro-corticais foram incubados na presença de FM2-10 (50 μM) e Ca^{2+} (5 mM), despolarizados com KCl (30 mM), lavados em meio livre da sonda. Em seguida, foram incubados em banho a 37°C por 15 minutos com cetamina 1 μM , 30 μM ou 500 μM e, transferidos para cubeta de fluorímetro para medidas de fluorescência (materiais e métodos). A liberação de FM2-10 foi monitorada após adição de VR 10 μM ou de meio KRH à suspensão de sinaptosomas, contendo cálcio 1,3 mM (B). Gráficos representativos de no mínimo 3 experimentos independentes. $\Delta F/F_0$, fluorescência normalizada. (*) $p < 0,05$ em relação ao basal. (**) $p < 0,05$ em relação à VR.

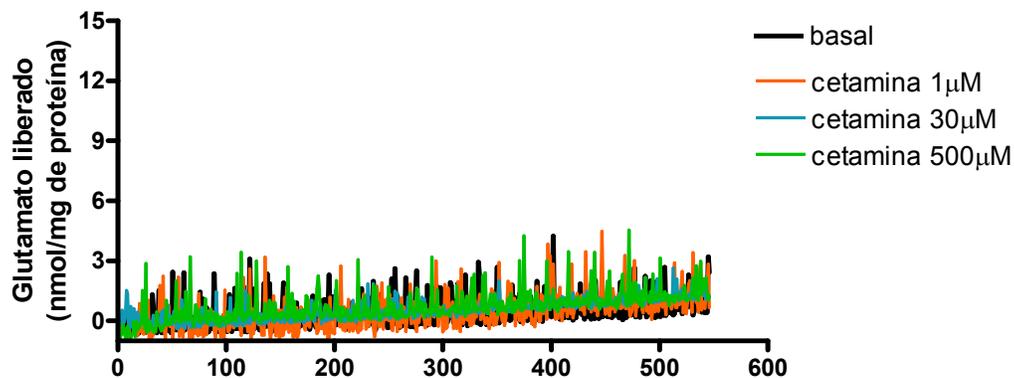
4.8 Efeito da cetamina na liberação espontânea de glutamato

A depressão da atividade neuronal pelos anestésicos gerais envolve a inibição da neurotransmissão excitatória glutamatérgica e, aumento da inibição da neurotransmissão gabaérgica (Hemmings e cols., 2005a). A neurotransmissão glutamatérgica pode ser comprometida pela modulação de alvos pré e/ou pós-sinápticos. Nossos dados demonstraram que a cetamina, em concentrações supra-anestésicas, interfere em eventos pré-sinápticos que estão estreitamente relacionados à liberação de neurotransmissores. Assim, nesta série de experimentos investigamos o efeito deste anestésico na liberação de glutamato. Inicialmente, foram realizados experimentos investigando o efeito da cetamina na liberação espontânea de glutamato. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de cetamina nas doses 1 μM , 30 μM e 500 μM não interferiu com a liberação de glutamato em relação à liberação basal (Tabela 9; figura 14 A e B).

Tabela 9 – Efeito da cetamina na liberação de glutamato. Os resultados representam a média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes.

	Basal	cetamina 1 μ M	cetamina 30 μ M	cetamina 500 μ M
Glutamato liberado (nmol/mg de proteína)	0,92±0,13	1,25±0,08	1,27±0,18	1,44±0,93

A



B

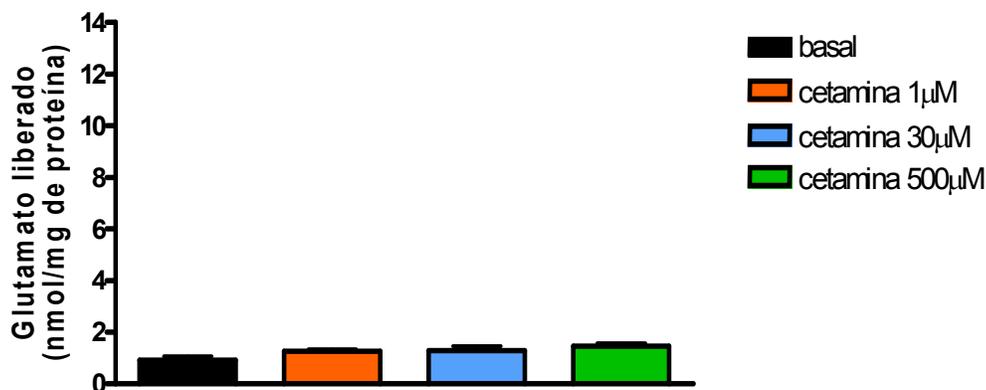


Figura 14 – Cetamina não produz alteração na liberação basal de glutamato. Os sinaptosomas foram pré-incubados a 35°C por uma hora, em meio KRH sem cálcio. A liberação de glutamato foi determinada pela fluorescência do NADPH após a adição de CaCl_2 (concentração final 1 mM), NADP^+ (concentração final 1 mM) e glutamato desidrogenase (50 U) à suspensão sinaptosomal. (A) mostra a liberação de glutamato durante o curso temporal do experimento. (B) mostra em barras a liberação de glutamato após o estímulo. Os resultados expressam as médias e erro padrão de pelo menos três experimentos independentes.

4.9 Efeito da cetamina na liberação de glutamato evocada por KCl 30 mM e veratridina 10 μ M

A cetamina não interferiu com a liberação espontânea de glutamato. Entretanto, este agente anestésico poderia interferir com a liberação evocada de glutamato. Assim, nesta série de experimentos avaliamos o efeito da cetamina na liberação evocada deste neurotransmissor. Os sinaptosomas de córtex cerebral de rato foram incubados durante 1 hora a 35°C, centrifugados e ressuspendidos em KRH sem cálcio. Nos últimos 15 min de incubação a solução sinaptosomal foi tratada com cetamina 1, 30 e 500 μ M. A suspensão foi transferida para um cubeta de plástico descartável e levada ao espectrofluorímetro. A despolarização foi estimulada com KCl 30 mM e veratridina 10 μ M após 200s de leitura.

A tabela 10 e figuras 15 A e B mostram que o estímulo induzido por KCl 30 mM provocou liberação de glutamato equivalente a $10,99 \pm 0,80$ nmol de glutamato/mg de proteína. Entretanto, as concentrações estudadas de cetamina não alteraram a liberação de glutamato evocada pelo estímulo despolarizante dependente de canais para cálcio (Tabela 10 e figuras 15 A e B). Este dado, juntamente com os demais relacionados ao KCl demonstram a ausência de sensibilidade dos canais para cálcio para cetamina, uma vez que a liberação de glutamato evocada por KCl envolve exclusivamente estes canais.

