

**Dinâmica de Concentração do Óxido Nítrico
Produzido no Hipocampo de Rato por Activação
de Receptores do Glutamato**

Ana Margarida da Cruz Ledo

Universidade de Coimbra

2007

**Dinâmica de Concentração do Óxido Nítrico
Produzido no Hipocampo de Rato por Activação
de Receptores do Glutamato**

Ana Margarida da Cruz Ledo

*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade de Coimbra para
prestação de provas de doutoramento em
Bioquímica, especialidade de Toxicologia
Bioquímica.*

Universidade de Coimbra

2007

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da Bolsa de Doutoramento com referência **SFRH/BD/3317/2000** e do projecto **POCTI/2001/BCI/42365** e pela Fundação Calouste Gulbenkian, através do **Programa Estímulo à Investigação**.

Aos meus Pais

Ao Carlos

Índice Geral

Agradecimentos	xiii
Abreviaturas e Símbolos	xv
Resumo	1
Abstract	3
Publicações	5
1. Introdução Geral	7
1.1. Noções Gerais	9
1.2. O Óxido Nítrico – Propriedades Físico-químicas e Reactividade.....	10
1.2.1. Efeitos Directos	11
1.2.2. Efeitos Indirectos.....	13
1.3.1. Reacção com Proteínas Hélicas.....	22
1.3.2. Reacção com Proteínas não-Hélicas	24
1.3.3. Óxido Nítrico e a Mitocôndria	24
1.4. A Óxido Nítrico Sintase	28
1.5. O Hipocampo	32
1.5.1. Estrutura.....	32
1.5.2. Função	35
1.5.3. Receptores do Glutamato no Hipocampo	37
1.5.4. Outros Neurotransmissores.....	38
1.5.5. O Óxido Nítrico no Hipocampo	39
1.5.6. O Óxido Nítrico e Receptores N-Metil-D-Aspartato.....	41
1.5.7. Difusão e Regulação da Actividade do Óxido Nítrico.....	42
1.5.8. Bioactividade do Óxido Nítrico no Hipocampo	46
1.6. Detecção de Óxido Nítrico.....	47
1.7. Objectivos e Organização do Trabalho.....	51

2. Materiais e Métodos	53
2.1. Reagentes.....	55
2.2. Soluções.....	55
2.3. Instrumentação Electroquímica.....	60
2.4. Microelctrodos de Fibra de Carbono.....	61
2.4.1. Fabricação.....	61
2.4.2. Revestimento com Polímeros.....	63
2.4.3. Avaliação Geral.....	65
2.4.4. Propriedades Analíticas.....	68
2.5. Preparação de Fatias de Hipocampo de Rato.....	69
2.5.1. Animais.....	69
2.5.2. Isolamento de Fatias de Hipocampo de Rato.....	70
2.6. Monitorização da Concentração de Óxido Nítrico em Fatias de Hipocampo.....	70
2.6.1. Sistema de Perfusão.....	71
2.6.2. Câmara de Perfusão.....	71
2.6.3. Inserção do Microelctrodo de Fibra de Carbono no Tecido.....	74
2.6.4. Estimulação por Perfusão.....	74
2.6.5. Estimulação Localizada.....	74
2.7. Determinação da Esfera de Difusão do Óxido Nítrico.....	75
2.8. Medição da Pressão Parcial de Oxigénio na Fatia de Hipocampo de Rato.....	76
2.8.1. Elctrodo de Oxigénio.....	76
2.8.2. Medição Electroquímica.....	77
2.8.3. Perfil da Pressão Parcial de Oxigénio ao Longo da Profundidade do Tecido.....	77
2.8.4. Monitorização Simultânea de Óxido Nítrico e Oxigénio em Fatias de Hipocampo.....	78

