Nancy Scardua Binda

Efeito neuroprotetor do anestésico propofol em fatias de hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral *in vitro*

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

Belo Horizonte 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Nancy Scardua Binda

Efeito neuroprotetor do anestésico propofol em fatias de hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral *in vitro*

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

Orientador: Renato Santiago Gomez

Belo Horizonte 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)
- Instituto Milênio

"O paraíso da mãe é junto ao berço do seu filho."

(Coelho Neto)

Ao meu filho João Henrique, meu amor, minha vida, meu tudo.

Aos meus pais, José Antônio e Nanci, e irmãos, mesmo de longe,

sempre estiveram presentes.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, que sempre ilumina meus passos.
Ao meu querido e amado filho, João Henrique, por ter tornado os meus dias mais felizes e dôces.
Aos meus pais, agradeço pela minha existência, pelo amor e por nunca medirem esforços. Amo vocês!
Aos meus irmãos Felipe, Felício e Nathália, obrigada pelo amor, pelo apoio, por sempre estarem presentes em minha vida mesmo tão longe. Amo vocês!
À querida amiga e irmã Aninha, simplesmente por tudo...
A tia Jocélia, Ralphe, Guido e Rodolpho. Vocês são a minha segunda família.
Ao Henrique por ter dando o maior presente de minha vida, meu pequeno João Henrique.
Ao José Augusto e família por terem me acolhido em Belo Horizonte.
À Layla pela amizade verdadeira e apoio.
Ao meu orientador, Renato Santiago Gomez, por ter aceitado encarar o desafio de me orientar. Obrigada pela confiança, ensinamentos e orientação.
Ao professor Marcus Vinícius Gomez, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, boa vontade e suporte científico.
Aos professores Marco Antônio Máximo Prado e Vânia Prado por me acolherem no laboratório de Neurofarmacologia e pela orientação no meu primeiro ano de mestrado.
Aos professores Luiz Armando e Marco Aurélio pela acolhida no laboratório de Neurociências para que eu pudesse concluir este trabalho.
À professora Cristina Guatimosin pelos conselhos.
Ao grande amigo Bráulio, por ter me apresentado o mundo da ciência e pelo exemplo de disciplina e garra!
À Patrícia pela amizade, carinho, convivência e conselhos.
À Luciene pelos sorrisos sinceros, pela grande amizade, carinho e companhia.
Às alunas de iniciação científica Flávia e Cíntia pela convivência, amizade, ajuda na realização dos experimentos e sugestões científicas.
Aos alunos de iniciação científica Mateus e André por tornar os experimentos mais alegres!
Aos amigos do antigo laboratório de Neurofarmacologia: Fabiana, Iaci, Adriane, Cristina Martins, Cristiane, Ivana, Diogo e Xavier; pela convivência e amizade.
Aos amigos do laboratório de Neurociências: Alessandra, Bráulio, Luciene, Célio,

Danuza, Jomara, Juliara, Juliana, July, Vítor, Alexandre Magno, Alexandre Guimarães, Patrícia, Karen, Juliana, Luciana, Elisabete, Paulo e todos os integrantes da família Neurociências pela ótima convivência, carinho e amizade.

Aos amigos que encontrei nesse mundo da pós-graduação: Hermani, Hermann, Monalise, Daniela, João Arthur, Janice, Ricardo Ceará, Sônia e Mário.

Sumário

Lista de Figuras x
Lista de Abreviaturas xi
Resumo xii
Abstract xiii
1 Introdução 1
1.1 Isquemia Cerebral 2
1.2 Cascata Isquêmica 3
1.3 Papel do Cálcio na Isquemia Cerebral 7
2.0 Uso de Anestésicos como Agentes Neuroprotetores 8
2.1 Propofol 10
2 Objetivos 12
2.1 Objetivo Geral 13
2.2 Objetivos específicos 13
3 Material e Método 14
3.1 Material 15
3.1.1 Drogas e Reagentes 15
3.1.2 Equipamentos 15
3.1.3 Soluções 16
3.2 Métodos 17
3.2.1 Preparo de fatias de hipocampo 17
3.2.2 Procedimentos da câmara de perfusão 17
3.2.3 Determinação da viabilidade neuronal 18
3.2.4 Obtenção de imagens no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME 18
3.2.5 Quantificação das imagens obtidas no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME 18
3.2.6 Análises estatísticas dos dados 19
4 Resultados 20
4.1 Padronização do modelo experimental 21
4.2 Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol 26
4.3 Papel do sódio na neuroproteção do propofol na isquemia cerebral 30
4.4 Papel do cálcio na neuroproteção do propofol na isquemia cerebral 33

5 Discussão 36
5.1 Padronização do modelo experimental 37
5.2 Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol 39
5.3 Papel do sódio na neuroproteção do propofol na isquemia cerebral 41
5.4 Papel do cálcio na neuroproteção do propofol na isquemia cerebral 43
6 Conclusão 45
7 Referências Bibliográficas 47

Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama com os principais eventos que ocorrem após a oclusão de um vaso cerebral e subseqüente reperfusão 6
Figura 2: Fatias de hipocampo do controle e após o processo isquêmico 23
Figura 3: Avaliação da viabilidade neuronal em fatias de hipocampo de rato no modelo de isquemia *in vitro* 25
Figura 4: Efeito neuroprotetor do propofol 100 µM e da ω conotoxina MVIIC 1 µM em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 27
Figura 5: Dose resposta do propofol na porcentagem de células mortas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 28
Figura 6: Dose resposta logarítmica do propofol na porcentagem de células mortas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 29
Figura 7: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM e da tetrodotoxina 1 µM em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 31
Figura 8: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM, da tetrodotoxina 1 µM e do efeito aditivo dessas drogas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 32
Figura 9: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM, do EGTA 0.5 mM e do efeito aditivo dessas drogas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 34
Figura 10: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM, da ω conotoxina MVIIC 1 µM e do efeito aditivo dessas drogas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas 35

AVC	Acidente vascular cerebral
LCEA	Liquído cérebro espinhal artificial
Λ	Comprimento de onda
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
min	Minuto
H	Hora
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGTA	Etilenoglicol-bis-β-aminoetil éster
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazina-N -[2-ácido etano sulfônico])
Ca^{2+}	Íons cálcio
Cl^{-}	Íons cloreto
Na^{+}	Íons sódio
K^{+}	Íons potássio
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxasole-proprionato
NMDA	*N*-metil-D-aspartato
GABA	Ácido γ aminobutírico
IP_3	Inositol 1,4,5 trifosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
CCSV	Canais para cálcio sensíveis a voltagem
IC_{50}	Concentração capaz de inibir 50% da ação máxima efetiva de uma determinada droga
TTX	Tetrodotoxina
OMS	Organização Mundial de Saúde
RE	Retículo Endoplasmático
CSSV	Canais de sódio sensíveis à voltagem
DGO	Deprivação de glicose e oxigênio

RESUMO

Vários trabalhos sugerem que o propofol, um anestésico intravenoso, é capaz de reduzir a injúria neuronal decorrente da isquemia cerebral. Porém, resultados dessa neuroproteção em modelos de isquemia cerebral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm sido conflitantes. Além disso, os mecanismos envolvidos na neuroproteção do propofol ainda não foram esclarecidos. Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito neuroprotetor do propofol em um modelo de isquemia cerebral *in vitro* e os prováveis mecanismos envolvidos. Para avaliar o efeito neuroprotetor, foi utilizado o modelo de fatias de hipocampo submetidas à deprivação de glicose e oxigênio durante 20 minutos. Para investigar os possíveis locais de ação desse anestésico na neuroproteção usamos as seguintes ferramentas farmacológicas: ω conotoxina MVIIC, bloqueador de canais de cálcio do tipo –N, -P/Q, tetrodotoxina, bloqueador de canais de sódio e EGTA, quelante de cálcio extracelular. Em todas as concentrações avaliadas (1-300 μM) o propofol foi capaz de reduzir a morte neuronal na região CA1 do hipocampo. O efeito máximo do propofol na redução da morte neuronal (47,02%) foi atingido com a concentração de 100 μM. Esse efeito parece ser dependente do influxo de Na^+ pelos canais de Na^+ sensíveis à voltagem e do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular. A ω conotoxina MVIIC e o propofol apresentam efeitos somatórios em relação à neuroproteção, indicando que o propofol possa estar bloqueando canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem diferentes do tipo N e P/Q. Concluindo, esse estudo sugere que o propofol apresenta efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo submetidas à deprivação de glicose e oxigênio. O mecanismo desta neuroproteção parece envolver a redução do influxo de Na^+ e Ca^{2+} neuronal independente de canais de Ca^{2+} dos tipos -N, -P/Q.

ABSTRACT

There are several studies that propofol, an intravenous anesthetic, reduces neuronal injury due to brain ischemia. However, the results of such neuroprotection in ischemic models have been conflicting, both *in vitro* and *in vivo* studies. In addition, the mechanisms involved in propofol neuroprotection have not been clarified. The aim of the present study was to investigate the neuroprotector effect of propofol in a model of brain ischemia *in vitro,* as well as probable mechanisms involved. To investigate the neuroprotector effect of propofol, we used the model hippocampus slices submitted to glucose and oxigen deprivation for 20 minutes. To assess the possible action locations of the anesthetic neuroprotection we used the following pharmacological tools: ω conotoxin MVIIC, –N, -P/Q type calcium channel blockers, tetrodotoxin, a sodium channel blockers and EGTA, extracelular calcium quelator. In all concentrations assessed (1-300 μM), propofol was able to reduce neuronal death in the CA1 region of the hippocampus. The maximum effect of propofol in neuronal death reduction (47,02%) was obtained with the concentration of 100 μM. This effect seems to be dependent on the influx of Na^+ through the Na^+ ion channels sensible to voltage and extracellular Ca^{2+} influx. ω conotoxin MVIIC and propofol presented additional effects regarding neuroprotection, indicating that neuroprotetion by propofol could be independent of blocking voltage-dependent -N and -P/Q type Ca^{2+} channels. Therefore, this study suggests that propofol presents neuroprotector effects in hippocampus slices submitted to deprivation of glucose and oxigen. The mechanism of this neuroprotection seems to involve the reduction of the neuronal Na^+ and Ca^{2+} influx independent of -N, -P/Q type Ca^{2+} channels.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Isquemia Cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) é a segunda causa mais comum de morte e morbidade entre adultos no mundo. Nos países do hemisfério norte a isquemia cerebral é responsável por cerca de 10-12% das mortes, sendo que 12% dessas ocorrem em pessoas com menos de 65 anos (Murrays e cols 1997, Donnan e cols 2008). Em 2002, o AVC foi considerado a sexta causa mais comum de incapacidade ajustado aos anos de vida (Donnan e cols 2008).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a taxa de mortalidade das doenças cerebrovasculares no Brasil, no ano de 2004, foi de 49,35 por 100.000 habitantes, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares e das neoplasias malignas. Entretanto, essa taxa depende da idade, sexo e fatores externos como tabagismo, sedentarismo, obesidade e comorbidades, tais como hipertensão e diabetes. A incidência de isquemia cerebral em homens é maior do que em mulheres na faixa etária mais jovem e em faixas etárias mais avançadas essa proporção se iguala (American Heart Association). É interessante destacar que a freqüência de eventos cerebrovasculares em mulheres aumenta acentuadamente após a menopausa (McCullough e cols, 2003). Dentre as pessoas que são acometidas por algum tipo de evento isquêmico, 20% morrem na primeira semana e, 33% morrem no primeiro ano. Além da alta taxa de mortalidade, cerca de 2/3 dos pacientes que sobrevivem permanecem com seqüelas físicas e neurológicas (Pulsinelli 1995, Ricci e cols 1991).

O AVC pode ter origem isquêmica ou hemorrágica, sendo que 80% são isquêmicos (Donnan e cols 2008). Os eventos isquêmicos cerebrais são decorrentes de uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral em uma determinada região do cérebro (isquemia focal) ou, em todo o cérebro (isquemia global). A isquemia focal é causada, geralmente, pela oclusão de uma determinada artéria cerebral por um êmbolo ou trombo. Por outro lado, a isquemia global está relacionada com uma hipotensão prolongada, choque e parada cardiocirculatória. Enquanto que o AVE hemorrágico ocorre devido ao rompimento de uma artéria causando extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico (Brown 2002; Wise, Dubal et al. 2005)

A gravidade da lesão cerebral durante a isquemia depende do seu tempo de duração, da localização da oclusão vascular, da presença de circulação colateral e das medidas de proteção do cérebro isquêmico (Gert 1997). O tecido cerebral possui alto consumo de

glicose e oxigênio e depende, exclusivamente, da fosforilação oxidativa para a produção de energia. A interrupção ou redução do fluxo sanguíneo cerebral restringe a chegada de nutrientes, principalmente glicose e oxigênio, prejudicando o fornecimento de energia necessário à manutenção do gradiente iônico das células do tecido cerebral (Martin e cols 1994). Com a depleção energética, o potencial de membrana é modificado ocorrendo a despolarização dos neurônios e da glia.

A depleção energética interrompe a atividade de vários mecanismos celulares vitais, incluindo primeiramente as bombas iônicas que dependem de energia para a sua funcionalidade. Paralelamente, há um aumento da concentração de íons, principalmente do Ca^{2+} intracelular e de K^{+} extracelular assim como, do aumento na concentração de neurotransmissores, especialmente o glutamato (Gert 1997). Em conjunto, tais eventos culminam em edema e morte celular (Gert 1997). Após o insulto isquêmico, ocorre o retorno do fluxo sangüíneo, período denominado como reperfusão. A reperfusão de um tecido isquêmico restaura o aporte de oxigênio e glicose. A fosforilação oxidativa é restabelecida, o que contribui para a normalização dos processos energéticos fisiológicos celulares. Entretanto, a reperfusão tecidual desencadeia reações bioquímicas que aceleram o processo de glicólise, aumentando a acidose lática e a produção de radicais livres tóxicos. Este processo é denominado “lesão de reperfusão” (Hallenbeck e cols 1990).

Os mecanismos descritos anteriormente ocorrem não somente na região isquêmica, mas também em áreas ao redor do trauma inicial que são atingidas com produtos tóxicos produzidos pelo evento isquêmico inicial. Isso leva a formação de uma região denominada “penumbra isquêmica”. O fenômeno de morte celular programada (apoptose) desenvolve papel crítico na penumbra. Atualmente, a redução ou prevenção da morte celular na penumbra isquêmica é um dos principais alvos de estudos de intervenção farmacológica (Gert 1997).

1.2 Cascata Isquêmica

A cascata isquêmica é definida como uma série de processos neuroquímicos que ocorrem após a isquemia cerebral. Esse evento dura, em geral, algumas horas, mas pode se extender por vários dias após o insulto isquêmico e a restauração da circulação sanguínea (Zivin e cols, 1998).

A morte das células por isquemia resulta de mudanças decorrentes da inibição da fosforilação oxidativa e o aparecimento de uma série de reações intracelulares (Figura 1). Essas mudanças incluem queda do pH e da produção de ATP, produção de radicais livres

pela mitocôndria, aumento da concentração intracelular de Na^+ e, despolarização da membrana como resultado da falência das bombas de Na^+/K^+ ATPase, Ca^{2+}/H^+ ATPase e reversão do transportador de Ca^{2+}-Na^+ (Lipton 1999).