A despolarização induzida por veratridina 10 μ M foi capaz de induzir liberação de glutamato equivalente a $11,35 \pm 0,56$ nmol de glutamato/mg de proteína (figura 16 A, tabela 11). Essa liberação foi inibida em aproximadamente 54% na presença de cetamina (500 μ M). As demais concentrações de cetamina (1 μ M e 30 μ M) não alteraram a liberação evocada do neurotransmissor (figura 16 B). O aumento da liberação de glutamato induzido pela veratridina foi inibido em aproximadamente 79% na presença da TTX (1 μ M), um inibidor de canais para sódio (figura 16 B). Este efeito da TTX não foi aditivo com o da cetamina 500 μ M (figura 16 B). Os resultados do presente estudo sugerem que a cetamina, em concentrações supra-anestésicas, diminui, através de efeitos pré-sinápticos (concentração de Na^+ e Ca^{2+} intracelular, exocitose de vesículas) a despolarização induzida pela veratridina e a conseqüente liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos.

Tabela 10 – Liberação de glutamato evocada por KCl 30 mM na presença de cetamina. Os resultados representam a média±EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	KCl 30 mM	KCl+cetamina 1 μ M	KCl+cetamina 30 μ M	KCl+cetamina 500 μ M
Glutamato liberado (nmol/mg de proteína)	1,56±0,15	10,99±0,80	11,30±0,79	1,56±1,19	9,93±0,25

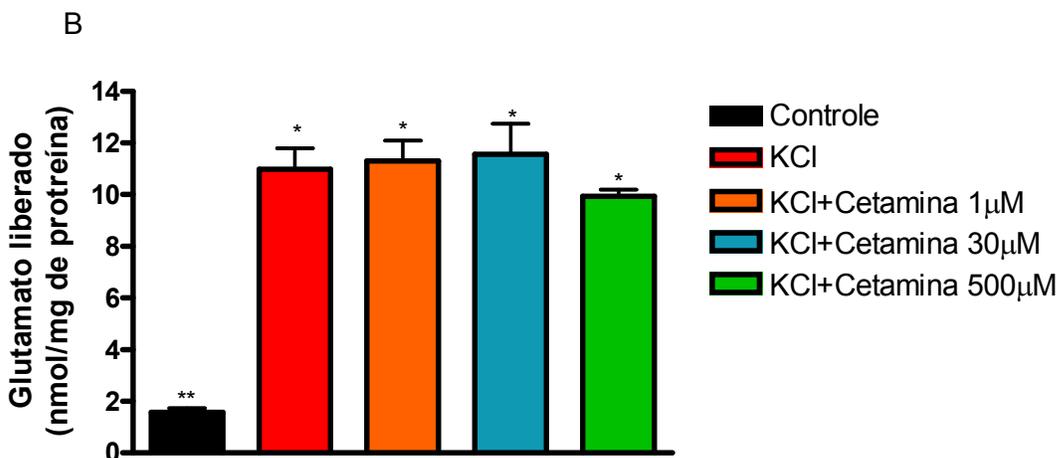
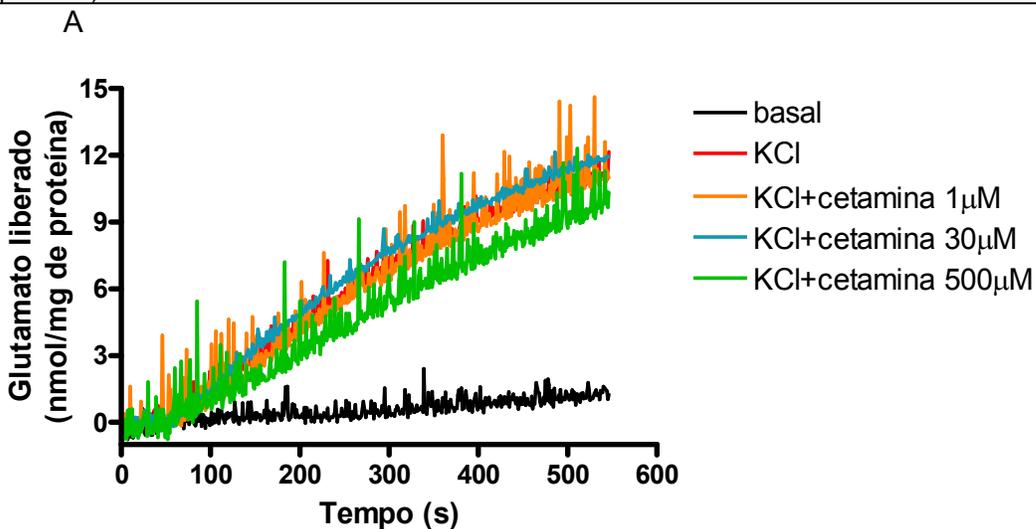


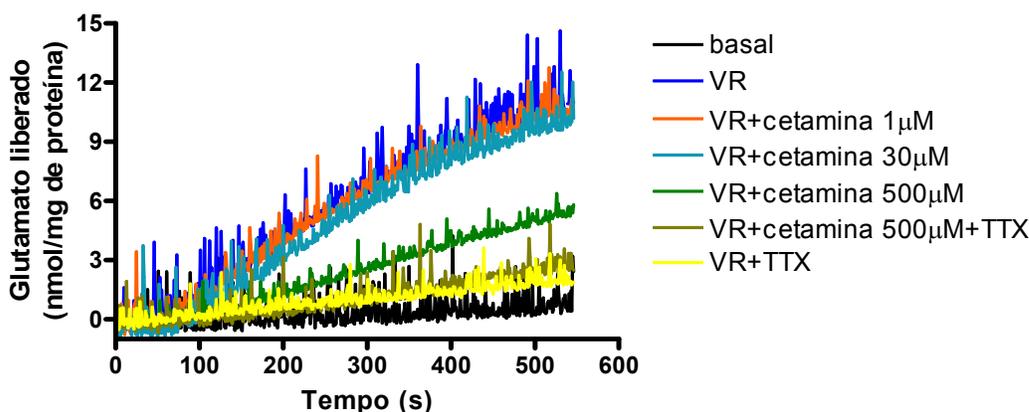
Figura 15 – Cetamina não inibe a liberação de glutamato evocada por KCl 30 mM. Os sinaptosomas foram pré-incubados a 35°C por uma hora, em meio KRH sem cálcio e nos últimos 15 minutos de incubação foi acrescentado cetamina 1 μ M, 30 μ M e 500 μ M. Os sinaptosomas foram despolarizados com KCl 30 mM. A liberação de glutamato foi determinada pela fluorescência do NADPH após a adição de CaCl_2 (concentração final 1mM), NADP^+ (concentração final 1 mM) e glutamato desidrogenase (50 U) à suspensão sinaptosomal (A). (B) as barras mostram as médias de pelo menos três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ em relação à situação basal. (**) $p < 0,05$ em relação ao KCl.