2.9.	Análise de Dados	80
3.	Propriedades Analíticas dos Microelctrodos de Fibra de Carbono.....	81
3.1.	Introdução	83
3.2.	Resultados	85
3.2.1.	Aferição das Soluções Padrão de Óxido Nítrico	85
3.2.2.	Potencial de Oxidação.....	87
3.2.3.	Sensibilidade e Limite de Detecção.....	89
3.2.4.	Selectividade.....	90
3.2.5.	Tempo de Resposta	91
3.3.	Discussão	92
3.4.	Conclusões	96
4.	Dinâmica de Concentração do Óxido Nítrico em Fatias de Hipocampo de Rato	97
4.1.	Introdução	99
4.2.	Resultados	101
4.2.1.	Pressão parcial de Oxigénio na Fatia de Hipocampo	101
4.2.1.1.	<i>Produção de Óxido Nítrico na Subregião CA1 da Fatia de Hipocampo.....</i>	<i>103</i>
4.2.1.2.	<i>Estimulação Transitória.....</i>	<i>103</i>
4.2.1.3.	<i>Estimulação Contínua</i>	<i>112</i>
4.2.2.	Estimulação Localizada.....	114
4.2.2.1.	<i>Dinâmica de Concentração de Óxido Nítrico nas Subregiões do Hipocampo de Rato.....</i>	<i>114</i>
4.2.2.2.	<i>Esfera de Difusão de Óxido Nítrico Produzido Endogenamente em CA1.....</i>	<i>117</i>
4.2.3.	Verificação do Sinal Bioanalítico	119
4.2.3.1.	<i>Electroquímica</i>	<i>119</i>
4.2.3.2.	<i>Fisiológica.....</i>	<i>123</i>
4.2.3.3.	<i>Farmacológica.....</i>	<i>125</i>

4.3.	Discussão.....	128
4.3.1.	Perfil de Oxigénio ao Longo da Profundidade da Fatia de Hipocampo	128
4.3.2.	Estimulação por Perfusão: Glutamato vs N-Metil-D-Aspartato....	130
4.3.3.	Estimulação Localizada.....	133
4.3.3.1.	<i>Dinâmica de concentração de Óxido Nítrico nas Subregiões do Hipocampo de Rato.....</i>	<i>134</i>
4.3.3.2.	<i>Difusão do Óxido Nítrico Produzido Endogenamente em CA1</i>	<i>136</i>
4.3.3.3.	<i>Decaimento da Resposta para Estímulos Sucessivos.....</i>	<i>138</i>
4.3.4.	Verificação do Sinal Bioanalítico.....	140
4.4.	Conclusões	141
5.	Interacção entre Óxido Nítrico e Oxigénio no Hipocampo de Rato.....	143
5.1.	Introdução	145
5.2.	Resultados	147
5.2.1.	Registo Simultâneo de Óxido Nítrico e Oxigénio na Subregião CA1	147
5.2.2.	Confirmação do Acoplamento Óxido Nítrico/Oxigénio	154
5.3.	Discussão.....	157
5.4.	Conclusões	162
6.	Conclusões Finais e Perspectivas Futuras.....	163
7.	Referências Bibliográficas	167

Agradecimentos

Aos meus pais Maria Fernanda e Albano Ledo. As palavras não permitem descrever o amor e apoio incondicionais que sempre senti da vossa parte. Apenas posso dizer *I got the message: JUST DO IT!* Obrigada por serem quem são. Obrigada por fazerem de mim quem sou.

Agradeço aos meus orientadores científicos, Professor Doutor João Laranjinha e Professor Doutor Rui Barbosa. Juntos acreditamos que este projecto ambicioso era viável e juntos colhemos os frutos do trabalho. Foi um caminho nem sempre fácil, mas com a vossa ajuda e apoio sempre acreditei que teríamos sucesso. Obrigada!

Agradeço à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em particular ao Laboratório de Bioquímica e ao Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, onde o trabalho aqui apresentado foi realizado. Obrigada!

À Professora Doutora Leonor Almeida agradeço o entusiasmo que acompanhou os progressos e a forma como sempre me animou nos momentos mais difíceis. Obrigada!