Devido à depleção bioenergética, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tornam-se ativados e neurotransmissores, especialmente o glutamato, são liberados no espaço extracelular. Ao mesmo tempo, a recaptação pré-sináptica desses neurotransmissores, outro processo dependente de energia, é afetada levando ao acúmulo no espaço extracelular. O glutamato presente no espaço extracelular irá ativar os receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA/cainato) e os receptores metabotrópicos contribuindo para o aumento intracelular de Ca^{2+}, Na^+ e Cl^- (Nhels e cols 1989). O influxo desses íons promove a entrada de água, através do gradiente osmótico, causando edema citotóxico e lise celular (Lipton 1999). O edema subseqüente pode afetar a perfusão de regiões que circundam a região isquêmica em decorrência do aumento da pressão intracraniana, compressão vascular e hérnia cerebral (Dirnagl e cols 1999).

O aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]i$) está relacionado a vários eventos citoplasmáticos e nucleares que impactam no desenvolvimento do dano tecidual (Figura 1), como por exemplo: ativação de enzimas proteolíticas que degradam as proteínas do citoesqueleto (Chen e cols 1997, Furukawa e cols 1997), ativação de fosfolipase C e sinalização $Ins(1,4,5)P_3$, ativação de fosfolipase A_2, ciclooxigenase e óxido nítrico sintetase, enzimas geradoras de radicais livres que levam a peroxidação lipídica e dano da membrana (Dirnagl e cols 1999). É bom ressaltar que os radicais livres do oxigênio são importantes moléculas sinalizadoras envolvidas no processo de apoptose e inflamação.

O aumento da $[Ca^{2+}]i$ também é capaz de afetar o funcionamento da mitocôndria, levando ao rompimento da membrana interna e a oxidação de proteínas que medeiam o transporte de elétrons, a extrusão de H^+ e a produção de ATP. Esse rompimento da membrana da mitocôndria leva à liberação de vários fatores apoptóticos no citoplasma disparando esse processo na célula. É importante compreender que todos os receptores de neurotransmissores estarão ativados durante o insulto isquêmico pelos seus respectivos ligantes. Esse processo é potencializado pela abertura sustentada e concomitante de canais de Ca^{2+} (Lipton 1999). O aumento da $[Ca^{2+}]i$ inibe, por sua vez, o metabolismo oxidativo, criando assim um ciclo vicioso (Verkhratsky e cols 1996, De Flora e cols 1998).

Portanto, a cascata isquêmica pode ser considerada um fenômeno heterogêneo, que pode ser resumida como uma falência do metabolismo energético das células, seguido de excitoxicidade, estresse oxidativo, disfunção da barreira hematoencefálica, injúria

microvascular, ativação hemostática, inflamação pós-isquêmica e, finalmente, morte celular de neurônios, glia e células endoteliais (Brouns e cols, 2009).

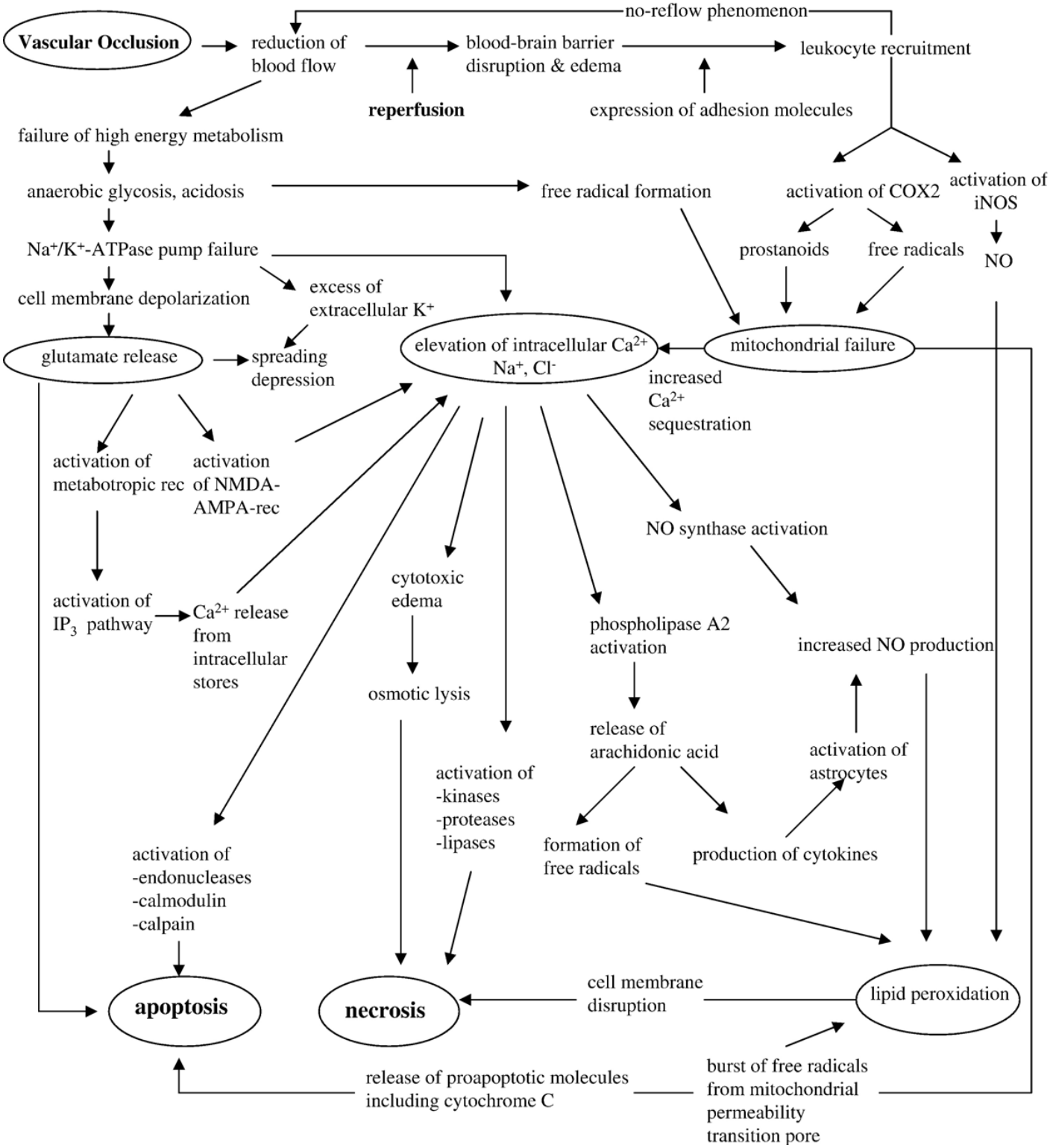


Figura 1: Diagrama com os principais eventos que ocorrem após a oclusão de um vaso cerebral e subseqüente reperfusão. Essa figura não compreende todos os eventos (Durukan 2007).

1.3 Papel do Cálcio na Isquemia Cerebral

A excitotoxicidade está presente em vários processos degenerativos neuronais, incluindo isquemia, epilepsia e em algumas doenças crônicas como a esclerose amiotrófica lateral. Um mediador chave no dano excitotóxico é o íon Ca^{2+}. Esse íon governa múltiplos processos celulares, como o crescimento celular, diferenciação e atividade sináptica. Para realizar todas essas funções celulares e manter a homeostasia, existem vários mecanismos para manter a concentração desse íon em níveis adequados, permitindo sinais temporais e espaciais de forma localizada (Arundine e cols 2003).

Na excitoxicidade, a liberação excessiva de glutamato leva ao rompimento da homeostasia do Ca^{2+}. O glutamato ativa receptores pós- sinápticos, incluindo receptores NMDA, AMPA e cainato. Após essa ativação, esses receptores permitem o influxo de Ca^{2+} e Na^{+}. O aumento excessivo de Ca^{2+} é produzido por essa ativação de receptores, principalmente através do receptor NMDA e, também, pela liberação de estoques internos e, portanto podem levar a perda dessa homeostasia e culminar em morte celular (Arundine e cols 2003).

A possibilidade de que alterações na homeostasia dos íons Ca^{2+} possam atuar na morte neuronal em estados patológicos, como isquemia cerebral e epilepsia, foram propostas há mais de 20 anos atrás (Siesjo 1981). Schanne e cols, em 1979, propuseram que em condições patológicas associadas à insuficiência energética, há um aumento dos níveis de cálcio provenientes da ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e dos canais de Ca^{2+} acoplados a receptores, e também pela liberação de Ca^{2+} estocado em organelas celulares. O aumento de Ca^{2+} citosólico ativa fosfolipases, promove a degradação de membranas, formação de radicais livres, edema celular, distúrbios na síntese de ATP mitocondrial e finalmente morte celular. Essa hipótese do Ca^{2+} foi baseada em observações anteriores feitas em hepatócitos de ratos submetidos a várias toxinas. Nesses experimentos foi possível relacionar a morte celular ao aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico. A morte celular foi observada somente em células cultivadas em meio com a concentração normal de Ca^{2+} (1 mM) e não em células cultivadas em meio pobre em Ca^{2+} (20 μM). Esses experimentos mostraram que o influxo de Ca^{2+} induzido por um agente estressante engatilha processos patológicos resultando em morte celular (Schanne e cols 1979).

Essa hipótese original do cálcio vem sendo modificada ao longo dos anos e hoje vários estudos vêm mostrando que a morte neuronal não está necessariamente ligada ao aumento da atividade de Ca^{2+}, citoplasmático. A hipótese do Ca^{2+} mitocondrial sugere que a captação de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria resulta na formação de espécies oxidativas,

abertura do poro de transição mitocondrial e liberação de citocromo c, resultando assim em morte celular. Todos esses eventos podem acontecer sem que haja um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático (Koike e cols 1989).

A hipótese do Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) foi proposta primeiramente em 1996 por Paschen e colaboradores. Essa hipótese propõe que a depleção de Ca^{2+} dos estoques intracelulares é o engatilhador da morte celular neuronal (Paschen e cols. 1999 e Paschen 2000).

O RE é um compartimento subcelular que exibe alta atividade de Ca^{2+}. A depleção de cálcio estocado no RE é considerada uma forma severa de estresse que é potencialmente letal às células. Essa característica presente no RE em relação à homeostasia de Ca^{2+} difere este compartimento do citoplasma e da mitocôndria quanto aos níveis de Ca^{2+}. Esses dois últimos compartimentos mantêm níveis baixos de Ca^{2+} em situações normais e aumentam consideravelmente a concentração de Ca^{2+} em que a célula é submetida a eventos estressantes. A homeostasia do Ca^{2+} do RE é realizada através dos receptores de IP3 e rianodina. Além desses receptores, há também uma bomba iônica de Ca^{2+} (SERCA) que bombeia íons Ca^{2+} do citoplasma para o interior do RE (Paschen 2003).

A isquemia tem efeito direto na homeostasia do Ca^{2+} do RE. O gradiente de Ca^{2+} entre o citoplasma e o RE é mantido pela SERCA, uma bomba iônica dependente de ATP. Esse processo é bloqueado durante a isquemia, pois a quantidade de energia não é suficiente para que esta bomba opere de forma adequada, promovendo assim o aumento de Ca^{2+} citoplasmático (Paschen 2003). Além da bomba SERCA, os receptores do RE também estão envolvidos no processo de morte celular neuronal. Foi observado em vários experimentos que o dantroleno, bloqueador dos receptores de rianodina, pode ser um agente neuroprotetor em condições que envolvem isquemia e excitotoxicidade (Frandsene cols 1992). Parece que o acoplamento entre RE e mitocôndria desenvolve papel importante na geração da morte celular neuronal uma vez que o acoplamento apoptótico envolvendo RE e mitocôndria seja estabelecido. Células neuronais em cultura foram tratadas com tunicamicina, um agente bloqueador da glicosilação das proteínas residentes do RE, promovendo assim liberação de Ca^{2+}. Esse evento foi responsável pela liberação de citocromo C da mitocôndria e conseqüente ativação de caspase-3, culminando em apoptose (Hacki e cols 2000).

2.0 Uso de Anestésicos como Agentes Neuroprotetores

A acentuada vulnerabilidade do cérebro à interrupção do fluxo sanguíneo tem levado a busca de novos agentes farmacológicos que possam reduzir a injúria após a isquemia

cerebral. Entre esses, os anestésicos são considerados candidatos lógicos, devido à habilidade desses agentes em reduzir a taxa metabólica, antagonizar a excitotoxicidade do glutamato e, aumentar a transmissão sináptica inibitória. Conseqüentemente, há um considerável interesse na identificação de agentes anestésicos que possam reduzir a injúria neuronal isquêmica (Kawaguchi e cols, 2005).

A neuroproteção de agentes anestésicos foi descrita pela primeira vez há mais de 30 anos, quando os barbitúricos foram associados à redução do consumo de energia neuronal conseqüente à redução da atividade elétrica. Por muitos anos acreditou-se que a neuroproteção dos anestésicos baseava-se principalmente pela diminuição da taxa metabólica cerebral decorrente da supressão elétrica (Koerner e Brambrink 2006). Atualmente, com o entendimento das várias etapas e vias envolvidas na morte celular isquêmica têm-se demonstrado que os anestésicos agem mais especificamente, podendo interferir na cascata isquêmica. Vários mecanismos em potencial têm sido descritos, incluindo a inibição das atividades excitatórias e potencialização dos circuitos inibitórios (Koerner e Brambrink 2006). Já foi relatado que muitos anestésicos agem como antagonistas do glutamato nos receptores NMDA e AMPA e agonista de GABA nos receptores GABA-A (Grasshoff e cols 2005, Asahi e cols 2006). Além disso, estes agentes estão associados à redução da liberação de glutamato (Winegar e cols 2006, Westphalen e cols 2006) e ao aumento da recaptação de neurotransmissor na fenda sináptica, atenuando a morte dos neurônios por excitoxicidade. Existem outros mecanismos que também podem estar envolvidos na neuroproteção pelos anestésicos, como o bloqueio do influxo de Ca^{2+}, ativação de receptores de adenosina A1 (Tas e cols 2005), ativação de cascatas de sinalização intracelular como a MAP Kinase e Akt que podem levar a alterações na expressão gênica, bem como a ação antioxidante (Lee e cols 2005). Portanto, parece que os efeitos específicos dos anestésicos na cascata isquêmica excedem os benefícios obtidos pela simples supressão da atividade metabólica cerebral (Koerner e cols 2006).

O grau de neuroproteção obtido pelos anestésicos assim como a duração do efeito ainda não está claro. Muitos estudos experimentais têm falhado em mostrar uma proteção de longo duração pelos anestésicos, a despeito da importante proteção no curto prazo (Koerner e Brambrink 2006). Resultados recentes indicam que os agentes voláteis, os barbitúricos e o propofol reduzem a injúria neuronal depois de um evento isquêmico moderado, porém esse efeito neuroprotetor não é aparente após um longo período pós-isquêmico (Koerner e Brambrink 2006).

Considerando que a patofisiologia da isquemia cerebral é complexa e, que um grande número de processos são iniciados com o insulto isquêmico; uma simples

intervenção farmacológica, provavelmente, não resultaria em uma neuroproteção sustentada. Portanto, torna-se necessário a combinação de diferentes estratégias específicas para cada estágio de evolução da injúria isquêmica (Kawaguchi e cols 2005). A relevância clínica da neuroproteção pelos agentes anestésicos seria em obter mais uma ferramenta que reduza a morte neuronal após um evento isquêmico (neuroproteção multimodal).