Tabela 11 – Efeito da cetamina na liberação de glutamato evocada por veratridina 10 μM . Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos.

	Basal	VR 10 μM	VR+cetamina 1 μM	VR+cetamina 30 μM	VR+cetamina 500 μM
Glutamato liberado (nmol/mg de proteína)	1,02 \pm 0,16	1,35 \pm 0,56	10,75 \pm 0,54	10,08 \pm 1,19	5,21 \pm 0,24

	VR 10 μM +TTX	VR+cetamina 500 μM +TTX
Glutamato liberado (nmol/mg de proteína)	2,31 \pm 0,08	2,16 \pm 1,52

A



B

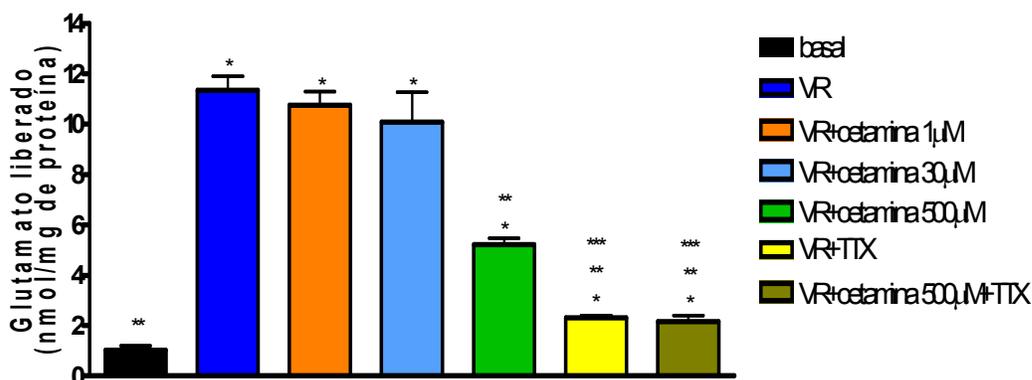


Figura 16 – Cetamina 500 μM inibe a liberação de glutamato evocada por VR 10 μM . Os sinaptosomas foram pré-incubados a 35°C por uma hora, em meio KRH sem cálcio e nos últimos 15 min de incubação foi acrescentado cetamina 1 μM , 30 μM e 500 μM . Os sinaptosomas foram despolarizados com veratridina 10 μM . A liberação de glutamato foi determinada pela fluorescência do NADPH após a adição de CaCl_2 (concentração final 1mM), NADP^+ (concentração final 1mM) e glutamato desidrogenase (50 U) à suspensão sinaptosomal (A). (B) Os resultados mostram as médias de pelo menos três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ em relação à situação basal, (**) $p < 0,05$ em relação à VR, (***) $p < 0,05$ em relação à veratridina +Cetamina 500 μM .

5 Discussão

Os anestésicos gerais apresentam potentes efeitos na transmissão sináptica. Estes efeitos podem ser pré e/ou pós-sinápticos. No terminal pré-sináptico, esses agentes podem alterar a liberação de neurotransmissores e na região pós-sináptica podem modular as respostas aos neurotransmissores (Pashkov e Hemmings, 2002). O mecanismo pelo qual os anestésicos atuam ainda não se encontra bem elucidado. Estudos eletrofisiológicos demonstram que a transmissão sináptica é mais sensível aos efeitos dos anestésicos gerais que a condução axonal (Larrabee e Posternak, 1952). A maioria dos estudos dos efeitos sinápticos dos anestésicos tem focado o sítio pós-sináptico de ação dos mesmos. Desta forma, os efeitos pré - sinápticos ainda não foram bem caracterizados.

A preparação sinaptosomal contém terminais nervosos capazes de estocar e liberar neurotransmissores. É largamente usada como modelo para análise pré-sináptica dos efeitos de várias drogas. Ao contrário das fatias cerebrais ou neurônios *in situ*, os sinaptosomas estão livres da influência de elementos de corpos celulares neuronais e gliais, como também de possíveis interações intercelulares (Dunkley e cols., 1986). Assim, no presente trabalho nós investigamos os efeitos pré-sinápticos do anestésico cetamina em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos. Os alvos pré-sinápticos avaliados foram os níveis de Na^+ interno, a concentração interna de Ca^{2+} , a exocitose de vesículas sinápticas e a liberação de glutamato. As concentrações escolhidas de cetamina basearam-se nas concentrações clinicamente relevantes deste agente que variam de 5 a 30 μM (Pashkov e Hemmings, 2002). Assim, utilizamos concentrações sub-anestésicas (1 μM), anestésicas (30 μM) e supra-anestésicas (500 μM). Esta última foi baseada em resultados descritos por Erecinska e cols. (1988) nos quais o bloqueio de efluxo de glutamato evocado por KCl somente ocorreu com concentrações de cetamina acima de 500 μM . Entretanto, é importante mencionar que embora as concentrações clinicamente relevantes de anestésicos sejam importantes para examinar as respostas integradas no animal intacto ou em humanos, a relevância em estudos *in vitro* deve ser cautelosa porque ainda não se compreende como estes sistemas se integram no modelo de anestesia (Eckenhoff e Johansson, 1999).