A todos os meus colegas no Laboratório de Bioquímica – João, Bruno, Ricardão, Cátia, Carla Nunes, Carla Cardoso, Paula, Joana Martins, Joana Dias, Marco, Lena, Catarina, Dália, Cristina, Liliana, Nuno, Ricardo, Carina, sem nenhuma ordem intencional – juntos partilhamos discussões científicas, mesas de almoço e conversas de café, jantaras, aeroportos e salas de congressos. Ajudamo-nos mutuamente nesta caminhada com apoio, amizade e muitas gargalhadas. Esta Irmandade da Bioquímica terá sempre um lugar especial no meu coração. Obrigada!

Ainda no Laboratório de Bioquímica quero mencionar os restantes docentes, Professores Doutores José Custódio e João Sardinha Alface e Professoras Doutoradas Teresa Dinis e Armanda Santos – pelas conversas de corredor e pela amabilidade que sempre me estenderam. Estou certa de que não existe magusto como o nosso! Obrigada!

Uma palavra de agradecimento ainda a todos os funcionários dos Laboratórios de Bioquímica e Métodos Instrumentais de Análise pelo apoio prestado ao longo destes anos. Obrigada!

Agradeço ao Centro de Neurociências de Coimbra pela possibilidade de realizar o meu doutoramento numa instituição que procura e incita os jovens cientistas que aqui chegam a procurar nada menos que a excelência. Obrigada!

Por fim quero agradecer àqueles que me ajudaram fora dos Laboratórios de Bioquímica e Métodos Instrumentais de Análise: à Professora Doutora Catarina Oliveira, ao Professor Doutor João Malva e ao Paulo Pinheiro por me terem auxiliado na preparação de fatias de hipocampo; ao Professor Doutor Martinho do Rosário por ter permitido que, na fase inicial do trabalho, utilizasse o espaço e o equipamento do Laboratório de Biofísica Celular para construir os microelctrodos de fibra de carbono. Obrigada!

Abreviaturas e Símbolos

aCSF – Fluido cerebrospinal artificial

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

D-AP5 – Ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanóico

L-arg – L-arginina

CA1-4 – Do latim *cornus ammon*

CaM – Calmodulina

CAPON – Ligando da nNOS, do inglês *carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS*

Carbox – Mistura dos gases oxigênio e dióxido de carbono nas proporções
95:5

cGC – Guanilato ciclase solúvel

cGMP – Guanosina de 3',5'-monofosfato cíclica

cyt c ox – Citocromo c oxidase

DA – Dopamina

DETA/NO – Dietilenotriamina/NO

DG – Do latim *dentate gyrus*

E_{ox} – Potencial de oxidação

E° – Potencial formal de oxidação-redução

EC_{50} – Concentração necessária para obter 50 % da resposta máxima

FAD – Dinucleótido de flavina e adenosina

FCV – Voltametria cíclica de varrimento rápido, do inglês *fast cyclic voltammetry*

FIA – Análise por injeção em fluxo

FMN – Mononucleótido de flavina

GABA – Ácido γ -amino butírico

L-glu– L-glutamato

GSH – Glutatião reduzido

H_4B – 6(*R*)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina

5-HT – 5-hidroxitriptamina

KA – Cainato

k – Constante de velocidade
 K_d – Constante de dissociação
 K_i – Constante de inibição
 K_m – Constante de Michaelis
L.O.D – Limite de detecção
 LO^\bullet – Radical alcóxido derivado de lípidos
 LOO^\bullet – Radical peróxido derivado de lípidos
LTD – Depressão da força sináptica a longo prazo, do inglês *long-term depression*
LTP – Potenciação da força sináptica a longo prazo, do inglês *long-term potentiation*
MFC-NO – Microeléctrodo de fibra de carbono utilizado para medir 1NO
MFC- O_2 – Microeléctrodo de fibra de carbono para medir O_2
NADPH – Dinucleótido de nicotinamida e adenosina fosfato
NMDA – *N*-metil-D-aspartato
L-NNA – *N*_ω-nitro-L-arginina
NOS – Óxido nítrico sintase
3-NT – 3-Nitrotirosina
PBS – Tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*
o-PD – *orto*-Fenilenediamina
PDZ – Motivo de interacção proteica descrito originalmente em PSD-95, DLG e Z0-1
pNO – Pressão parcial de óxido nítrico
p O_2 – Pressão parcial de oxigénio
PSD-95 – Proteína da densidade pós-sináptica de massa molecular 95 kDa, do inglês *postsynaptic density protein of 95 kDa*
 RO^\bullet – Radical alcóxido
 ROO^\bullet – Radical peróxido
ROS – Espécies reactivas de oxigénio, do inglês, *reactive oxygen species*
RNS – Espécies reactivas de nitrogénio, do inglês, *reactive nitrogen species*
S.E.M. – Erro padrão da média