2.1 Propofol

O propofol (2,6-diisopropilfenol) é um agente intravenoso sedativo-hipnótico comumente usado na indução e manutenção da anestesia e, na sedação em terapia intensiva. Essa droga apresenta curta duração de ação possibilitando o uso em infusão contínua e com poucos efeitos colaterais (Glen 1980; Glen e Hunter 1984). De fato, a anestesia intravenosa desse agente está associada com uma menor incidência de náuseas e vômitos pós-operatórios (Dandoy e cols 1990, Jost e cols 1997, McCollum e cols 1988). Dong e Xu em 2002 descreveram que ação modulatória do propofol em receptores $GABA_A$ pode estar relacionado à analgesia. Além disso, já foram relatadas atividades imunomodulatória (Hockey e cols; 2005), modulação da agregação de plaquetas (Aoki e cols 1998), atividade antioxidante (Mathy-Hartert e cols 2000; Aarts e cols 1995; Murphy e cols 1992), efeito ansiolítico em doses que não causam sedação (Kurt e cols 2003) e efeito neuroprotetor (Engelhard e cols 2004, Gelb e cols 2002).

Os efeitos sedativo, hipnótico e amnésico são atribuídos à interação do propofol com o sítio alostérico do receptor $GABA_A$, potencializando as correntes evocadas por baixas concentrações de GABA, aumentando assim, a eficácia do agonista. Em concentrações maiores, esse agente é capaz de abrir diretamente o canal do receptor GABA permitindo a entrada de Cl^- na ausência de GABA (Concas e cols 1991, Orser e cols 1994). O propofol também está relacionado à inibição da liberação de glutamato através de mecanismos pré-sinápticos (Ratnakumari e Hemmings Jr 1997).

Como outros anestésicos, o propofol possui propriedades que podem proteger o cérebro contra uma isquemia cerebral. Essas propriedades incluem a redução da taxa metabólica cerebral, do fluxo sanguíneo cerebral e pressão intracraniana (Murphy e cols 1992), potencialização da inibição mediada pelo influxo de Cl^- através dos receptores gabaérgicos (Ito e cols 1998) e, inibição dos receptores de glutamato (Zhan e cols 2001). O mecanismo neuroprotetor pode também ser correlacionado à redução dos níveis de glutamato extracelular decorrente da inibição da liberação de glutamato dependente de canais de Na^+ e do aumento da recaptação desse neurotransmissor (Sitar et al. 1999), bem

como a atividade antioxidante com redução da peroxidação lipídica (Sagara et al. 1999; Wilson and Gelb 2002).

Em virtude disso, o propofol tem sido testado como agente neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral. Tanto resultados positivos (Sitar e cols, 1999; Peters e cols, 2001; Daskalopoulos e cols, 2001;Velly e cols 2003) como negativos (Qi e cols, 2002; Feiner e cols, 2005) foram obtidos de estudos *in vitro*. Da mesma forma, resultados conflitantes foram observados em estudos *in vivo*. Velly e cols em 2003 mostraram a habilidade do propofol em proteger culturas celulares corticais 24 horas após a exposição a 90 minutos de insulto isquêmico, seguido de reoxigenação. Neste mesmo estudo foi relatado que esse anestésico é capaz de atenuar o aumento da concentração extracelular de glutamato e reduzir a recaptação desse neurotransmissor. Em culturas de fatias de hipocampo, o propofol não demonstrou um efeito prolongado na sobrevivência das células das regiões CA1 e C3 após 3 dias do insulto isquêmico. Entretanto, neste mesmo modelo o propofol foi capaz de prolongar a sobrevivência das células do giro dentado.

Na maioria dos trabalhos demonstrando efeitos benéficos do propofol na isquemia cerebral, a avaliação do efeito desse medicamento foi realizada em períodos relativamente curtos após a isquemia (até 7 dias). De fato, foi demonstrado que a infusão de propofol diminui o tamanho do infarto três dias após o insulto induzido pela endotelina em modelo de isquemia cerebral (Bayona e cols, 2004). Entretanto, quando os animais foram avaliados três semanas após a isquemia, não foram observadas diferenças histológicas entre o grupo controle e o grupo com propofol, embora se tenha observado uma melhora funcional no último grupo. Por outro lado, utilizando-se modelo de isquemia de hemisfério cerebral combinado com hipotensão hemorrágica, observou-se que o propofol reduziu o dano neuronal e melhorou a modulação da apoptose em comparação com o óxido nitroso e fentanil por até 28 dias, sugerindo efeito neuroprotetor de longo prazo (Engelhard e cols, 2004). A severidade da isquemia neste caso é considerada relativamente leve, justificando, assim o resultado favorável. Portanto, parece que, como observado com anestésicos inalatórios, o propofol pode ser neuroprotetor a longo prazo na presença de um insulto leve, mas a neuroproteção não é sustentada em insultos moderados a severos. Entretanto, ao retardar o desenvolvimento da injúria, o propofol poderia ser utilizado em associação com outras intervenções farmacológicas que atuam, especificamente, nas várias etapas de evolução da lesão isquêmica.

Muitos estudos que relatam o efeito neuroprotetor do propofol sugerem que a proteção é promovida pela redução da morte celular por excitoxicidade, mas o exato mecanismo de ação ainda permanece incerto (Traul e cols 2008). Não se pode descartar a

habilidade do propofol modular a morte celular por apoptose. Estudos recentes têm correlacionado o efeito neuroprotetor a propriedades antioxidantes e efeito anti-apoptótico (Adembri e cols 2006).

Portanto, conclui-se que as características e os mecanismos envolvidos na neuroproteção do propofol durante a isquemia cerebral ainda não estão bem definidos justificando a necessidade de mais estudos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ação neuroprotetora do anestésico propofol na isquemia cerebral em um modelo de isquemia cerebral *in vitro.*

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de isquemia cerebral *in vitro* na câmara de perfusão Brandel SF-120.

- Avaliar o efeito neuroprotetor do propofol em fatias de hipocampo de ratos submetidos a insulto isquêmico *in vitro*, utilizando-se a microscopia de fluorescência.

- Avaliar se a ação neuroprotetora do propofol na isquemia cerebral é dependente de canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina.

- Avaliar se ação neuroprotetora do propofol na isquemia cerebral é dependente de íons cálcio extracelular e canais de cálcio sensíveis à voltagem.

MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

3.1.1 Drogas e Reagentes

- Live/Dead - Viability/Cytotoxicity Kit L-3224 (Molecular Probes)
  - Component A: Calcein-AM 4mM solution in DMSO
  - Component B: Ethidium Homodimer-1 2 mM solution in 1:4 DMSO/H_2O
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- $CaCl_2$ (Merck)
- $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich)
- $NaHCO_3$ (Vetec)
- KH_2PO_4 (Merck)
- $C_6H_{12}O_6$(Merck)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Conotoxina MVIIC (Sigma-Aldrich)
- Propofol (2,6 Diisopropilfenol) (Sigma-Aldrich)
- Tetrodotoxina –TTX- (Latoxan)

3.1.2 Equipamentos

- Banho Ultratermostático LICIT.
- Balança de precisão decimal Quimis. Modelo BG 440.
- Câmara de perfusão do tipo Brandel SF-120.
- Câmara de perfusão de tecido Fine Science Tools Inc, Canadá.
- Guilhotina.
- Microscópio Axiovert Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME.
- Tissue Chopper, Modelo PZN, USA.

3.1.3 Soluções

Líquido cérebro-espinal artificial (LCEA) sem glicose

Componentes	Molaridade (mM)
Cloreto de Sódio (NaCl)	127
Cloreto de Potássio (KCl)	2,00
Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$)	2,00
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$)	2,00
Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$)	26,0
Fosfato Diácido de Potássio (KH_2PO_4)	1,20
HEPES	13,0

pH= 7,4 ajustado com NaOH 3M

LCEA com glicose

Componentes	Molaridade (mM)
Glicose	10,0 ou 4,0
Solução de LCEA	qsp

pH=7,4 ajustado com NaOH 3M

Solução estoque de propofol

Componentes	Molaridade (mM)
Propofol	100
Água deionizada	qsp

pH= 11,4 ajustado com NaOH 3M

Soluções de propofol

Componentes	Molaridade (mM)
Solução estoque de Propofol	100, 30, 10 ou 1
Solução de LCEA	qsp

pH= 7,4 ajustado com HCl 1N

3.2 MÉTODO

3.2.1 Preparo das fatias do hipocampo

Ratos adultos Wistar (150-250 gramas), de ambos os sexos, foram sacrificados por decapitação utilizando guilhotina. O cérebro foi removido rapidamente, os hipocampos foram dissecados e, colocados em solução de LCEA previamente resfriada a 4ºC e aerada com mistura de oxigênio (95%) e dióxido de carbono (5%). Cada hipocampo foi seccionado em fatias de 400 µM no fatiador de tecidos, e levados para a câmara de perfusão tipo Brandel SF-120.

3.2.2 Procedimentos na Câmara de Perfusão

A partir do momento em que as fatias do hipocampo foram levadas à câmara de perfusão, o procedimento neste aparelho foi dividido em quatro etapas: primeira, recuperação do tecido; segunda, incubação com a droga; terceira, indução do insulto isquêmico e; quarta, período de reperfusão.

Na primeira fase, as fatias do hipocampo, levadas à câmara de perfusão, foram distribuídas em 12 mini-câmaras banhadas com solução de LCEA com 10 mM de glicose aerada com mistura carbogênica (95% O_2/5% CO_2). A velocidade da perfusão foi mantida em 0,5 mL por minuto e a temperatura mantida em 36,5ºC. As fatias foram submetidas a esta condição por 90 minutos com a finalidade de recuperar o tecido do trauma mecânico decorrente da dissecação.

Após esta fase, uma parte das fatias do hipocampo foi submetida a um pré-tratamento durante 30 minutos com diversas condições que serão detalhadas posteriormente. Todas as drogas utilizadas, nesta etapa, foram diluídas no meio de incubação (LCEA). A parte restante das fatias (grupo controle de viabilidade celular e grupo isquemia) foi perfundida com meio de incubação aerado com mistura carbogênica sem as condições supracitadas.

Em seguida, iniciou-se o período de isquemia, no qual as câmaras que passaram pelo tratamento com as drogas em estudo e, a câmara que representou o insulto isquêmico foram submetidas a um período de 20 minutos de redução do fornecimento de glicose associado a privação de oxigênio, através da perfusão com LCEA contendo 4 mM de glicose borbulhado com 95%N_2/5%O_2. Somente o grupo controle da viabilidade celular não foi submetido ao insulto isquêmico permanecendo nas condições ideais de oxigenação e

fornecimento de glicose durante todo o experimento.

A última etapa da perfusão foi denominada de período de reperfusão. Neste momento, todas as câmaras foram perfundidas com meio de incubação aerado com mistura carbogênica durante 4 horas de reperfusão antes da avaliação da viabilidade neuronal pela microscopia. Nestas condições as fatias de hipocampo permanecem viáveis por até 12 horas (Monette eT al., 1998).

3.2.3 Determinação da viabilidade celular

Para analisar a viabilidade celular das fatias, as mesmas foram coradas com 4,5 µL de etídeo homodímero-1 (2 mM) diluídos em 1,5 mL de meio de incubação aerado previamente com mistura carbogênica. Essa solução de marcação foi dividida em placas de 35 mm, sendo uma placa para as fatias da condição controle, outra para as fatias da condição de isquemia e, outras para as fatias das condições de tratamento com as drogas e ferramentas farmacológicas utilizadas. As fatias foram mantidas nessa solução de marcação por 30 minutos. Após isso, elas foram lavadas com 2 mL de meio de incubação aerado por 15 minutos. Depois da lavagem, as fatias foram colocadas em uma câmara de perfusão para microscópio e foram analisadas utilizando o microscópio Axiovert Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME.

3.2.4 Obtenção de imagens no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME.

No microscópio foram adquiridas imagens de secções ópticas consecutivas ao longo do eixo Z, com espessura de 2 µm, com comprimento de onda de excitação de 568 nm para o Etídeo Homodímero e emissão em 598/40. As imagens foram adquiridas com saturação da fluorescência, com a objetiva de 20 vezes. Foi utilizada lâmpada de mercúrio HBO. Estes parâmetros foram mantidos em todos os experimentos.

3.2.5 Quantificação das imagens obtidas no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME.

Para a realização da análise quantitativa, foi utilizada o programa de processamento de imagens ImageJ. As imagens foram submetidas a um processamento através de um filtro de ajuste de pixels pela mediana, com o intuito de reduzir possíveis interferências de ruído,

e foram obtidos os histogramas das respectivas imagens. Com o histograma da imagem foi determinado o valor do limiar basal da fluorescência. Após esse processamento da imagem, a região CA1 foi selecionada com uma área pré-determinada e, assim, foi realizada a quantificação do número de células mortas presentes.

3.2.6 Análise estatística dos dados

Os experimentos foram realizados em dias independentes e repetidos no mínimo quatro vezes. Todos os dados coletados foram analisados utilizando o programa Prism 5 for Windows (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA). A significância estatística dos dados foi avaliada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas com $P < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do modelo experimental

O modelo de fatias de hipocampo é muito usado para estudar os mecanismos de neurotoxicidade induzida pela isquemia e para verificar o efeito neuroprotetor de novos agentes terapêuticos (Monette e cols 1998). Para a padronização do modelo experimental de isquemia em fatias de hipocampo na câmara de perfusão Brandel, adaptou-se o modelo previamente descrito por Monette e cols (1998) e por Pinheiro e cols (2007).

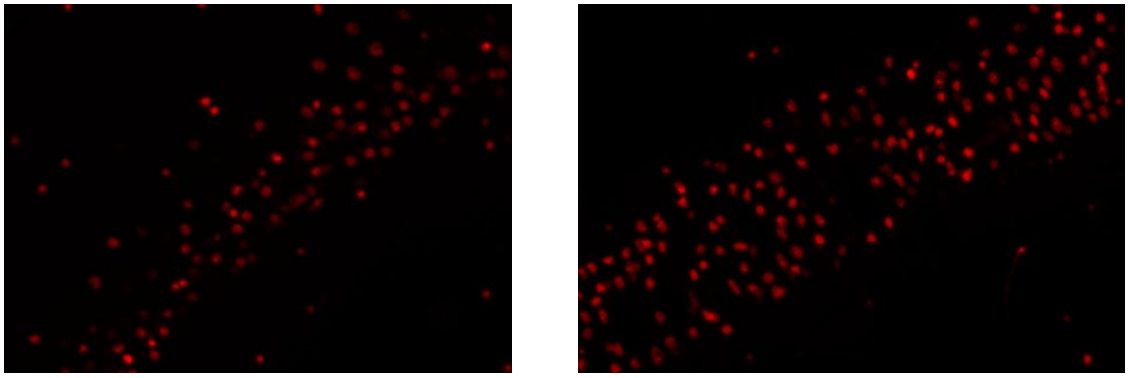
O primeiro experimento foi utilizado para determinar a viabilidade do modelo experimental na câmara de perfusão tipo Brandel SF-120. Assim, não foi realizada a incubação com drogas e, no tempo referente a essa etapa, 30 minutos, as fatias continuaram a serem banhadas com LCEA aerada com mistura carbogênica. Após este período, metade das fatias de hipocampo permaneceu nas condições iniciais e a metade restante foi submetida a insulto isquêmico através da perfusão com meio de incubação contendo 4 mM de glicose e borbulhado com 95% N_2/5% CO_2 durante 20 minutos (Monette e cols, 1998; Pinheiro e cols, 2006). Assim, as fatias obtidas do mesmo animal foram incubadas em condições isquêmicas e não isquêmicas (grupo controle). Em seguida, essas fatias foram reperfundidas por 4 horas em LCEA contendo 10 mM de glicose e aerado com mistura carbogênica e, posteriormente, realizada a avaliação da viabilidade neuronal por microscopia.