A neurotransmissão ocorre após a propagação do potencial de ação ao longo dos axônios e o canal para o sódio é fundamental para que a mesma ocorra. Inicialmente,

investigamos os níveis de Na^+ interno sinaptosomal na presença de cetamina nas concentrações de 1, 30 e 500 μM . Chamamos de “níveis” de sódio interno, uma vez que não foi medida a concentração molar de Na^+ (como nos experimentos de cálcio), O aumento da fluorescência da sonda indica que houve aumento de sódio interno, dessa forma analisamos a fluorescência. As concentrações de cetamina não alteraram os níveis basais intracelulares de Na^+ . Resultados contrários foram observados com outro anestésico venoso, o propofol. Este anestésico, em concentrações entre 5-10 μM aumentou levemente a concentração interna de sódio em sinaptosomas cérebro-corticais (Ratnakumari e Hemmings, 1997). Posteriormente, foi investigado o efeito da cetamina quando da presença de veratridina, um estímulo despolarizante dependente de canais para sódio. Concentrações sub e anestésicas de cetamina não alteraram o aumento de Na^+ interno obtido com a veratridina. Entretanto, a concentração de 500 μM de cetamina apresentou um acentuado bloqueio do aumento dos níveis de Na^+ interno sinaptosomal evocado por veratridina 10 μM (figura 7). Este aumento do Na^+ interno evocado por veratridina foi completamente abolido por TTX demonstrando que a elevação da concentração de Na^+ interno evocada pela veratridina ocorre via canais para sódio sensíveis a voltagem que são sensíveis a cetamina em altas concentrações. O efeito inibitório apresentado pela cetamina em nosso modelo experimental talvez possa ser explicado por sua ação no bloqueio de canais para sódio sensíveis a voltagem na forma ativada ou inativada de forma reversível (Haeseler e cols., 2003; Reckiegel e cols., 2002; Irnaten e cols., 2002). Não foram realizados experimentos utilizando KCl como estímulo, pq a despolarização induzida por este agente independe de canais para sódio. Foi demonstrado que outros anestésicos também são capazes de atuar na dinâmica do Na^+ . De fato, Ratnakumari e cols. (1998) demonstraram, em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos que o anestésico inalatório halotano interage com canais para sódios pré-sinápticos e inibe o aumento da $[\text{Na}^+]_i$ evocado por veratridina 60 μM de maneira dose dependente com IC_{50} de 0.97mM. O anestésico venoso propofol inibiu o aumento da concentração interna de Na^+ sinaptosomal evocado por veratridina com CI_{50} de 13 μM (Ratnakumari e Hemmings, 1997). Em estudo eletrofisiológico, propofol e isoflurano inibiram canais para sódio dependente de voltagem em terminais nervosos de ratos isolados (Ouyang e cols., 2003).

Durante o potencial de ação, a abertura dos canais para sódio leva à despolarização da membrana que por sua vez induz à abertura de canais para cálcio

voltagem dependente com conseqüente aumento da concentração intracelular deste íon. Uma vez que nossos dados mostraram que o influxo de Na^+ foi alterado pelo anestésico, nós avaliamos a possível interferência deste anestésico na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Em terminais nervosos, coexistem múltiplos tipos de canais para cálcio, os quais regulam não só a entrada de Ca^{2+} no terminal, mas também a exocitose de vesículas sinápticas. Os canais do tipo P/Q são os de maior importância para a liberação de neurotransmissores nos terminais centrais (Takahashi e Momiyama, 1993; Guatimosim e cols., 1997). E os canais para cálcio do tipo Q e L apresentam maior participação no aumento do cálcio interno induzido por veratridina (Bicalho, 1999).

A despolarização induzida pela veratridina leva a um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diferente do observado pelo estímulo com KCl. O KCl evoca um rápido aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Romano-Silva e cols., 1994) diferentemente da veratridina que demonstra um efeito mais lento (Bicalho 1999; Adam-Vizi e Ashley, 1987). Além disso, a veratridina contaria com um auxílio extra da reversão do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para auxiliar no aumento do Ca^{2+} interno (Nachshen, 1985; DiPolo e Beaugé, 1986). Embora o trocador pudesse ser um possível alvo para investigação, esta não seria já que há controvérsias na literatura sobre sua participação no processo de neurotransmissão e as ferramentas farmacológicas para seu estudo não apresentam alta especificidade.

Nossos dados demonstraram que a cetamina, nas concentrações estudadas, não interferiu com a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal como também, não interferiu no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzida pelo KCl. Por outro lado, a cetamina 500 μM diminuiu significativamente o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocado pela veratridina. Esses resultados nos sugerem que o aumento do cálcio observado depende da despolarização sinaptosomal evocada através do canal para sódio. Uma vez que a Cetamina 500 μM bloqueou o canal o canal para sódio, o aumento $[\text{Ca}^{2+}]_i$ não foi observado. Ou seja, ação da Cetamina não ocorre em canais para os íons cálcio, já que não observamos efeito com a estimulação com KCl.

Sabe-se que o halotano é capaz de diminuir o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocada por 4-AP em sinaptosomas e este efeito é marcadamente menor quando usado a estimulação com KCl (Schlame e Hemmings, 1995). Estudo com ligante de canais para cálcio do tipo L demonstrou que a cetamina inibiu este ligante com uma Cl_{50} de 3030 μM (Hemmings e Lingamaneni, 2003). Outro trabalho demonstra o bloqueio de corrente de canais para cálcio do tipo L pela cetamina em concentrações entre 10^{-5} – 10^{-3}M em miócitos de coração de rãs (Hatakeyama e cols., 2001). Entretanto, torna-se difícil comparar nossos

dados com a literatura, uma vez que alguns estudos avaliaram os efeitos pós-sinápticos da cetamina em canais para cálcio (Takara e cols., 1986; Weber e cols., 2005). Poder-se-ia também questionar a atuação da cetamina nos canais para cálcio do tipo Q e L. Entretanto, este não parece ser o caso uma vez que não foram observados efeitos com o estímulo despolarizante provocado por KCl.