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

St. Gran. – Camada de células glandulares, do latim *stratum granulosum*

St. Pyr. – Camada de células piramidais, do latim *stratum pyramidale*

T_{50%} – Tempo necessário para alcançar 50% da resposta máxima

T_{80%} – Tempo necessário para alcançar 80% da resposta máxima

Resumo

O óxido nítrico (NO) é um radical de natureza gasosa que foi identificado na década de 1980 como um mensageiro intercelular ubíquo nos sistemas cardiovascular, imunitário e nervoso. As suas propriedades físico-químicas claramente distintas de mensageiros conhecidos e a sua bioactividade diversa despertaram um interesse neste radical livre que até hoje, 15 anos depois de ter sido classificada pela revista Science como a molécula do ano de 1992 (Koshland, 1992), não se esgotou. De facto, embora o impacto do NO em órgãos e sistemas seja conhecido em termos gerais, os mecanismos moleculares e, sobretudo, aspectos quantitativos relacionados com a produção e difusão são ainda pouco conhecidos.

O NO , como espécie difusível e hidrofóbica (Lancaster, 1997, Shaw e Vosper, 1977), permeia membranas biológicas e não é, portanto, armazenado em vesículas. Por outro lado, não existe um receptor membranar para o NO . Um dos alvos mais bem estudados e de cuja actividade resultam acções bem conhecidas como, por exemplo, a vasodilatação e a neuromodulação, é a guanilato ciclase solúvel (Arnold *et al.*, 1977). Deste modo, a sua bioactividade é criticamente determinada pelo perfil da sua concentração no tempo e no espaço. Contudo, e pese embora o elevado número de trabalhos dedicados ao estudo dos efeitos do NO , muito pouco se conhece sobre a sua dinâmica de concentração. Em larga medida, tal limitação deve-se às dificuldades analíticas associadas à medição de uma espécie gasosa com tempo de vida reduzido em sistemas biológicos. O conhecimento da sua actividade biológica é limitado pelo facto da maioria dos estudos implicarem a adição de NO exogenamente ou a medição de produtos da sua actividade biológica (cGMP) ou reacção/metabolização (por exemplo nitrito) e não o NO propriamente dito.

O hipocampo é uma estrutura do cérebro onde a actividade do NO parece ter um impacto extraordinário em virtude do seu envolvimento, por um lado, nos mecanismos de memória e aprendizagem enquanto mensageiro retrógrado e, por outro lado, nas vias de morte celular em doenças

neurodegenerativas. O estudo da dinâmica da concentração do NO nesta região reveste-se, portanto, de um grande interesse.

No trabalho aqui apresentado, foram construídos e avaliados microelctrodos de fibra de carbono revestidos com polímeros de Nafion® e *orto*-fenilenediamina para medir NO em fatias de hipocampo de rato. Tendo-se comprovado as suas boas propriedades electroanalíticas foram utilizados no estudo da dinâmica de concentração do gás produzido por activação da sua principal via síntese, o receptor glutamatérgico do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Demonstrou-se que, tal como previsto considerando as respectivas características funcionais e susceptibilidades, existe uma heterogeneidade de produção de NO nas subregiões do hipocampo, com uma resposta significativamente superior em CA1. Esta subregião apresentou também uma taxa de consumo de oxigénio (O_2) superior às restantes.