No microscópio de fluorescência, as imagens foram obtidas usando a sonda fluorescente etídeo homodímero. Essa sonda fluorescente possui alta afinidade por ácidos nucléicos e é impermeável em células com a membrana intacta. As membranas das células mortas se rompem permitindo a entrada da sonda no citoplasma e núcleo. Ao se ligarem ao DNA ou RNA a intensidade da fluorescência aumenta em 40 vezes (Gaugain e cols 1978, Haugland e cols 1996). Quando excitado no comprimento de onda de 528 nm os núcleos das células mortas ficam vermelhos (λ= 621 nm). Assim, o etídeo homodímero torna-se um método simples para a visualização de células mortas (Monette e cols 1998). Obtida as imagens no microscópio, realizou-se a análise quantitativa da morte celular.

Na figura 2A pode-se observar que há um maior número de células marcadas na fatia submetida ao insulto isquêmico em relação à fatia controle. Na análise quantitativa, figura 2B, pode-se observar que nas fatias submetidas à isquemia encontrou-se 53±4,35% a mais de células mortas em relação as fatias controle. Assim, a perfusão das fatias de hipocampo com meio de incubação contendo 4 mM de glicose e, borbulhado com 95%

N_2/5% CO_2 durante 20 minutos (isquemia), induziu um aumento de morte celular que foi, aproximadamente, 2 vezes maior do que a observada quando as fatias foram perfundidas em condições não isquêmicas (controle).

A



Controle **Isquemia**

B

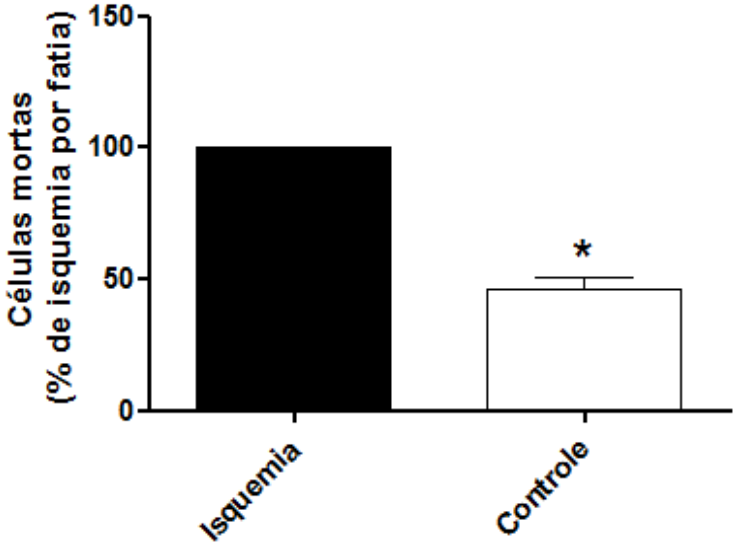


Figura 2: Fatias de hipocampo do controle e após o processo isquêmico. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo controle e isquemia coradas com etídeo homodímero. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo controle e isquemiadas por 20 minutos.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Em seguida algumas fatias de hipocampo foram perfundidas por uma solução isquêmica (redução de glicose e de O2 e aeradas com N2), enquanto as outras fatias foram mantidas em solução normal. Após o processo isquêmico, ambas as fatias de hipocampo foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias de hipocampo foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 6 experimentos independentes, e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

Para avaliar a integridade celular logo após o seccionamento do hipocampo, algumas fatias de hipocampo foram levadas para a avaliação da viabilidade neuronal no microscópio – grupo controle 0h. O restante das fatias foi distribuído normalmente na câmara de perfusão e submetido ao período de perfusão, anteriormente descrito. Logo após o insulto isquêmico – grupo isquemia 0h - algumas fatias foram retiradas e foi realizada a análise de viabilidade celular no microscópio. Esse procedimento foi repetido 2 horas após o insulto isquêmico – grupo isquemia 2h – e, no final do experimento – grupo controle 6h e grupo isquemia 4h. Sendo que o grupo controle 6h permaneceu nas condições ideais durante todo o período de perfusão.

Na figura 3 pode-se observar que não há diferença estatística entre os grupos controles 0h e 6h (5,38±0,97 e 5,85±0,95, respectivamente). Assim, pode-se verificar que a morte neuronal do grupo controle não ocorre durante o período de perfusão na câmara Brandel S-120. A análise quantitativa mostrou que há uma tendência estatística de 21,19% de aumento da morte celular quando comparamos os grupos controles 0h e 6h ao grupo de isquemia 0h (5,38±0,97, 5,85±0,95 e 7,09±1.67, respectivamente). A comparação entre o grupo controle 6h com isquemia 2h (8,26±0,68) nos mostra que há um aumento de 41,19% ($p < 0.05$) de morte celular no grupo isquemiado. Comparando-se o grupo isquemia 4h (12.2±1.23) com o controle 6h, observa-se que houve um aumento de 119% no número de células mortas no grupo que sofreu o insulto isquêmico. Neste experimento, pode-se observar que a maior parte da morte neuronal devido à isquemia ocorre durante o período de reperfusão.

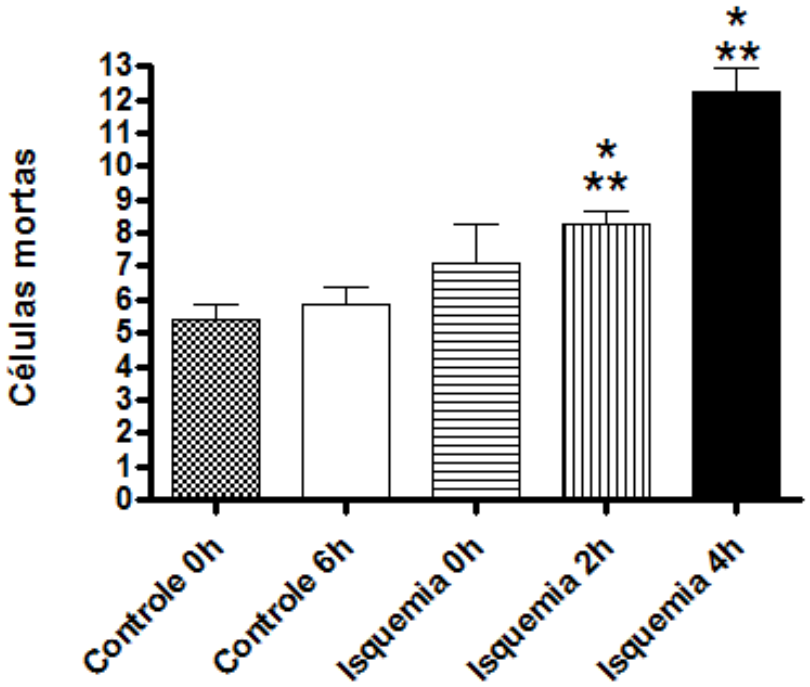


Figura 3: Avaliação da viabilidade neuronal em fatias de hipocampo de rato no modelo de isquemia *in vitro* . Porcetagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo controles 0h e 6h e isquemia 0h, 2h e 4h em relação à área selecionada.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle 0h

** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle 6h

Logo após o seccionamento do hipocampo, quatro fatias hipocampais foram separadas e imediatamente coradas com etídeo homodímero e analisadas no microscópio – controle 0h. O restante das fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 2h. Em seguida algumas fatias de hipocampo foram perfundidas por uma solução isquêmica (redução de glicose e de O2 e aeradas com N2), enquanto as outras fatias foram mantidas em solução normal - controle 6h. Imediatamente após esse insulto, um quarto das fatias - grupo isquemia 0h - foi retirado da câmara e imediatamente incubado na solução de marcação e posteriormente analisado no microscópio. Decorridas duas horas após a indução do insulto isquêmico, já no período de reperfusão, repetiu-se o procedimento descrito anteriormente, obtendo-se assim o grupo isquemia 2h. Após as quatro horas de reperfusão, repetiu-se o procedimento de marcação e análise no microscópio, obtendo-se, assim, os grupos controle 6h e isquemia 4h. Foram realizados 5 experimentos independentes, e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

4.2 Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol

O objetivo inicial foi investigar o efeito neuroprotetor do propofol em fatias de hipocampo de ratos submetidos a isquemia. Assim, para testar se essa droga seria capaz de alterar a morte celular na região CA1 do hipocampo, testamos, primeiramente, a concentração de 100 µM de propofol. Neste experimento utilizamos como controle positivo de neuroproteção a ω conotoxina MVIIC, que é bloqueador de canais de cálcio do tipo –N, –P/Q. Na figura 4, observa-se que o propofol na concentração de 100 µM foi capaz de induzir uma neuroproteção de 48,52±0,66% ($p < 0,05$), maior do que a neuroproteção de 31,25±0,87% ($p < 0,05$) obtida com a ω conotoxina MVIIC.

Posteriormente, foram avaliadas concentrações crescentes desse anestésico. As fatias de hipocampo de ratos foram perfundidas durante 1h30min com solução de LCEA contendo 10 mM de glicose e aerada com mistura carbogênica (fase de recuperação). Após este período, as fatias foram submetidas a um pré-tratamento durante 30 minutos com as seguintes condições: incubações com propofol nas concentrações de 1, 10, 30, 100 e 300 µM (Figura 5). Na figura 5 nota-se que o propofol foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a morte celular na região CA1 do hipocampo em todas as concentrações utilizadas. O IC_{50} (calculado da concentração efetiva capaz de reduzir em 50% a morte celular) foi de 33,18 µM (Figura 6). Observa-se que o propofol na concentração de 1 µM foi capaz de reduzir a morte de células em 21,11±1,65% ($p < 0,05$), valor muito próximo da neuroproteção obtida com a concentração de 10 µM, 21,9±1,71% ($p < 0,05$). Nas concentrações de 30 µM e 100 µM houve uma redução de 32,69±1,27% e 47,02±1,47% ($p < 0,05$), respectivamente, no número de células mortas comparado ao grupo que foi submetido ao insulto isquêmico. Entretanto, a concentração de 300 µM de propofol apresentou uma neuroproteção de 17,48±1,13% ($p < 0,05$), a menor dentre todas as concentrações testadas.

O efeito máximo de neuroproteção com o propofol foi obtido com a concentração de 100 µM. Portanto, com o objetivo de investigar o(s) mecanismo(s) relacionados à neuroproteção deste anestésico, foi utilizada a concentração de 30 µM nos próximos experimentos.

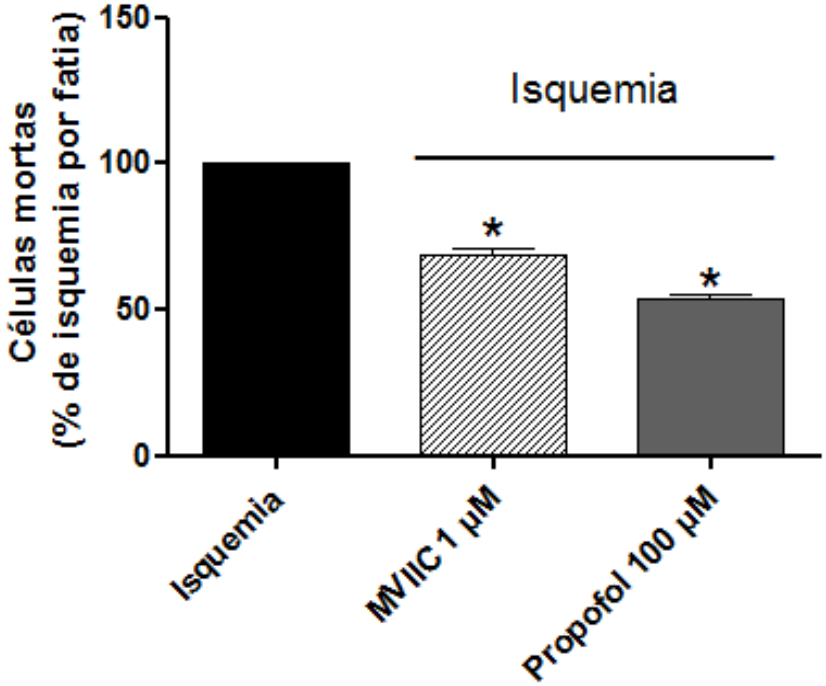


Figura 4: Efeito neuroprotetor do propofol 100 µM e da ω conotoxina MVIIC 1 µM em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo isquemiadas durante 20 minutos e, posteriormente, tratadas com ω conotoxina MVIIC (1 µM) e propofol (100 µM).

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo 1/3 das câmaras contendo as fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 1.0 µM de ω-conotoxina MVIIC, outro 1/3 das câmaras passou pelo mesmo processo de incubação com 100 µM de propofol . O restante das câmaras continuou a ser perfundido com solução normal. Em seguida as fatias foram banhadas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O2 e aerada com N2), com exceção das fatias que representam o grupo controle. Após o processo isquêmico, as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

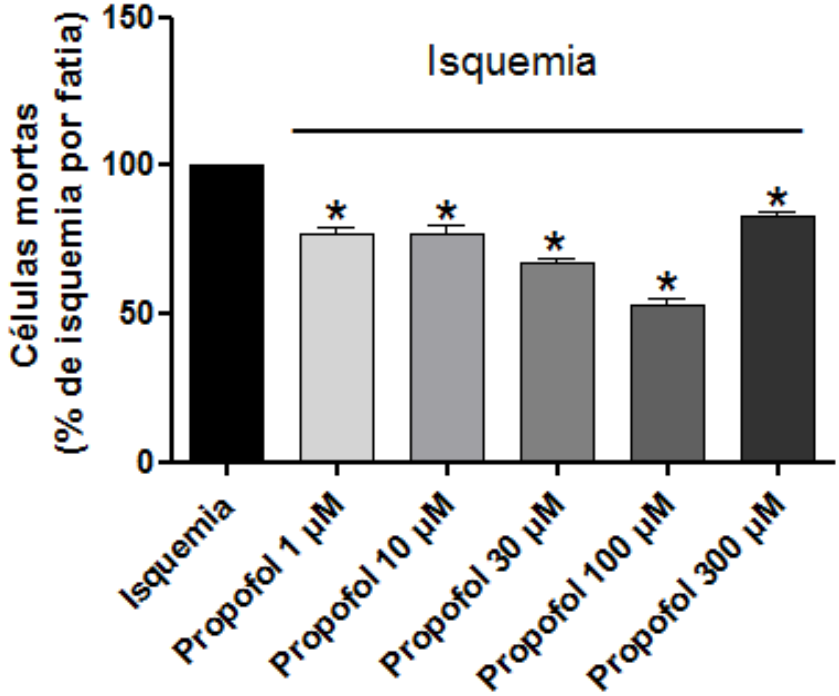


Figura 5: Dose resposta do propofol na porcentagem de células mortas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo isquemiadas por 20 minutos e, posteriormente, tratadas com propofol nas concentrações de 1, 10, 30, 100 e 300 µM e coradas com etídeo homodímero.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo as câmaras contendo as fatias foram submetidas a um processo de pré-incubação com propofol nas seguintes concentrações: 1, 10, 30, 100 e 300 µM de propofol. O restante das câmaras continuou a ser perfundido com solução normal. Em seguida as fatias foram banhadas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O_2 e aerada com N_2), com exceção das fatias que representam o grupo controle. Após o processo isquêmico, as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

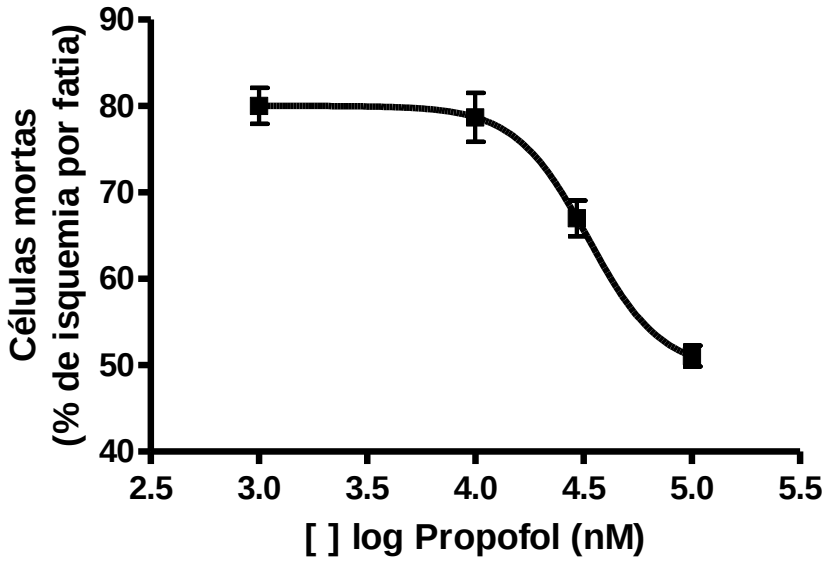


Figura 6: Dose resposta do propofol na porcentagem de células mortas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas.