No curso dos eventos que procedem à liberação do neurotransmissor, temos a exocitose das vesículas sinápticas. Este evento é dependente do influxo de Ca^{2+} extrasinaptosomal. Assim, investigou-se a exocitose de vesículas sinápticas na presença de cetamina utilizando o marcador fluorescente FM2-10. Medidas do decaimento de corantes FM's fornecem uma boa indicação da liberação de transmissores em sinaptosomas. Estudos semelhantes utilizaram outra sonda da família dos FM's (FM1-43) e também validam esse método como uma forma de obter medidas da secreção exocitótica em tempo real (Betz e cols., 1992; Meffert e cols., 1994; Guatimosim e cols., 1997). Durante a administração de cetamina 1 μ M, 30 μ M e 500 μ M, não se observou alteração significativa na queda de fluorescência em relação à exocitose basal sugerindo que a cetamina não evoca exocitose de vesículas sinápticas nas concentrações estudadas. Investigou-se, posteriormente, o efeito da cetamina na exocitose evocada por KCl 30mM e veratridina 10 μ M. Como previamente descrito por Marks e Mahon (1998) e por De Castro Jr e cols., 2008, nossos dados demonstraram que o KCl é capaz de induzir a queda de fluorescência em sinaptosomas indicando exocitose de vesículas sinápticas. Este efeito não foi inibido pelas concentrações estudadas de cetamina (figura 12 A e B) sugerindo que o anestésico não influencia canais para cálcio sensíveis a voltagem relacionados à exocitose evocada por KCl 30 mM. É a primeira vez que o efeito da cetamina na exocitose de vesículas sinápticas em córtex é avaliado com uso de marcador para exocitose. Utilizando-se outro corante da mesma família dos FM's, o FM1-43, Hemmings e cols (2005) observaram que o isoflurano 0,84mM diminui a exocitose em células de hipocampo com estímulo elétrico, concentração esta de anestésico 2,0 vezes maior do que as utilizadas na clínica. Por outro lado, a exocitose de vesículas sinápticas induzida pela despolarização com veratridina foi bloqueada na presença de cetamina 500 μ M, sugerindo que este anestésico diminui a exocitose de vesículas dependente de estímulo para canais para sódio. Estes dados corroboram com os anteriores apresentados levando nos a propor a ação do anestésico no canal para sódio.

A inibição pela cetamina da exocitose de vesículas sinápticas induzida pela

veratridina sugere que este anestésico poderia interferir com liberação de neurotransmissores que estão contidos em vesículas presentes do terminal pré-sináptico. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e o mais abundante no SNC de mamíferos (Nicholls, 1993). Além disso, a inibição da liberação deste neurotransmissor é consistente com a depressão neuronal característica da ação anestésica. Assim, investigamos o efeito da cetamina na liberação pré-sináptica de glutamato. Observou-se que a adição de cetamina nas doses 1 μ M, 30 μ M e 500 μ M não interferiu com a liberação basal de glutamato (figura 14). Posteriormente, investigamos o efeito do anestésico na liberação de glutamato evocada por despolarização com KCl 30 mM e veratridina 10 μ M. A despolarização com KCl evocou uma liberação expressiva de glutamato (figura 15) efeito este não inibido pela cetamina nas concentrações estudadas. Este resultado corrobora os demais resultados relacionados aos efeitos da cetamina na despolarização induzida pelo KCl indicando a ausência de sensibilidade dos canais para cálcio à cetamina uma vez que a liberação de glutamato evocada por KCl envolve, principalmente, canais para cálcio.

Cetamina 20 μ M também não interferiu com a liberação de neuropeptídios evocada por KCl 30 mM (Pashkov e cols., 2002). Este mesmo resultado foi observado utilizando-se o propofol. Assim, a liberação de glutamato evocada por KCl não foi afetada de forma estatisticamente significativa por doses de até 100 μ M de propofol, dose esta acima da utilizada na clínica (Ratnakumari e Hemmings, 1997). Da mesma forma, o bloqueio da liberação de aminoácidos induzida pelo KCl só ocorreu em doses de cetamina maiores que 500 μ M (Erecinska e cols., 1988). Trabalhos prévios demonstraram que a cetamina 5-30 μ M não interferiu na liberação basal de norepinefrina, nem em neuropeptídios utilizando-se o mesmo modelo experimental (Pashkov e Hemmings, 2002; Pashkov e cols., 2002). A liberação basal de GABA ou estimulada por KCl 40mM não é alterada na presença de cetamina (1-100 μ M) em fatias de córtex de ratos (Minchin, 1981) e, em fatias de tálamo (Kendall e Minchin, 1982). Da mesma forma 1 mM de cetamina também não evocou a liberação espontânea de GABA em sinaptosomas de estriado (Mantz e cols., 1995). Comparando os efeitos da cetamina com outro anestésico intravenoso, o propofol, observou-se que este aumentou liberação basal de noradrenalina de maneira dose dependente sendo que a concentração máxima testada foi 40 μ M, concentração esta acima da utilizada na clínica (Pashkov e Hemmings, 2002). Por outro lado, os anestésicos voláteis isoflurano e enflurano, em doses anestésicas, reduziram a liberação basal de

glutamato em sinaptosomas de córtex de ratos (Westphalen e Hemmings, 2005).

Nossos dados demonstraram que a despolarização com veratridina induziu um aumento expressivo da liberação de glutamato. Este efeito foi inibido significativamente na presença de cetamina 500 μM (figura 16). Estudos da liberação de GABA demonstraram que doses de cetamina de 100 μM inibiram a liberação do neurotransmissor evocada por veratridina 2,5 μM . O mesmo efeito inibitório só foi alcançado com concentração próxima a 1mM para um estímulo de maior potência como 50 μM de veratridina (Erecinska e cols., 1988). Assim como a cetamina, o propofol também inibiu a liberação de glutamato evocado por veratridina 20 μM , mas em concentrações de 30 μM (Ratnakumari e Hemmings, 1997). Em concentrações anestésicas a cetamina não afetou a liberação de neuropeptídios evocada por veratridina 20 μM (Pashkov e cols., 2002). Finalmente, em células da região medular da glândula adrenal, a liberação de catecolaminas induzida por veratridina 100 μM foi inibida por cetamina com IC_{50} de 260 μM (Takara e cols., 1986).

Nós também investigamos o efeito da TTX na liberação de glutamato evocada pela veratridina com o objetivo de comparar os efeitos da cetamina com a TTX, um clássico bloqueador de canais para sódio que impede a entrada deste íon pelos canais para sódio voltagem dependentes. A toxina apresenta alta potência e especificidade de maneira que não afeta outros receptores ou canais iônicos. O bloqueio do canal é feito na face extracelular da membrana plasmática, prevenindo o fluxo do íon (Narahashi, 2008). A TTX 1,0 μM inibiu a liberação de glutamato evocado por veratridina 10 μM , corroborando os dados de Ratnakumari e Hemmings (1997). Observa-se na figura 16 que a inibição provocada pela toxina foi mais robusta que a obtida com cetamina 500 μM e que não houve efeito aditivo entre a cetamina e TTX. Esse dado sugere que ambos os agentes podem atuar no mesmo alvo, ou seja, nos canais para sódio pré-sinápticos. A consequência funcional dessa ação é a diminuição da liberação de glutamato pelo comprometimento na dinâmica dos íons sódio e cálcio e a exocitose das vesículas.