Atendendo a que, com base em estudos enzimáticos e em culturas celulares, o NO tem sido proposto como um regulador fisiológico do consumo mitocondrial de O_2 devido à sua ligação rápida e reversível com o complexo terminal da cadeia transportadora de electrões, a citocromo *c* oxidase, estudou-se a interacção dinâmica entre NO endógeno e a pressão parcial de O_2 na subregião CA1 através da medida simultânea de ambos os gases. Os resultados apresentados, e obtidos pela primeira vez num sistema que preserva a citoarquitectura tecidual, revelaram uma relação mútua e complexa dos perfis de ambos em consequência da estimulação do tecido com NMDA.

Por fim, apresenta-se pela primeira vez, em tecido do sistema nervoso central, uma determinação experimental da dimensão da esfera de difusão de NO para uma situação de activação de múltiplos locais de síntese contidos num volume com raio interior a $100\ \mu\text{m}$. Coincidindo com cálculos teóricos apresentados na literatura, o raio de difusão é de pelo menos $400\ \mu\text{m}$.

Palavras-chave: Óxido nítrico, Receptor NMDA, Microelctrodo de Fibra de Carbono, Oxigénio, Hipocampo, Difusão, Subregião CA1.

Abstract

Nitric oxide (NO) is a gaseous free radical identified as a ubiquitous intercellular messenger in the cardiovascular, immune and nervous systems in the 1980s. Its unique physical-chemical properties and diverse bioactivity triggered a still lasting interest in this free radical elected "Molecule of the Year 1992" by the prestigious scientific magazine *Science* (Koshland, 1992). Although NO 's actions in organs and systems are understood in general terms, little is known concerning molecular mechanisms and quantitative information regarding production and diffusion.

Due to its diffusible and hydrophobic nature (Lancaster, 1997, Shaw e Vosper, 1977) NO easily crosses membranes and is not stored in vesicles. On the other hand, no membrane receptor has been identified for NO . One well characterized target, with known implications in the regulation of vascular tone and neuromodulation, is soluble guanylate cyclase (Arnold *et al.*, 1977). Thus, bioactivity is critically determined by its concentration profile in time and space. Despite the large number of studies directed at understanding NO 's actions, little is known regarding its concentration dynamics. This is greatly due to the analytic difficulties associated with measuring a gaseous species with a limited life-time in biological systems. Much of what is now known about NO and its actions in biological systems is based on studies where NO was applied exogenously or quantified indirectly by measuring either products of its activity (cGMP) or reaction/metabolism (nitrite).

The hippocampus is a structure of the central nervous system where NO has an extraordinary role due to its involvement not only in memory and learning mechanisms as a retrograde messenger, but also in cell death pathways associated with neurodegenerative disorders. Determining the concentration dynamics of NO in this particular region is highly important.

Here, carbon fiber microelectrodes coated with polymers of Nafion® and *ortho*-phenylenediamine for measuring NO were constructed and evaluated and, having established their adequate analytical properties, used to

determine NO 's concentration dynamics evoked by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. As predicted by their different functional characteristics and susceptibilities, the subregions of the hippocampus were shown to be heterogeneous regarding NO production, with CA1 showing the highest yield.

Considering that in both enzymatic and cell culture studies NO has been shown to be a physiological regulator of oxygen (O_2) consumption due to fast and reversible binding to cytochrome *c* oxidase, the terminal complex of the electron transporting chain, the cross-talk between O_2 and endogenously produced NO was studied in the CA1 subregion of the hippocampus. The results shown demonstrate, for the first time in a preparation retaining original cyto-architecture, a complex interaction between the two as a result of NMDA receptor activation.

Last but not least, for a neuronal tissue preparation, the diffusion radius of NO was experimentally determined for the activation of multiple production sites contained in a 100 μm radius. In agreement with several theoretical calculations present in the literature, the radius of the NO diffusion sphere was determined to be at least 400 μm .

Key Words: Nitric oxide, NMDA receptor, Carbon fiber microelectrodes, Oxygen Hippocampus, Diffusion, CA1 subregion.

Publicações

Parte dos resultados apresentados nesta dissertação foram incluídos nas seguintes publicações:

Capítulo em Livro:

Ana Ledo, Rui M. Barbosa, João Frade and João Laranjinha (2002) "Nitric Oxide Monitoring in Hippocampal Brain Slices Using Electrochemical Methods" in *Methods in Enzymol.*, Nitric Oxide, parts D and E, 359:111-125, Cadenas, E. and Parker, L. Eds. Academic Press, New York.