4.3 Papel do Na^+ na neuroproteção do propofol na isquemia cerebral

O influxo de Na^+ através da membrana é um elemento fundamental no processo de despolarização e conseqüente liberação de neurotransmissores. Para investigar se o efeito neuroprotetor do propofol é dependente desses canais, utilizou-se a tetrodotoxina (TTX), potente inibidor de canais de sódio sensíveis à voltagem, que bloqueia a geração e a propagação do potencial de ação em tecidos excitáveis (Moore & Narahashi 1967).

Na figura 7 observa-se que o propofol na concentração de 30 µM foi capaz de induzir uma neuroproteção de 34,7±2,68% ($p < 0,05$) em relação ao tecido isquemiado, muito semelhante à neuroproteção de 29,91±1,28% ($p < 0,05$) obtida com a TTX.

No experimento seguinte, foi avaliado se o propofol apresenta o mesmo grau de neuroproteção ao apresentado anteriormente quando incubado na presença simultânea de TTX, com o objetivo de identificar se o anestésico apresenta ação bloqueadora dos canais de Na^+.

Verifica-se, na figura 8, que o propofol na concentração de 30 µM induziu uma neuroproteção de 35,60±2,84% ($p < 0,05$) em relação ao tecido isquemiado. A TTX 1 µM reduziu o número de células mortas em 25,58±2.11%, enquanto que as duas drogas somadas levaram a uma redução de 43,30±3.62% ($p < 0,05$). Assim, houve um efeito aditivo na presença das duas drogas, sugerindo que o propofol apresenta efeito neuroprotetor envolvendo mecanismos diferentes do bloqueio dos canais de Na^+ sensíveis à TTX, embora não se possa excluir o bloqueio destes canais pelo anestésico, uma vez que o grau de adição não foi pronunciado.

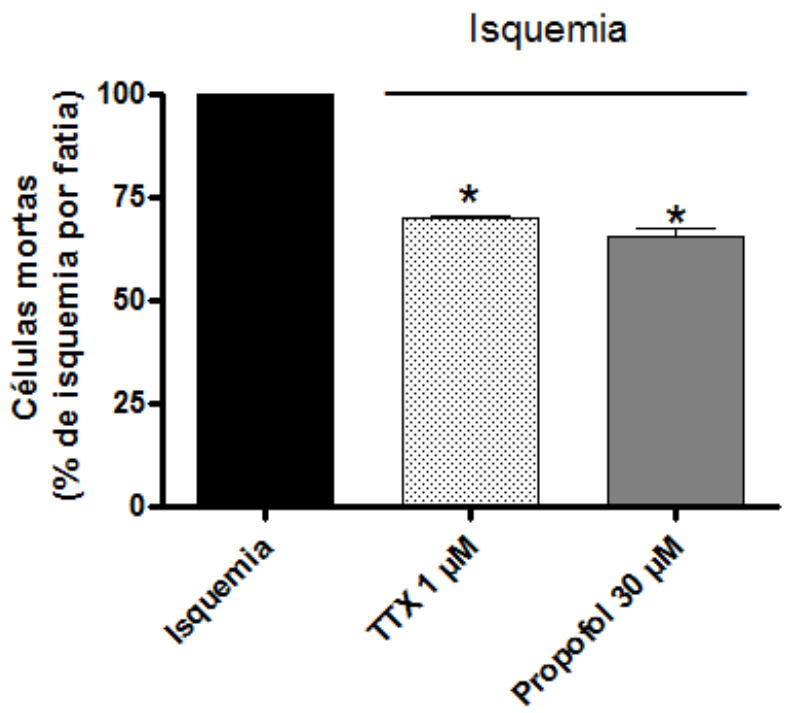


Figura 7: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM e da tetrodotoxina 1 µM em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo isquemiadas por 20 minutos e, posteriormente, tratadas com propofol 30 µM e tetrodotoxina 1 µM.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo as câmaras contendo as fatias foram submetidas a um processo de pré-incubação com as seguintes condições: LCEA com 1.0 µM de TTX e LCEA com 30 µM de propofol. O restante das câmaras continuou a ser perfundido com solução normal. Em seguida as fatias foram banhadas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O2 e aerada com N2), com exceção das fatias que representam o grupo controle. Após o processo isquêmico, as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 5 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

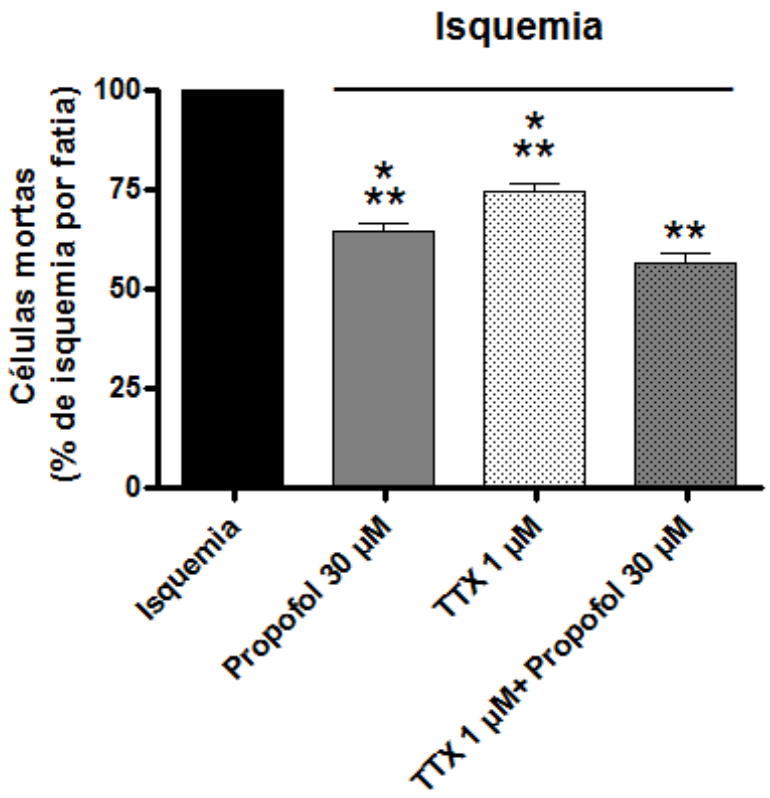


Figura 8: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM, da tetrodotoxina 1 µM e do efeito aditivo dessas drogas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo isquemiadas por 20 minutos e, posteriormente, tratadas com propofol 30 µM e tetrodotoxina 1 µM e propofol 30 µM + tetrodotoxina 1 µM.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo propofol 30 µM + tetrodotoxina 1 µM

* * $p < 0,05$ em relação ao grupo isquemia

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo as câmaras contendo as fatias foram submetidas a um processo de pré-incubação com as seguintes condições: LCEA com 1.0 µM de TTX, LCEA com 30 µM de propofol e LCEA com 1.0 µM de TTX e 30 µM de propofol. O restante das câmaras continuou a ser perfundido com solução normal. Em seguida as fatias foram banhadas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O2 e aerada com N2), com exceção das fatias que representam o grupo controle. Após o processo isquêmico, as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 5 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

4.4 Papel do Ca^{2+} na neuroproteção do propofol

O influxo de Ca^{2+} e a liberação de neurotransmissores durante a isquemia cerebral são elementos fundamentais na gênese do dano neuronal pós-isquemia (Choi 1988 e 1995, Ginsberg e cols 1995). Em condições fisiológicas, a liberação de neurotransmissores requer influxo de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico via canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (CCSV) (Katz & Miledi, 1967; revito por Neher, 1998). Desse modo, para testar a participação do Ca^{2+} extracelular na neuroproteção induzida pelo propofol, as fatias de hipocampo de ratos foram incubadas em meio contendo EGTA, um quelante do Ca^{2+} extracelular.

Na figura 9, pode-se perceber que o EGTA foi capaz de induzir uma neuroproteção de 38,70±0,37%, enquanto o propofol reduziu a morte das células em 33,67±3,95%. Entretanto, não se observou efeito somatório quando estavam presentes as duas condições (44,02±3,04%; $p > 0,05$), sugerindo que o Ca^{2+} extracelular está envolvido na neuroproteção induzida pelo propofol. Posteriormente, realizamos o mesmo experimento utilizando a ω conotoxina MVIIC, um bloqueador de CCSV do tipo N e P/Q. Na figura 10 observa-se que o propofol, na concentração de 30 µM, foi capaz de induzir uma neuroproteção de 32,84±1,19% ($p < 0,05$), a ω conotoxina MVIIC de 31,54±1,66% ($p < 0,05$) e as duas drogas somadas levaram a uma redução de 44,05±0,32% ($p < 0,05$ comparado ao propofol ou a ω conotoxina MVIIC). Assim, observa-se que a ω conotoxina MVIIC e o propofol apresentam efeitos somatórios em relação à neuroproteção, sugerindo que o propofol possa estar bloqueando CCSV diferentes do tipo N e P/Q.

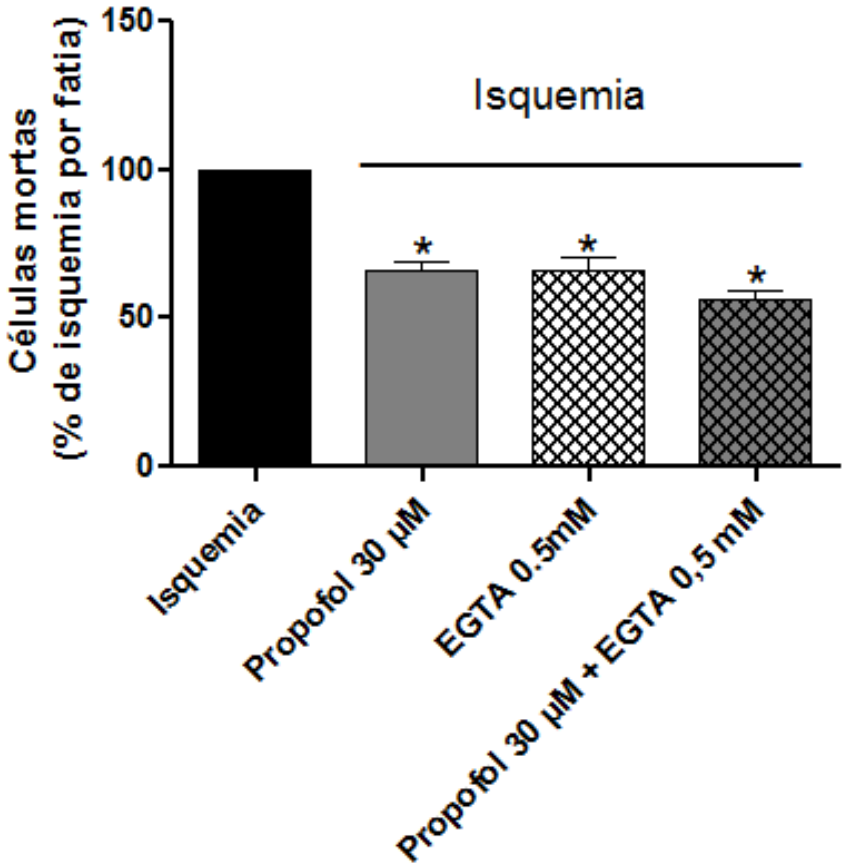


Figura 9: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM, do EGTA 0.5 mM e do efeito aditivo dessas drogas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo isquemiadas por 20 minutos e, posteriormente, tratadas com propofol 30 µM e EGTA 0.5 mM e propofol 30 µM + EGTA 0.5 mM.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo isquemia

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo as câmaras contendo as fatias foram submetidas a um processo de pré-incubação com as seguintes condições: LCEA com 0,5 mM de EGTA, LCEA com 30 µM de propofol e LCEA com 0,5 mM de EGTA e 30 µM de propofol. O restante das câmaras continuou a ser perfundido com solução normal. Em seguida as fatias foram banhadas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O2 e aerada com N2), com exceção das fatias que representam o grupo controle. Após o processo isquêmico, as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 5 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

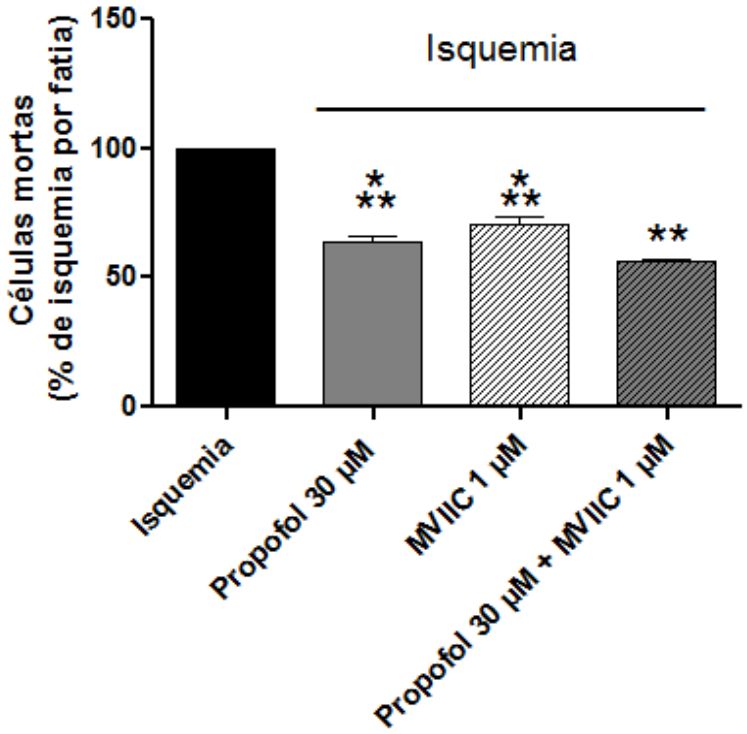


Figura 10: Efeito neuroprotetor do propofol 30 µM , da ω conotoxina MVIIC 1 µM e do efeito aditivo dessas drogas em fatias de hipocampo de ratos isquemiadas. Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo isquemiadas por 20 minutos e, posteriormente, tratadas com propofol 30 µM e ω conotoxina MVIIC 1 µM e propofol 30 µM + ω conotoxina MVIIC 1 µM.