Os efeitos pós-sinápticos dos agentes anestésicos são mais bem compreendidos que os efeitos pré-sinápticos. Na maioria dos trabalhos avaliando os efeitos pré-sinápticos destes agentes, os dados são bastante contraditórios e, na maioria destes, observaram efeitos apenas em concentrações supra-anestésicos de agentes intravenosos. Além do mais, como as metodologias dos estudos variam, torna-se difícil estabelecer um consenso entre os diferentes estudos. De qualquer forma, os efeitos pré-sinápticos observados com altas concentrações de anestésicos venosos podem justificar, por exemplo, alguns dos

efeitos colaterais observados com estes agentes durante a anestesia.

6 Conclusão

Este estudo demonstra, por métodos de fluorescência, que o anestésico venoso cetamina apresenta ações pré-sinápticas mediante estímulo despolarizante dependente de canais para sódio – veratridina 10 μM . Os efeitos ocorreram com o uso de concentração supra-anestésica deste agente (500 μM). Demonstrou-se nessas condições:

- Inibição do aumento dos níveis de sódio interno sinaptosomal
- Inibição do aumento da concentração de cálcio interno sinaptosomal
- Inibição da exocitose de vesículas sinápticas
- Inibição da liberação de glutamato

Estes dados, em conjunto, mostram que cetamina 500 μM em sinaptosomas de córtex de ratos atua nos canais para os íons sódio de forma a inibir o aumento de sódio intrasinaptosomal, o que compromete a despolarização e o funcionamento dos eventos que levam à liberação de glutamato.

7 Referências Bibliográficas

Adam-Vizi V, Ashley RH. (1987) Relation of acetylcholine release to Ca²⁺ uptake and intraterminal Ca²⁺ concentration in guinea-pig cortex synaptosomes. *J Neurochem.* Oct;49(4):1013-21.

Amaki Y, Nagashima H, Radnay PA, Foldes FF. (1978) Ketamine interaction with neuromuscular blocking agents in the phrenic nerve-hemidiaphragm preparation of the rat. *Anesth Analg.* Mar-Apr;57(2):238-43.

Anderson, P.A.V.; Roberts-Misterly, J.; Greenberg, R. M., (2005). The evolution of voltage-gated sodium channels: were algal toxins involved? *Harmful Algae* 4, 95–107.

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 *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003 Jun;27(4):687-700.

Betz WJ, Bewick GS (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255:200-203.

Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.

Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.

Bicalho AF. (1999). Efeitos de tityustoxina e veratridina nos fenômenos pré-sinápticos em sinaptosoma do córtex cerebral de ratos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia bioquímica e molecular). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte.

Bicalho AF, Guatimosim C, Prado MA, Gomez MV, Romano-Silva MA. (2002); Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. *Neuroscience.* 113(1):115-23.

Bräu ME, Sander F, Vogel W, Hempelmann G. (1997) Blocking mechanisms of ketamine and its enantiomers in enzymatically demyelinated peripheral nerve as revealed by single-channel experiments. *Anesthesiology*. Feb;86(2):394-404.

Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK, Betz WJ (2004) Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods* 33:287-294.

Caton D e Antognini JF. (2002). The development of concepts of mechanisms of anesthesia. In *Neural Mechanisms of anesthesia*. By Joseph F. Antognini, Douglas E. Raines. Edition: 2, illustrated. Published by Humana Press,

Catterall WA, Few AP. (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*. Sep 25;59(6):882-901.

Catterall WA.(1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*;20:15-43.

Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G., (2002). Voltage-gated sodium channels *International Union of Pharmacology. Pharmacol Rev* 57: 11-15.

Ceccarelli B, Hulburt WP, Mauro A, (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 57: 499-524.

Chanda, B.; Bezanilla, F., (2002). Tracking Voltage-dependent Conformational Changes in Skeletal Muscle Sodium Channel during Activation. *J. Gen. Physiol.* 120, 629–645.

Chapman ER, Davis AF. (1998) Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers. *J Biol Chem.* May 29;273(22):13995-4001.

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

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May

7;72:248-54.

Cochilla AJ, Angleson JK, Betz WJ (1999) Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* 22:1-10.

Conti, F. & WEINBER, R. J. Shaping (1999). Excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci*, v. 22(10), p. 451-8,

Craven R. (2007) Ketamine. *Anaesthesia*. Dec;62 Suppl 1:48-53.

Danbolt NC, (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 1:1-105.

David G. Nicholls. *Proteins, Transmitters and Synapses*: Blackwell Scientific Publications, 1994.

De Castro Junior CJ, Pinheiro AC, Guatimosim C, Cordeiro MN, Souza AH, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV.(2008) Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci Lett*. Jul 11;439(2):170-2. Epub 2008 May 13.

De Robertis E, Rodriguez de Lores Arnaiz G, Pellegrino de Iraldi A. Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. *Nature*. 1962 May 26;194:794-5.

Deri Z, Adam-Vizi V. (1993) Detection of intracellular free Na⁺ concentration of synaptosomes by a fluorescent indicator, Na(+)-binding benzofuran isophthalate: the effect of veratridine, ouabain, and alpha-latrotoxin. *J Neurochem*. Sep;61(3):818-25.

Diakov, A.; Korbmacher, C., (2004). A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J. Biol. Chem*. 279: 38134– 38142.

Dickenson AH, Chapman V and Green GM (1997), The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen. Pharmacol*. 28 pp. 633–638.

Dipolo R, Beaugé L. (1986). Reverse Na-Ca exchange requires internal Ca and/or ATP in squid axons. *Biochim. Biophys. Acta.* 854:298-306.

Dunkley PR, Jarvie PE, Heath JW, Kidd GJ, Rostas JA. (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.* Apr 30;372(1):115-29.

Eccles J (1976) From electrical to chemical transmission in the central nervous system. *Notes Rec R Soc Lond* 30:219-230.

Eckenhoff, R.G., Johansson, J.S., (1999). On the relevance of "clinically relevant concentrations" of inhaled anesthetics in in vitro experiments. *Anesthesiology* 91, 856-860.

Erecińska M, Nelson D, Silver IA. (1988) Interactions of benztropine, atropine and ketamine with veratridine-activated sodium channels: effects on membrane depolarization, K⁺-efflux and neurotransmitter amino acid release. *BrJ Pharmacol.* Jul;94(3):871-81.

Gandhi, S. P.; Stevens, C. F. 2003 Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature*, v. 423, n. 6940, p. 607-13, jun.

Gomez RS, Prado MA, Carazza F, Gomez MV. (1999) Halothane enhances exocytosis of [3H]-acetylcholine without increasing calcium influx in rat brain cortical slices. *Br J Pharmacol.* Jun;127(3):679-84.

Grasshoff C, Gillessen T, Wagner E, Thiermann H, Szinicz L. (2005) Ketamine reduces cholinergic modulated GABA release from rat striatal slices. *Toxicol Lett.* Apr 28;156(3):361-7.

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

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

Guatimosim C, Romano-Silva MA, Cruz JS, Beirao PS, Kalapothakis E, Moraes-Santos T, Cordeiro MN, Diniz CR, Gomez MV, Prado MA (1997) A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 122:591-597.

Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:127-139.

Haas DA, Harper DG. 1992. Ketamine: a review of its pharmacologic properties and use in ambulatory anesthesia. *Anesth Prog.* 1992;39(3):61-8.

Haeseler G, Tetzlaff D, Bufler J, Dengler R, Münte S, Hecker H, Leuwer M. Blockade of voltage-operated neuronal and skeletal muscle sodium channels by S(+)- and R(-)-ketamine. *Anesth Analg.* 2003 Apr;96(4):1019-26

Hatakeyama N, Yamazaki M, Shibuya N, Yamamura S, Momose Y. (2001) Effects of ketamine on voltage-dependent calcium currents and membrane potentials in single bullfrog atrial cells. *J Anesth.*;15(3):149-53.

Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G. (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature.* Oct 6;371(6497):513-5.

Heinemann, S.H.; Terlau, H.; Imoto, K., (1992). Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *Pflug. Arch.* 422, 90–92.

Hemmings HC Jr, Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, and Harrison NL (2005a) Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci* 26:503–510.

Hemmings HC Jr, Yan W, Westphalen RI, Ryan TA. (2005) The general anesthetic isoflurane depresses synaptic vesicle exocytosis. *Mol Pharmacol.* 2005 May;67(5):1591-9. Epub Feb 22.

Herlitze S, Xie M, Han J, Hümmer A, Melnik-Martinez KV, Moreno RL, Mark MD. (2003)

Targeting mechanisms of high voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr.* Dec;35(6):621-37.

Heuser JE & Reese TS, (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 57:315-44.

Hille B, Leibowitz MD, Sutro JB, Schwarz JR, Holan G. (1987) State-dependent modification of sodium channels by lipid-soluble agonists. *Soc Gen Physiol Ser.*;41:109-24.

Hille, B., (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 607.

Hirota K, Lambert DG. (1996) I.v. anaesthetic agents do not interact with the verapamil binding site on L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *BrJ Anaesth.* Sep;77(3):385-6.

Hughey, R.P.; Mueller, G.M.; Bruns, J.B.; Kinlough, C.L.; Poland, P.A.; Harkleroad, K.L.; Carattino, M.D.; Kleyman, T.R., (2003). Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J. Biol. Chem.* 278:37073–37082.

Irnaten M, Wang J, Chang KS, Andresen MC, Mendelowitz D. (2002) Ketamine inhibits sodium currents in identified cardiac parasympathetic neurons in nucleus ambiguus. *Anesthesiology.* Mar;96(3):659-66.

Isom, L. L., (2002). Beta subunits: players in neuronal hyperexcitability? *Novartis Found Symp* 241: 124-138.

Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y et al., (1999). Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8733-8.

Jahn R, Lang T, Südhof TC. (2003) Membrane fusion. *Cell.* Feb 21;112(4):519-33.

Jahn R, Südhof TC. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.*;68:863-

911.

Jessell TM, Kandel ER (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72 Suppl:1-30.

Katz B & Miledi R, (1969). Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol.* 203:689-706.

Katz B. (1969). The release of neural transmitter substances . pp 1-55, C.C Thomas, Springfield.

Kendall TJ, Minchin MC. (1982) The effects of anaesthetics on the uptake and release of amino acid neurotransmitters in thalamic slices. *Br J Pharmacol.* Jan;75(1):219-27.

Kendall TJ, Minchin MC. (1982) The effects of anaesthetics on the uptake and release of amino acid neurotransmitters in thalamic slices. *Br J Pharmacol.* Jan;75(1):219-27.

Klugbauer N, Marais E, Hofmann F. (2003) Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr.* Dec;35(6):639-47.

Kohrs R, Durieux ME. (1998) Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg.* Nov;87(5):1186-93.

Kontis, K.J.; Rounaghi, A.; Goldin, A.L., (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol.* 110, 391–401.

Lamont LA. (2008) Adjunctive analgesic therapy in veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008 Nov;38(6):1187-203.

Larrabee MG, Posternak JM. 1952. Selective action of anesthetics on synapses and axons in mammalian sympathetic ganglia. *J Neurophysiol.* 1952 mar;15(2):91-114.

Leão, R.M.; Kushmerick, C.; Pinaud, R.; Renden, R.; Li, G.L.; Taschenberger, H.; Spirou,

G.; Levinson S.R.; von Gersdorff, H., (2005). Presynaptic Na⁺ channels: locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J. Neurosci.*, 25 (14): 3724-3738.

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

Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* Sep;15(9):351-5.

Llinás R, Sugimori M, Silver RB. 1995 The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. *Neuropharmacology.* 1995 Nov;34(11):1443-51.

Maleque MA, Warnick JE, Albuquerque EX. The mechanism and site of action of ketamine on skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981 Dec;219(3):638-45.

Mantz J, Lecharny JB, Laudénbach V, Henzel D, Peytavin G, Desmonts JM. (1995) Anesthetics affect the uptake but not the depolarization-evoked release of GABA in rat striatal synaptosomes. *Anesthesiology.* Feb;82(2):502-11.

Marks B, McMahon HT (1998) Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* 8:740-749.

Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates Ca²⁺-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12:1235-1244.

Minchin MC. (1981) The effect of anaesthetics on the uptake and release of gamma-aminobutyrate and D-aspartate in rat brain slices. *Br J Pharmacol.* Jul;73(3):681-9.

Mitrovic, N.; George, A.L.; Horn, R., (1998). Independent versus coupled inactivation in sodium channels. Role of the domain 2 S4 segment. *J. Gen. Physiol.* 111, 451– 462.

Murthy VN & De Camilli P, (2003). Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci.* 26:701-28.

Nachshen DA. (1985) Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J Physiol.* 1985 Jun;363:87-101.