* p< 0,05 em relação ao grupo propofol 30 µM + ω conotoxina MVIIC 1 µM

* * p< 0,05 em relação ao grupo isquemia

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo as câmaras contendo as fatias foram submetidas a um processo de pré-incubação com as seguintes condições: LCEA com 1.0 µM de ω conotoxina MVIIC, LCEA com 30 µM de propofol e LCEA com 1.0 µM de conotoxina MVIIC e 30 µM de propofol. O restante das câmaras continuou a ser perfundido com solução normal. Em seguida as fatias foram banhadas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O2 e aerada com N2), com exceção das fatias que representam o grupo controle. Após o processo isquêmico, as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução LCEA com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Para obtenção de imagens no microscópio, as fatias foram marcadas com etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 5 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Padronização do modelo experimental

O hipocampo possui uma das maiores taxas de consumo de oxigênio do cérebro (Nishizaki e cols 1988), o que o torna, particularmente, susceptível à privação de glicose e oxigênio produzida pelo modelo de isquemia cerebral *in vitro* (Pinheiro e cols 2009). Vários trabalhos já demonstraram, tanto em ratos (Kirino 1982 e Pulsinelli e cols 1982), quanto em humanos (Petito e cols 1987, Horn e Scholte 1992); que a isquemia transitória de curta duração resulta em uma perda seletiva de neurônios da região CA1. Com isso, o modelo de fatias de hipocampo tem sido muito usado para estudar os mecanismos de neurotoxicidade induzido pela isquemia e, para avaliar a eficácia de potenciais agentes terapêuticos neuroprotetores (Monette 1997).

Esse modelo experimental possui várias vantagens em comparação ao modelo *in vivo* na avaliação da eficácia de novos agentes terapêuticos. O custo e o tempo de execução dos experimentos são bem menores, além de ser menos complexo e permitir um melhor controle das variáveis envolvidas (Golderg e cols, 1997).

O ensaio de viabilidade celular utilizado em modelos *in vitro* geralmente compreende análise dos aspectos funcionais e morfológicos (Schwartz e cols 1995). A marcação com etídeo homodímero é um método relativamente simples e rápido para avaliar a viabilidade neuronal em fatias de hipocampo com 400μM de espessura sem a necessidade de agentes fixadores, como utilizado em outros métodos bioquímicos (Monette e cols 1997). Além disso, o uso da marcação com o etídio homodímero permitiu a realização de análises quantitativas das células mortas em cada experimento.

Outros métodos podem ser utilizados para avaliar a viabilidade neuronal em fatias cerebrais, como análises microscópicas convencionais, medidas bioquímicas e eletrofisiológicas (Ligenhöhl e cols 1997, Small e cols 1997 e 1995). As análises morfológicas utilizando microscopia convencional baseiam-se nas características de visualização morfológica de células necróticas ou apoptóticas como núcleo picnótico, rupturas na membrana e condensação nuclear. Esse método oferece dados morfológicos precisos, mas requer várias preparações do tecido como fixação, desidratação, marcação, inclusão em materiais específicos para realizar os cortes e o seccionamento. Após todo esse preparo do tecido, este é analisado para a contagem extremamente laboriosa de células mortas.

Outros métodos bioquímicos de viabilidade celular são utilizados, entre eles podemos citar o uso de marcadores da atividade mitocondrial, como o cloreto de trifeniltretazolio (TTC) (Glenner e cols 1969, Straus e cols 1948), que forma um depósito nas células com mitocôndria ativa. O método TTC não oferece resolução suficiente para análise de informações morfológicas, além disso, é necessária a realização de fixação e seccionamento das fatias. A liberação de lactato desidrogenase (Bickler e cols 1996, Gross e cols 1996, Koh e cols 1987), consumo de glicose e O_2 (Nishizaki e cols 1988, Vanderkooi e cols 1991) ou medida dos níveis de ATP também são usados pra avaliar a viabilidade neuronal (Nabetani e cols 1995, Tanimoto e cols 1987). Esses métodos são utilizados em modelos de cultura celular e em modelos *in vivo* de doenças neurodegenerativas. Embora possam ser usados em fatias cerebrais, estes não são facilmente aplicados nesses modelos.

Devido às vantagens supracitadas, utilizou-se o modelo de fatias de hipocampo, descrito por Monette 1997 e Pinheiro 2006, para avaliar o efeito do anestésico propofol na isquemia cerebral.

No presente estudo, verificou-se que foi possível adaptar o modelo experimental de fatias de hipocampo à câmara de perfusão Brandel S-120. A morte celular nas fatias que receberam o insulto isquêmico foi duas vezes maior, quando comparadas às fatias controle. É importante garantir que o insulto isquêmico seja intenso o suficiente para permitir a discriminação entre os grupos controle e isquemia, mas também não seja tão exagerado que possa levar a perda das células mortas na região de interesse (Monette 1997).

Com intuito de investigar morte neuronal nas fatias controle, realizou-se o ensaio de viabilidade celular durante o período de perfusão. Com os dados obtidos nesse experimento, observou-se que o grupo controle 0h (5,38), obtido logo após o corte das fatias, não difere estatisticamente do grupo controle 6h (5,85), obtido no final do período de perfusão. Assim, conclui-se que a maior parte da injúria no grupo controle não ocorre durante o período de perfusão na câmara Brandel S-120, sendo provavelmente decorrente do trauma da dissecação.

A lesão de reperfusão compreende alterações funcionais e estruturais que se tornam aparentes durante o reestabelecimento do fluxo sanguíneo após o período de isquemia (Evora 1996). Apesar da reperfusão ser essencial para a sobrevivência e retorno funcional de um órgão em isquemia, a chegada do fluxo sanguíneo causa várias lesões (Maximilien e cols 2009).

Dentro de poucos minutos após o início da reperfusão, inicia-se a formação de espécies reativas de oxigênio (Cerqueira e cols 2005, Cannon e cols 2005), estimulando a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de adesão nas células danificadas do tecido de reperfusão (Sorkine e cols 1995, Cuzzocrea 2004). Várias horas após o retorno do fluxo sanguíneo, neutrófilos e outras células inflamatórias são ativadas. Essas moléculas e células se aderem às membranas celulares (Arndt H e cols 1991, Vinten-Johansen 2004), aumentando a resposta inflamatória. Essa resposta inflamatória exarceba o dano tecidual.

Parks (1986) e Varadarajan (2004) demonstraram que o retorno do fluxo sanguíneo adequado ao fígado ou intestino após 3 horas de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusão; resulta na formação de mais membranas com necrose do que se esse mesmo órgão submetido a 4 horas de isquemia sem reperfusão. Corroborando esses dados, verificou-se no experimento de viabilidade celular que durante a perfusão o tecido submetido à isquemia e, posteriormente a 4 horas de reperfusão, apresentou uma maior proporção de células mortas (72,07%) em relação ao tecido submetido apenas à isquemia. Em conjunto, esses dados demonstram a importância da lesão de reperfusão em um tecido que sofreu uma injúria isquêmica.

5.2 Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol

O propofol é um agente intravenoso que é amplamente utilizado para a indução e manutenção da anestesia, bem como para a sedação nas unidades de terapia intensiva. Investigações laboratoriais têm demonstrado que o propofol possui várias propriedades farmacológicas que podem proteger o cérebro contra um evento isquêmico tais como: redução do fluxo sanguíneo cerebral, redução da taxa metabólica cerebral e da pressão intracraniana (Murphy e cols 1992); ação antioxidante, agindo como quelantes de radicais livres e reduzindo a peroxidação lipídica (Sagara e cols 1999; Wilson e Gelb 2002); inibição de receptores de glutamato (Zhan e cols 2001), ativação do receptor $GABA_A$ (Ito e cols 1998) e, redução do nível de glutamato extracelular pela inibição da liberação de glutamato dependente de canais de Na^+ e por aumentar a recaptação desse neurotransmissor (Sitar e cols 1999).

Devido a essas propriedades, o propofol tem sido testado em modelos de isquemia cerebral com a finalidade de avaliar o seu efeito neuroprotetor. Tanto resultados positivos (Sitar e cols 1999, Peters e cols 2001, Daskalopoulos e cols 2001, Velly e cols 2003) como negativos (Qi e cols 2002, Feiner e cols 2005) foram obtidos

de estudos *in vitro*. Da mesma forma, resultados conflitantes foram observados em estudos *in vivo*. Para compreender se esse agente é capaz de promover neuroproteção, neste trabalho, avaliou-se o efeito do propofol em modelo *in vitro* de isquemia cerebral em fatias de hipocampo de ratos.

No presente estudo, demonstrou-se que o propofol em concentrações clinicamente relevantes (Wilson e cols 2002, Feiner e cols 2005) é neuroprotetor em modelo de isquemia cerebral *in vitro*. Verificou-se que o propofol (1–300 μM) foi capaz de atenuar a morte nas células piramidais da região CA1 em fatias de hipocampo. O efeito máximo de neuroproteção foi observado na concentração de 100 μM e, paradoxalmente, verificou-se que a concentração de 300 μM de propofol produziu uma neuroproteção menor do que a observada em todas as outras concentrações. Em concentrações elevadas, o efito do propofol deixa de ser específico. Além disso, Martella e cols (2005) relataram que baixas concentrações de propofol inibem consistentemente a fração persistente da corrente de Na^+, enquanto que altas concentrações (± 300 μM) possuem efeitos negligíveis no componente rápido das correntes de Na^+.

Vários estudos corroboram esse achado. Adembri e cols (2007) relataram que o propofol (10–100 μM) foi capaz de diminuir, logo após o insulto isquêmico e 24 h depois, a injúria na região CA1 em fatias de hipocampo submetidas à deprivação de glicose e oxigênio (DGO). Entretanto, Feiner e cols (2005) não conseguiram demonstrar neuroproteção com o propofol (10–100 μM) em um modelo semelhante de fatias de hipocampo. Velly e cols (2003) encontraram que o propofol nas concentrações de 0,05–10 μM apresentou efeito neuroprotetor em um modelo de DGO. Adicionalmente, este estudo reportou que o propofol é capaz de atenuar o aumento da concentração de glutamato extracelular e a redução da recaptação desse neurotransmissor durante o período de DGO. Foi demonstrado que o propofol, em concentrações clinicamente relevantes, é neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral *in vitro* e *in vivo* efeito este podendo estar relacionado à prevenção do edema mitocondrial dos neurônios (Adembri e cols, 2007). Além disso, vários modelos *in vivo* de isquemia global e focal têm demonstrado o efeito neuroprotetor do propofol. Em um modelo de isquemia transitória focal em ratos, o propofol reduziu o tamanho do infarto e melhorou as funções neurológicas de maneira equivalente ao pentobarbital (Pittman e cols 1997). Em um modelo similar, o propofol promoveu uma neuroproteção maior do que a obtida com o isoflurano.

O provável efeito neuroprotetor deste anestésico venoso pode estar relacionado

com a habilidade de suprimir a atividade simpática e a resposta de estresse relacionada à hipotensão e isquemia. Catecolaminas circulantes têm sido implicadas como responsáveis pela injúria neuronal durante a isquemia incompleta em decorrência do aumento da atividade metabólica cerebral. De fato, sugere-se que o aumento na concentração de catecolaminas e neurotransmissores excitatórios no tecido cerebral pioram a injúria cerebral isquêmica (Globus e cols 1989, Bhardwaj e cols 1990, Stein e cols 1982).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos neuroprotetores do propofol incluindo redução do consumo de oxigênio cerebral (Kochs e cols 1992), atividade antioxidante (Sitar e cols 1999), ativação de receptores $GABA_A$ (Buggy e cols 2000), inibição de receptores de glutamato (Orser e cols, 1995) e, redução da liberação de glutamato dependente dos receptores Na^+-dependente de glutamato (Lingamaneni e cols 2001).

O propofol suprime completamente o aumento da concentração plasmática de catecolaminas e, reduz a concentração de catecolaminas e glutamato no tecido cerebral isquêmico (Engelhard e cols 2003). Outros trabalhos também demonstraram que este anestésico diminui a concentração cerebral de catecolaminas e glutamato durante a isquemia quando comparado com o grupo controle (Yano e cols 2000, Hans e cols 1994). Entretanto, estudo em ratos demonstrou que concentrações de propofol que produzem supressão das ondas do eletroencefalograma melhoram a evolução neurológica após isquemia incompleta, mas que esta resposta não pode ser explicada completamente pela redução das catecolaminas circulantes (Yamasaki e cols 1999). Outros possíveis mecanismos seriam modulação de fatores pró e anti-apoptóticos, bem como a ação antioxidante (Engelhard e cols 2004, Acquaviva e cols 2004) .

5.3 Papel do Na^+ na neuroproteção do propofol na isquemia cerebral

O Na^+ é o cátion com maior concentração no espaço extracelular e, o seu influxo durante o processo isquêmico está implicado na morte neuronal por excitoxicidade (Mongin 2007). O aumento inicial de Na^+ após a isquemia e a despolarização persistente, juntamente com o rápido declínio na concentração de ATP e distúrbio na homeostase iônica resultam na sobrecarga de Ca^{2+} (Brahma e cols 2009). Os bloqueadores de canais de Na^+ inibem a despolarização neuronal, a liberação de glutamato, o influxo de Na^+ e, consequentemente, reduzem o influxo de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, pelo receptor NMDA e pelo trocador

Na^+/Ca^{2+} (Taylorc e cols 1995).

Os anestésicos gerais agem de maneira específica na transmissão sináptica no sistema nervoso central, por meio do aumento da transmissão inibitória e redução da transmissão excitatória (Hemmings 2009, Adembri e cols 2007). Os mecanismos de ação desses anestésicos envolvem efeitos pré-sinápticos, como a liberação de transmissores, e pós-sinápticos, ação nos receptores. Os anestésicos voláteis inibem os canais de Na^+ sensíveis à voltagem (CSSV) em concentrações clínicas. A redução da liberação de neurotransmissores por essa classe de anestésicos envolve a inibição do potencial de ação conseqüente ao bloqueio dos canais de Na^+. Embora têm sido assumido que os canais de íons sensíveis à voltagem sejam insensíveis aos anestésicos gerais, estudos mais recentes têm deixado evidente que concentrações clínicas de anestésicos voláteis inibem canais de Na^+. Assim, CSSV têm emergido como um alvo promissor de alguns anestésicos, como o propofol (Hemmings 2009).

Então, para avaliar o papel dos canais de Na^+ na neuroproteção induzida pelo propofol, utilizamos a TTX - um bloqueador de CSSV. O resultado obtido indica que o propofol apresenta efeito neuroprotetor envolvendo mecanismos diferentes do bloqueio dos canais de Na^+ sensíveis à TTX, visto que houve efeito somatório no grupo que foi tratado com as duas drogas. Embora tenha se observado efeito aditivo com o propofol e a TTX, não se pode excluir o bloqueio destes canais pelo anestésico, uma vez que o grau de adição não foi pronunciado e há canais de Na^+ resistentes ao bloqueio da TTX. De fato, o efeito do propofol em canais de Na^+ já está bem descrito. Amorim e cols relataram que o propofol foi capaz de inibir o aumento do conteúdo de Na^+ em fatias de hipocampo submetidas à anóxia. Ratnakumari e cols (1997) descreveram o papel dos canais de Na^+ como alvos moleculares de anestésicos gerais. Neste mesmo estudo, esses pesquisadores sugeriram que alguns dos efeitos do propofol e, provavelmente de anestésicos voláteis (Bickler e cols 2005, Frenkel e cols 1993), possam resultar da inibição pré-sináptica da liberação de glutamato dependente de canais de Na^+.

A ação do propofol em canais de Na^+ neuronais tem sido demonstrada por várias técnicas neuroquímicas independentes (Lingamaneni and Hemmings 2003). Em um experimento de “binding”, o propofol apresentou uma ação inibitória significativa sobre os canais de Na^+ (Lingamaneni e cols 2003). Em sinaptossomas de ratos, o propofol inibiu a liberação de glutamato estimulada por vetratridina (IC_{50}=14 µM) com maior potência do que a liberação estimulada por KCl (IC_{50} > 50 µM). Este resultado revela que os canais de Na^+ pré-sinápticos são mais sensíveis à inibição pelo propofol

do que os canais de Ca^{2+} associados à liberação de glutamato (Ratnakumari e cols 1997, Lu e cols 2009).

5.4 Papel do Ca^{2+} na neuroproteção do propofol

O Ca^{2+} possui um papel único na patofisiologia da isquemia cerebral. Visto que o aumento da concentração intracelular desse íon causa vários danos às células, tais como: ativação de várias enzimas dependentes de Ca^{2+}, como fosfolipases A2 e C, proteína quinase C, ciclooxigenase, NO sintetase dependente de Ca^{2+} e várias proteases e endonucelases. Como resultado, ocorre a formação de produtos citotóxicos, como os radicais livres e os leucotrienos; inflamação e dano mitocondrial, culminando com a morte celular por necrose ou apoptose (Fisher and Schaebitz, 2000; McIlvoy, 2005). O Ca^{2+} entra nos neurônios via receptores NMDA, AMPA, CCSV e reversão da operação trocador de Na^{+}/Ca^{2+}. Adicionalmente, ocorre a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos presentes no RE, mitocôndria e vesículas sinápticas, contribuindo para o aumento do Ca^{2+} intracelular (Durukan e cols 2007).

Considerando a grande importância do Ca^{2+} no processo isquêmico, um dos objetivos deste trabalho foi investigar se o efeito neuroprotetor do propofol está associado ao Ca^{2+}. Para verificar se o Ca^{2+} extracelular possui relevância no efeito neuroprotetor promovido pelo propofol, utilizou-se o EGTA (quelante de cálcio extracelular). Os resultados obtidos neste experimento sugerem que o Ca^{2+} extracelular está envolvido na neuroproteção induzida por esse agente anestésico, uma vez que o grupo tratado com o EGTA e o propofol não apresentou efeito somatório. Assim, estes dados sugerem que o EGTA e o propofol apresentam mecanismo semelhante de neuroproteção, ou seja, diminuição do influxo de Ca^{2+} neuronal. Corroborando esse resultado, Buljubasic e cols (1996) demonstraram que o efeito cardioprotetor do propofol é decorrente do bloqueio de canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, com conseqüente redução da sobrecarga de Ca^{2+}. Além disso, Barhoumi e cols (2007) também observaram que o propofol é capaz de afetar a homeostase do Ca^{2+} por meio da redução do influxo desse íon pelos CCSV e, alteração dos canais K^{+}-ATP mitocondriais.

Após a observação que o propofol diminui o influxo de Ca^{2+} extracelular, investigou-se se os CCSV dos tipos -N, -P/Q estariam envolvidos na neuroproteção mediada por esse anestésico. Os CCSV dos tipos -P/Q contribuem significativamente na liberação de glutamato *in vitro* (Valentino e cols 1993), e na transmissão sináptica

hipocampal (Igelmund e cols 1996, Wheeler e cols 1994), fazendo desses canais interessantes alvos terapêuticos na morte neuronal por excitoxicidade. Entretanto, a toxicidade *in vivo* dos antagonistas desses canais tem prejudicado esses estudos. Vários bloqueadores de CCSV do tipo –N têm sido testados com sucesso em modelos in vivo de isquemia cerebral (Valentino e cols 1993). Para avaliar a ação desses CCSV na neuroproteção obtida pelo propofol, utilizou-se a ω conotoxina MVIIC – um bloqueador de CCSV dos tipos -N, -P/Q. Os dados obtidos neste experimento indicam que o propofol a ω conotoxina MVIIC apresentam efeitos somatórios em relação à neuroproteção, sugerindo que o propofol apresenta mecanismos adicionais ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} do tipo –N, -P/Q. De fato, Tetsuhiro e cols (2003) observaram que a inibição dos CCSV dos tipos –N está relacionada ao efeito anestésico do halotano, mas não do propofol. Corroborando nossos resultados, o propofol, em culturas de neurônios corticais, reduz seletivamente as correntes de Ca^{2+} tipo –L, que representa 25% da condutância total do Ca^{2+}, sem afetar os canais de tipos Ca^{2+} –P/Q e –N (Martella e cols 2005).

Até o presente momento, a maior parte da literatura descreve o efeito dos anestésicos gerais, incluindo o propofol, na inibição dos canais de Ca^{2+} do tipo –T (Todorovic e cols 1998, Joksovic e cols 2005) e na inibição dos canais do tipo –L **(**Liu e cols 2008, Martella e cols, 2005; Shigemura e cols, 1999), havendo poucos relatos sobre o efeito desse anestésicos nos outros CCSV. Assim, novos estudos são necessários para investigar os tipos de canais de CCSV envolvidos na neuroproteção induzida pelo propofol.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Baseado nos dados apresentados, sugere-se que o propofol apresenta efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo submetidas à deprivação de glicose e oxigênio. O mecanismo desta neuroproteção parece envolver a redução do influxo de Na^{+} e Ca^{2+} neuronal. Em relação ao Ca^{2+}, os dados do presente estudo sugerem que este bloqueio ocorre através de canais de Ca^{2+} diferentes dos tipos -N, -P/Q. Entretanto, estudos clínicos são necessários para avaliar a possibilidade da utilização deste agente nos casos de isquemia cerebral. Da mesma forma, novas investigações são necessárias para se determinar o tempo ótimo entre a administração do propofol e o evento isquêmico assim como, a duração do efeito neuroprotetor (curto ou longo prazo) induzido por este agente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acquaviva R., Campisi A., Murabito P., Raciti G., Avola R., Mangiameli S., Musumeci I., Barcellona ML., Vanella A., Volti G. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astocytes. Anesthesiology 2004; 101:1363-71.

2. Adembri C., Venturi L., Tani A., Chiarugi A., Gramigni E., Cozzi A., Pancani T., Gudio RA., Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia. Anesthesiology 2007; 104:80-9.

3. American Heart Association. Heart and Stroke Facts Statistics: Dallas: American Heart Association, 1997.

4. Amorim P, Chambers G, Cottrell J, Kass IS. Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the changes in calcium, potassium, and sodium during hyperthermic anoxia in the rat hippocampal slice. Anesthesiology. 1995 Dec;83(6):1254-65.

5. Aoki H., T. Mizobe, S. Nozuchi and N. Hiramatsu, In vivo and in vitro studies of the inhibitory effect of propofol on human platelet aggregation, Anesthesiology 88 (1998), pp. 362–370.

6. Armstrong D.L., The hippocampal tissue slice in animal models of CNS disorders, Neurosci. Biobehav. Rev. 15 1991. 79–83.

7. Arndt H, Kubes P, Granger DN. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury in the small intestine. Klin Wochenschr. 1991 Dec 15;69(21-23):1056-60b.

8. Arundine, K.M & Tymianski, M. Enhanced vulnerability to NMDA toxicity in sublethal traumatic neuronal injury in vitro. Journal Neurotrauma, v.20 (12), p.1377-1395, 2003.

9. Asahi T, Hirota K, Sasaki R, et al. Intravenous anesthetics are more effective than volatile anesthetics on inhibitory pathways en rat hippocampal CA1. Anesth Analg 2006; 102:772-778.

10. Barhoumi R., Robert C. Burghardt, Yongchang Qian, Evelyn Tiffany-Castiglioni. Effects of propofol on intracellular Ca2+ homeostasis in human astrocytoma cells. Brain Research 1145 (2007) 11-18.

11. Bayona N.A., gelb A., Jiang Z., Wilson J., Urquhart BL., Cechetto D. Propofol neuroprotection in cerebral ischemia and its effects on low-molecular-weight antioxidants and skilles motor tasks. Anesthesiology 2004; 100:151-9.

12. Bhardwaj A, Brannan T, Martinez-Tica J, Weinberger J. Ischemia in the dorsal hippocampus is associated with acute extracellular release of dopamine and norepinephrine. J Neural Transm Gen Sect. 1990;80(3):195-201.

13. Bickler PE, B.M. Hansen, a2-Adrenergic agonists reduce glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices during hypoxia, Neuropharmacology 1996. 679–687.

14. Bickler PE, Buck LT, Feiner JR: Volatile and intravenous anesthetics decrease glutamate release from cortical brain slices during anoxia. Anesthesiology 1995; 83:1233-40.

15. Brahma MK, Dohare P, Varma S, Rath SK, Garg P, Biswal PK, Chowdhury PD, Ray M. The neuronal apoptotic death in global cerebral ischemia in gerbil: important role for sodium channel modulator. J Neurosci Res. 2009 May 1;87(6):1400-11.

16. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. Clin Neurol Neurosurg. 2009 Jul;111(6):483-95.

17. Buljubasic N, Marijic J, Berczi V, Supan DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Differential effects of etomidate, propofol, and midazolam on calcium and potassium channel currents in canine myocardial cells. Anesthesiology. 1996 Nov;85(5):1092-9.

18. Buggy DJ, Nicol B, Rowbotham DJ, Lambert DG. Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release: a role for GABAA receptor-mediated inhibition.Anesthesiology. 2000 Apr;92(4):1067-73.

19. Cannon RO 3rd. Mechanisms, management and future directions for reperfusion injury after acute myocardial infarction. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2005 Feb;2(2):88-94. Review.

20. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. Acta Cir Bras. 2005 Jul-Aug;20(4):336-43. Epub 2005 Jul 18.

21. Chen, Z.L. and Strickland, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. (1997) Cell 91, 917–925.

22. Choi DW.Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends Neurosci. 1988 Oct;11(10):465-9. Review.

23. Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. Trends Neurosci. 1995 Feb;18(2):58-60. Review.

24. Concas A, Santoro G, Serra M, Sanna E, Biggio G. Neurochemical action of the general anaesthetic propofol on the chloride ion channel coupled with GABAA receptors. Brain Res. 1991 Mar 1;542(2):225-32.

25. Cuzzocrea S. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury. Vascul Pharmacol. 2004 Jul;41(6):187-95. Review

26. Dandoy M., F. Poisson, E. Lampl, S. Reynaud, S. Rondet, M.N. Proust, A. Mallet and J.P. Maurin, [Anaesthesia using propofol during surgery of strabismus in children. A comparison of two different protocols of induction and maintenance], Cah. Anesthésiol. 38 (1990), pp. 241–245.

27. Daskalopoulos R., Norcok J., Farhangkhgoee P, Karmazyn M., Gelb A., Wison J. Propofol protection of sodium-hydrogen exchange activity sustains glutamate uptake during oxidative stress. Anesth Analg 2001;93:1199-1204.

28. De Flora A, Franco L, Guida L, Bruzzone S, Zocchi E. Extracellular CD-38-catalyzed synthesis and intracellular (Ca2+)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. Cell Biochem. Biophys., v.28(1), p.45-62, 1998.

29. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci. 1999 Sep;22(9):391-7. Review.

30. Dong X.P. and T.L. Xu, The actions of propofol on gamma-aminobutyric acid-A and glycine receptors in acutely dissociated spinal dorsal horn neurons of the rat, Anaesth. Analg. 95 (2002), pp. 907–914.

31. Donnan GA, Fisher M, Macleod M,Davis SM. Stroke. Lancet 2008; 371: 1612–23.

32. Dugan, L.L. and Choi, D.W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. (1994) Ann. Neurol 35, S17–S21.

33. Durukan A., Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 87 (2007) 179–197.

34. Engelhard K., C. Werner, E. Eberspacher, M. Pape, U. Stegemann, K. Kellermann, R. Hollweck, P. Hutzler and E. Kochs, Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation, Anesthesiology 101 (2004), pp. 912–917.

35. Engelhard K., C. Werner, Hoffman WE et al. The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. Anesth Analg 2003; 97:1155-61.

36. Fairchild M.D., J.E. Parsons, C.G. Wasterlain, P.C. Rinaldi, R.A.Wallis, A hypoxic injury potential in the hippocampal slice, BrainRes. 453 1988. 357–361.

37. Feiner J.R., Bickler P.E., Estrada S., Donohoe P.H., FahlmanC.S., Schuyler J.N. Mild hypothermia, but not propofol, is neuroprotective in organotypic hippocampal cultures. Anesth Analg 2005;100:215-25.

38. Fisher M, Schaebitz W. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. Arch Intern Med. 2000 Nov 27;160(21):3196-206.

39. Frandsen, A., Schousboe, A. Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualato and N-methil-D-aspartate but not by 2-amino-3- (3-hydroxy-5 methylisoxazols-4-propionate) and kainite in cultured cerebral cortical neurons. PNAS, v. 89(7), p.2590-2594, 1992.

40. Franks NP, Honoré E. The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. Trends Pharmacol Sci. 2004 Nov;25(11):601-8.

41. Frenkel C, Duch DS, Urban BW: Effects of i.v. anaesthetics on human brain sodium channels. Br J Anaesth 1993; 71:15-24.

42. Furukawa, K. et al. : The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. (1997) J. Neurosci. 17, 8178–8186.

43. Gaugain, B., Barbet, J., Oberlin, R., Roques, B. P., & Le Pecq, J. B. DNA bifunctional intercalators. I. Synthesis and conformational properties of an ethidium homodimer and of an acridine ethidium heterodimer. Biochemistry, v.17, p. 5071-5078,1978.

44. Gelb A.W., N.A. Bayona, J.X. Wilson and D.F. Cechetto, Propofol anaesthesia compared to awake reduces infarct size in rats, Anesthesiology 96 (2002), pp. 1183–1190.

45. Gert, TH., Hautvast, R. W. M., DE Jongstone, M. J., e Korf, J., Neuroanatomy of cardiac activity regulating circuitry; a transneuronal viral tracing study in the rat., Eur. J. Neuroscience, 8 (1997) 101-113.

46. Glen J.B. and S.C. Hunter, Pharmacology of an emulsion formulation of ICI 35 868, Br. J. Anaesth. 56 (1984), pp. 617–626.

47. Glen J.B., Animal studies of the anaesthetic activity of ICI 35 868, Br. J. Anaesth. 52 (1980), pp. 731–742.

48. Glenner G.G., Tetrazolium salts, in: R.D. Little _Ed.., H.J. Conn's Biological Stains, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD,1969, pp. 154–162.

49. Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdés I, Ginsberg MD. Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1989 Dec;9(6):892-6.

50. Goldberg MP, Strasser U, Dugan LL. Techniques for assessing neuroprotective drugs in vitro. Int Rev Neurobiol. 1997;40:69-93.

51. Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and systemic mechanisms of general anesthesia: "the multiple mechanisms concept. Curr Opn Anaesthesiol 2005, 18:386-391.

52. Gross J., U. Ungethum, N. Andreeva, J. Heldt, F. Priem, G. Marschhausen, T. Altmann, Glutamate-induced efflux of protein, neuron-specific enolase and lactate dehydrogenase from a mesen-cephalic cell culture, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1996.305–310.

53. Hallenbeck, JM., Dutka, A.J.Background review and current concepts of reperfusion injury. Arch. Neurol, v.47(11) (1990), p.1245-54.

54. Hans P, Bonhomme V, Collette J, Albert A, Moonen G. Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. J Neurosurg Anesthesiol. 1994 Oct;6(4):249-53.

55. Hemmings Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. British Journal of Anaesthesia 103 (1): 61–9 (2009).

56. Hokey D.A., A.T. Larregina, G. Erdos, S.C. Watkins and L.D. Falo Jr., Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity, Cancer Res. 65 (2005), pp. 10059–10067

57. Horn M, Schlote W (1992) Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. Acta Neuropathol 85:79–87.

58. Igelmund P, Zhao YQ, Heinemann U. Effects of T-type, L-type, N-type, P-type, and Q-type calcium channel blockers on stimulus-induced pre- and postsynaptic calcium fluxes in rat hippocampal slices. Exp Brain Res. 1996 Apr;109(1):22-32.

59. Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H (1999)Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. ActaAnaesthesiol Scand 43:153–162.

60. Joksovic PM., BC Brimelow, J Murbartian, Edward Perez-Reyes, ST Todorovic. Contrasting anesthetic sensitivities of T-type Ca2þ channels of reticular thalamic neurons and recombinant Cav3.3 channels. British Journal of Pharmacology (2005) 144, 59–70.

61. Jost U., Dorsing C., Jahr C., Hirschauer M. Propofol and postoperative nausea and/or vomiting. Anaesthesist 46,776-782, 1997.

62. Katsura, K., Kristian, T. and Siesjo, B.K. (1994) Biochem. Soc.Trans. 22, 991–996.

63. Katz, B. & Milledi, R. 1967. Ionic requirements of synaptic transmitter release. Nature. 215: 651.

64. Kawagugui M., Furuya H., Patel P.M. Neuroprotective effects of anesthetic agents. J Anesth (2005) 19:150-156.

65. Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 239:57–69.

66. Kochs E, Hoffman WE, Werner, et al. The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. Anesthesiology 1992;76:245-52.

67. Knollemma, S., Knigge, M.F., Jansen, H.M.L., Gert, H.T., Korf, J., Minderhoud, J. M., E Meyboom-DE Jong, B., Het cerebrovasculair accident in de praktijk, Patient care, v.22, p. 21-32, 1995.

68. Koh J.Y., D.W. Choi, Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay, J. Neurosci. Methods 1987. 83–90.

69. Koerner IP, Brambrink AM. Brain protection by anesthetic agents. Curr Opin Anaesthesiol. 2006 Oct;19(5):481-6. Review.

70. Koike,T., Martin, DP., Johnson, FM JR. Role of Ca2+channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by throfic factor deprivation: evidence that levels of internal Ca2+determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglions cells. PNAS, v.86(16), p. 6421-6425, 1989.

71. Kurt M, S.S. Bilge, O. Kukula, S. Celik and Y. Kesim, Anxiolytic-like profile of propofol, a general anaesthetic, in the plus-maze test in mice, Pol. J. Pharmacol. 55 (2003), pp. 973–977.

72. Lee H, Jang YH, Lee SR. Protective effect of propofol against kainic acid-induced lipid peroxidation in mouse brain homogenates: comparison with trolox and melatonin. J Neurosurg Anesthesiol. 2005 Jul;17(3):144-8.

73. Ligenhöhl K, D.L. Small, R. Monette, A.M. Buchan, P.R. Allegrini, W. Fro¨stl, D. Sauer, M. Schmutz, T. Kno¨pfel, Exploration of P-type Ca2q channels as

drug targets for the treatment of epilepsy or ischemic stroke, Neuropharmacology 1997. 107–113.

74. Lingamaneni R. and H. C. Hemmings Jr. Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na+ channels, Ca2+ channels, and GABAA receptors. British Journal of Anaesthesia 90 (2): 199±211 (2003).

75. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons Physiol Rev. 1999 Oct;79(4):1431-568.

76. Liu Yen-Ching, Ya-Jean Wang , Sheng-Nan Wu. The mechanisms of propofol-induced block on ion currents in differentiated H9c2 cardiac cells. European Journal of Pharmacology 590 (2008) 93–98.

77. Lu C. ,Tzu-Yu Lin,Han-Sun Chiang, Su-Jane Wang. Facilitation of Glutamate Release From Rat Cerebral Cortex Nerve Terminal by Subanesthetic Concentration Propofol. Synapse 63:773–781 (2009).

78. Martella G., C. Persis, P. Bonsi, S. Natoli, D. Cuomo, G. Bernardi, P. Calabresi, A. Pisani. Inhibition of Persistent Sodium Current Fraction and Voltage-gated L-type Calcium Current by Propofol in Cortical Neurons: Implications for Its Antiepileptic Activity. Epilepsia, 46(5):624–635, 2005.

79. Martin, RL. Lloyd, H.G. and Cowan, A. I. (1994) Biochem. Soc. Trans. 22, 251-257.

80. Mathy-Hartert, A. Mouithys-Mickalad, S. Kohnen, G. Deby-Dupont, M. Lamy and P. Hans, Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxynitrite donor (SIN-1), Anaesthesia 55 (2000), pp. 1066–107.

81. Maximilien J. Gourdin, Bernard Bree and Marc De. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. European Journal of Anaesthesiology 2009, 26:537-547

82. McCollum J.S., K.R. Milligan and J.W. Dundee, The antiemetic action of propofol, Anaesthesia 43.

83. McCullough L.D. and P.D. Hurn, Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view, Trends Endocrinol. Metab. 14 (2003), pp. 228–235.

84. Mcilvoy LH. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. AACN Clin Issues. 2005 Oct-Dec;16(4):488-500. Review.

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

86. Monette, R., Small, D. L., Mealing, G., & Morley, P. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. Brain Res.Brain Res.Protoc., v.2, p. 99-108, 1998.

87. Mongin AA . Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. Pathophysiology. 2007 Dec;14(3-4):183-93. Epub 2007 Oct 25.

88. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of theworld: Global Burden of Disease Study. Lancet 1997;349:1269–76.

89. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol(2,6-diisopropylphenol). Br J Anaesth (1992) 68:613–618.

90. Nabetani, Y. Okada, S. Kawai, H. Nakamura, Neural activity andthe levels of high energy phosphates during deprivation of oxygenandror glucose in hippocampal slices of immature and adult rats,Int. J. Dev. Neurosci. 13 _1995. 3–12.

91. Nehls, D.G., Park, C.K. and McCulloch. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. (1989) J. Cereb. BloodFlow Metab. 9, S376–S376.

92. Neher, E. 1998. Vesicle pools and Ca2+ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. Neuron. 20:389-399.

93. Nishizaki T, Yanaychi R, Tanimoto M, Okada Y. 1988. Effects of temperature on the oxygen consumption in thin slices from different brain regions. Neurosci Lett 86:301–305.

94. Orser BA, Wang LY, Pennefather PS, MacDonald JF. Propofol modulates activation and desensitization of GABAA receptors in cultured murine hippocampal neurons. J Neurosci. 1994 Dec;14(12):7747-60.

95. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol. 1986 Jun;250(6 Pt 1):G749-53.

96. Paschen, W. Calcium neurotoxicity. Journal Neurochemistry, v. 72(6), p.2625-2626, 1999.

97. Paschen, W. Role of calcium in neuronal all injury wich subcellular compartment involved. Brain Research Bulletin, v. 5394), p.409-413, 2000.

98. Paschen, W. Endoplasmatic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. Cell Calcium, v. 34(4-5), p. 369-383, 2003.

99. Peters CE, Korcok J, Gelb AW, Wilson JX. Anesthetic concentrations of propofol protect against oxidative stress in primary astrocyte cultures: comparison with hypothermia. Anesthesiology. 2001 Feb;94(2):313-21.

100. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum FA (1987) Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology 37:1281–1286.

101. Petito CK, Pulsinelli WA (1984) Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. J Cereb Blood Flow Metab 4:194–205.

102. Pinheiro AC, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, De Marco L, Gomez MV. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider Phoneutria nigriventer. Neurochem Int. 2006 Oct;49(5):543-7. Epub 2006 Jun 6.

103. Pinheiro AC, da Silva AJ, Prado MA, Cordeiro MD, Richardson M, Batista MC, de Castro Junior CJ, Massensini AR, Guatimosim C, Romano-Silva MA, Kushmerick C, Gomez MV. Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. Hippocampus. 2009 Apr 15.

104. Pittman JE, Sheng H, Pearlstein R et al. Comparasion of the effects of propofol and pentobarbital on neurologic out come an d cerebral infarct size after temporary focal ischemia in the rat. Anesthesiology 1997;14:230-6.

105. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol 11:491–498.

106. Pulsinelli W., The ischemic penumbra in stroke. Sci Am Sci Med., 2 (1995) 16-25.

107. Qi S, Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Shimoji K. The effects of thiopental and propofol on cell swelling induced by oxygen/glucose deprivation in the CA1 pyramidal cell layer of rat hippocampal slices. Anesth Analg. 2002 Mar;94(3):655-60; table of contents.

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

109. Ricci, S., CELANI, M. G., La Rosa, F., Vitali, R., Duca, E., Ferragzu, R., Paolotti, M., Seppolini, D., Caputo O., e Chiurulla, C. A community based study of incidence and risk factors and outcome of transient ischaemic attacks in Umbria, Italy, J. Neurol., 238 (1991) 87-90.

110. Sagara Y, Hendler S, Khoh-Reiter S, Gillenwater G, Carlo D, Schubert D, Chang J.Propofol hemisuccinate protects neuronal cells from oxidative injury. J Neurochem. 1999 Dec;73(6):2524-30.

111. Schanne, F. A., Kane, A. B., Young, E. E., & Farner, J. L. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. Science, v.206, p. 700-702,1979.

112. Schwartz L.M., B.A. Osborne, Cell death, Methods Cell Biol. 46 1995. XV–XVIII.

113. Shigemura, T., Hatakeyama, N., Shibuya, N., Yamazaki, M., Masuda, A., Chen, F.S., Momose, Y., Ito, Y., 1999. Effects of propofol on contractile response and electrophysiological properties in single guinea-pig ventricular myocyte. Pharmacol. Toxicol. 85, 111–114.

114. Sitar SM, Hanifi-Moghaddam P, Gelb A, Cechetto DF, Siushansian R, Wilson JX. Propofol prevents peroxide-induced inhibition of glutamate transport in cultured astrocytes. Anesthesiology. 1999 May;90(5):1446-53.

115. Slobodan M. Todorovic and Christopher J. Lingle. Pharmacological Properties of T-Type Ca2/ Current in Adult Rat Sensory Neurons: Effects of Anticonvulsant and Anesthetic AgentsJ Neurophysiol 79:240-252, 1998.

116. Small D.L., R. Monette, G. Mealing, A.M. Buchan, P. Morley, Neuroprotective effects of v-Aga-IVA against in vitro ischaemia in the rat hippocampal slice, NeuroReport 1995. 1617–1620.

117. Small D.L., R. Monette, A.M. Buchan, P. Morley, Identification of calcium channels involved in neuronal injury in rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation, Brain Res. 753 1997. 209–218.

118. Sorkine P, Setton A, Halpern P, Miller A, Rudick V, Marmor S, Klausner JM, Goldman G. Soluble tumor necrosis factor receptors reduce bowel ischemia-induced lung permeability and neutrophil sequestration. Crit Care Med. 1995 Aug;23(8):1377-81.

119. Straus F.H., N.D. Cheronis, E. Straus, Demonstration of reducing systems in neoplasms and living mammalian tissues by triphenylte- trazolium chloride, Science 1948. 113.

120. Tanimoto M., Y. Okada, The protective effect of hypothermia on hippocampal slices from guinea pig during deprivation of oxygen and glucose, Brain Res. 1987. 239–246.

121. Tas PW, Roewer N. Halothane inhibits spontaneous calcium oscillations via adenosine A1 receptors. Neuroreport. 2005 Dec 19;16(18):2047-50.

122. Taylor CP, Meldrum BS. Na+ channels as targets for neuroprotective drugs. Trends Pharmacol Sci. 1995 Sep;16(9):309-16. Review.

123. Tetsuhiro Takei, Hironao Saegusaa,c, Shuqin Zonga, Takayuki Murakoshi,Koshi Makitab, Tsutomu Tanabea. Increased sensitivity to halothane but decreased sensitivity to propofol in mice lacking the N-type Ca2+ channel. Neuroscience Letters 350 (2003) 41–45.

124. Todorovic SM, Lingle CJ. Pharmacological properties of T-type Ca2+ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. J Neurophysiol. 1998 Jan;79(1):240-52.

125. Traul DE, Zuo Z, Pajewski TN. Anesthetic-induced neuroportetion: a review. Advances in anesthesia 2008, 26:201-212.

126. Valentino K, Newcomb R, Gadbois T, Singh T, Bowersox S, Bitner S, Justice A, Yamashiro D, Hoffman BB, Ciaranello R, et al. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Aug 15;90(16):7894-7.

127. Vanderkooi J.M., M. Erecinska, I.A. Silver, Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions, Am. J. Physiol. 1991. C1131–C1150.

128. Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, Traynor O, Geoghegan J, Hegarty JE, O'Farrelly C. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. Transplantation. 2004 Jul 27;78(2):250-6.

129. Velly L.J., Guillet B.A., Masmejean F.M., Nioullon A.L., Bruder N.J., Pisano P.M. Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures. Anesthesiology 2003;99:368-75.

130. Verkhratsky A., Orkand, R. K., & Kettenmann, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. Physiol Rev., v.78, p. 99-141, 1998.

131. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):481-97. Review.

132. Zhan RZ, Qi S, Wu C, Fujihara H, Taga K, Shimoji K. Intravenous anesthetics differentially reduce neurotransmission damage caused by oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices in correlation with N-methyl-D-aspartate receptor inhibition. Crit Care Med. 2001Apr;29(4):808-13.

133. Zivin JA. Factors determining the therapeutic window for stroke. Neurology 1998;50:599–603.

134. Westphalen RI, Hemmings HC Jr. 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 2005

135. Wheeler D. B., A. Randall, R.W. Tsien, Roles of N-type and Q-type Ca2þ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science 264 (1994) 107–111.

136. Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. J Neurosurg Anesthesiol. 2002 Jan;14(1):66-79. Review.

137. Winegar BD, MacIver MB.Isoflurane depresses hippocampal CA1 glutamate nerve terminals without inhibiting fiber volleys. BMC Neurosci. 2006 Jan 12;7:5.

138. Yano T, Nakayama R, Ushijimak. Intracerebroventricular propofol is neuroprotective agaisnt transient global ischemia in rats: extracellular glutamate level is not a major determinant. Brain Res 2000;883:69-76.

139. Yamasaki T, Nakakimura K, Matsumoto M, Xiong L, Ishikawa T, Sakabe T. Effects of graded suppression of the EEG with propofol on the neurological outcome following incomplete cerebral ischaemia in rats. Eur J Anaesthesiol. 1999 May;16(5):320-9.

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