Nakamura I, Naka Yi e Izumi H. (1996) Use of Fura-2/AM to Measure Intracellular Free Calcium in *Selenomonas ruminantium*. *Tohoku J. Exp. med.* 179, 291-294.

Narahashi T. (2008) Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*;84(5):147-54.

Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. (1987) Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem.* Jul;49(1):50-7.

Nicholls DG. (1993) The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem.* 1993 Mar 15;212(3):613-31.

Ottersen OP, Laake JH, Reichelt W et al., (1996). Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *J Chem Neuroanat.* 12:1-14.

Ouyang W, Wang G, Hemmings HC Jr. (2003) Isoflurane and propofol inhibit voltage-gated sodium channels in isolated rat neurohypophysial nerve terminals. *Mol Pharmacol.* Aug;64(2):373-81.

Pashkov VN, Hemmings HC Jr. (2002) The effects of general anesthetics on norepinephrine release from isolated rat cortical nerve terminals. *Anesth Analg.* Nov;95(5):1274-81.

Pashkov VN, Westphalen RI, Hemmings HC Jr. (2002) General anesthetics do not affect release of the neuropeptide cholecystokinin from isolated rat cortical nerve terminals. *Anesthesiology.* Dec;97(6):1500-6.

Patton, D.E.; Isom, L.L.; Catterall, W.A.; Goldin A.L., (1994). The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 269 (26): 17649-55.

Pearce D.; Kleyman T.R., (2007). Salt, sodium channels, and SGK1. *J. Clin. Invest.* 117 (3): 592-595.

Perin MS, Brose N, Jahn R, Südhof TC. (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem.* 1991 Jan 5;266(1):623-9. Erratum in: *J Biol Chem* 1991 May 25;266(15):10018.

Purifoy JA, Holz RW. (1984) The effects of ketamine, phencyclidine and lidocaine on catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Life Sci.* Oct 29;35(18):1851-7.

Pyle JL, Kavalali ET, Piedras-Renteria ES et al., 2000. Rapid reuse of readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron.* 28:221-231.

Ratnakumari L, Hemmings HC Jr. (1997) Effects of propofol on sodium channel-dependent sodium influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. *Anesthesiology.* Feb;86(2):428-39.

Ratnakumari L, Hemmings HC Jr. (1998) Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane. *Anesthesiology.* Apr;88(4):1043-54.

Reckziegel G, Friederich P, Urban BW. (2002) Ketamine effects on human neuronal Na⁺ channels. *Eur J Anaesthesiol.* Sep;19(9):634-40.

Richards CD. (1995) The synaptic basis of general anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol.* Jan;12(1):5-19.

Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO et al., 2003. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron.* 39:529-41.

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

Ryan TA (2006) A pre-synaptic to-do list for coupling exocytosis to endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 18:416-421.

Schlame M, Hemmings HC Jr. (1995) Inhibition by volatile anesthetics of endogenous glutamate release from synaptosomes by a presynaptic mechanism. *Anesthesiology*. Jun;82(6):1406-16.

Schnoebel R, Wolff M, Peters SC, Bräu ME, Scholz A, (2005) Hempelmann G, Olschewski H, Olschewski A. Ketamine impairs excitability in superficial dorsal horn neurones by blocking sodium and voltage-gated potassium currents. *Br J Pharmacol*. Nov;146(6):826-33.

Schlame M, Hemmings HC Jr. (1995). Inhibition by volatile anesthetics of endogenous glutamate release from synaptosomes by a presynaptic mechanism. *Anesthesiology*. 1995 Jun;82(6):1406-16.

Sharkey, R.G.; Beneski, D.A.; Catterall, W.A., (1984). Differential Labeling of the α and β 1 Subunits of the Sodium Channel by Photo reactive Derivatives of Scorpion Toxin. *Biochemistry* 23, 6078-6086.

Sherrington C. (1947). *The integrative Action of the Nervous System*, 2nd ed. New Haven: Yale Univ. Press.

Slepnev VI, De Camilli P (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161-172.

Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW et al., (1993). A protein assembly/disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 3:409-18.

Stämpfli R, (1981). Overview of studies on the physiology of conduction in myelinated nerve fibres. In Demyelinating disease: basic and clinical electrophysiology (edited by WAXNAN SG AND RITCHIE JM.) pp11-23. New York: Raven Press.

Stühmer, W.; Conti, F.; Suzuki, H.; Wang, X.; Noda, M.; Yahagi, N.; Kubo, H.; Numa, S., (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature 339, 597-603.

Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci 27:509-547.

Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature 366:156-158.

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell 127:831-846.

Takara H, Wada A, Arita M, Sumikawa K, Izumi F. (1986) Ketamine inhibits ⁴⁵Ca influx and catecholamine secretion by inhibiting ²²Na influx in cultured bovine adrenal medullary cells. Eur J Pharmacol. 1986 Jun 17;125(2):217-24.

Takahashi T, Momiyama A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature. Nov 11;366(6451):156-8.

Takei K, Mundigl O, Daniell L et al., 1996. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. J Cell Biol. 133:1237-1250.

Torda TA, Murphy EC. (1979) Presynaptic effect of I.V. anaesthetic agents at the neuromuscular junction. Br J Anaesth. Apr;51(4):353-7.

Tsai SK, Lee C. (1989). Ketamine potentiates nondepolarizing neuromuscular relaxants in a primate. Anesth Analg. Jan;68(1):5-8.

Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS. (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian ventral neurons. *Physiol Rev.* Oct; 88 (4): 1407-47.

Von Gersdorff H, Sakaba T, Berglund K et al., (1998). Submillisecond kinetics of glutamate release from a sensory synapse. *Neuron.* 21:1177-88.

Wang SY, Wang GK. (2003) Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal.* Feb;15(2):151-9.

Weber M, Motin L, Gaul S, Beker F, Fink RH, Adams DJ. (2005) Intravenous anaesthetics inhibit nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents and Ca²⁺ transients in rat intracardiac ganglion neurons. *Br J Pharmacol.* Jan;144(1):98-107. Erratum in: *Br J Pharmacol.* 2005 Jan;144(1):144.

Weber T, Zemelman BV, McNew JA et al., (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 6:759-72.

Westphalen RI, Hemmings HC Jr. (2005) Volatile anesthetic effects on glutamate versus GABA release from isolated rat cortical nerve terminals: basal release. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jan;316(1):208-15. Epub Sep 20.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)