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Ana Ledo, João Frade, Rui M. Barbosa, João Laranjinha (2004) "Nitric Oxide in Brain: Diffusion, Targets and Concentration Dynamics in Hippocampal Subregions" in *Mol Asp Med*, 25:75-89.

Ferreira, N.R., Ledo, A., Frade, J.G., Gerhardt, G.A., Laranjinha, J., Barbosa, R.M. (2005) "Electrochemical Measurement of Endogenously-Produced Nitric Oxide in Brain Slices Using *o*-Phenylenediamine-modified Carbon Fiber Microelectrodes" in *Anal Chim Acta.*, 535(1-2):1-7.

Ana Ledo, Rui M. Barbosa, Greg A. Gerhardt, Enrique Cadenas, João Laranjinha (2005) "Concentration Dynamics of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Subregions Evoked by Stimulation of the NMDA Glutamate Receptor" in *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102(48):17483-17488.

Laranjinha, J., Ledo, A. (2007) "Coordination of physiologic and toxic pathways in hippocampus by nitric oxide and mitochondria." *Front Biosci.*, 2007, 12:1094-106.

Ledo, A., Frade, J.G., Barbosa, R.M., Laranjinha, J. "Regulation in Nitric Oxide Dynamics in Hippocampus by NMDA and AMPA Glutamate Receptors" in *Curr Topics in Pharmacol.* (in press)

1.

Introdução Geral

1.1. Noções Gerais

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) desempenham importantes funções em diversos processos relacionados com a neurobiologia, desde o desenvolvimento, controlo da função celular e neurotoxicidade (Espey *et al.*, 2002). As ROS incluem moléculas quimicamente reactivas derivadas do oxigénio (O_2) de onde se destacam o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), podendo também incluir o ácido hipocloroso (HClO), peróxidos derivados de lípidos (LOO^{\cdot}) e o próprio O_2 , enquanto que as RNS incluem espécies quimicamente reactivas derivadas do monóxido de nitrogénio ou óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) tais como o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o dióxido de nitrogénio (NO_2), *S*-nitrosotióis, bem como o trióxido de dinitrogénio (N_2O_3) e o próprio $^{\cdot}NO$ (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Em finais da década de 1980 o $^{\cdot}NO$ foi identificado com o factor de relaxamento derivado do endotélio, (Ignarro *et al.*, 1987 Palmer *et al.*, 1987). Paralelamente, Garthwaite *et al.*, 1988 demonstraram que a sua síntese em neurónios resultava na elevação da concentração de cGMP e Hibbs *et al.*, 1988 demonstraram a síntese do radical em macrófagos activados.

O $^{\cdot}NO$ participa em inúmeras funções, como a regulação do tónus vascular (Moncada *et al.*, 1988), modulação da função neuronal, onde está implicado em vias de sinalização envolvidas na memória, aprendizagem, e desenvolvimento (revisto em Prast e Philippu, 2001) ou no sistema imunitário, na resposta a tumores e a agentes patogénicos (MacMicking *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 2002).

Uma característica comum à participação do $^{\cdot}NO$ nos diversos processos biológicos já identificados é a dualidade de acção. De facto, para além das funções desempenhadas em processos fisiológicos, o $^{\cdot}NO$ tem sido implicado em várias patologias, desde inflamação, aterosclerose, cancro, diabetes, doenças neurodegenerativas, acidentes vasculares cerebrais, enfarte do miocárdio, etc. (revisto em Pacher *et al.*, 2007).

Considerando esta dualidade de acção, o conhecimento dos factores que determinam a sua bioactividade, como a concentração, difusão desde o local de síntese e consumo em múltiplas reacções bem como o tipo de exposição (crónica ou aguda) parecem determinar qual o efeito global do $\cdot\text{NO}$ num determinado sistema biológico. (Espey *et al.*, 2002). Portanto, a informação veiculada pelo $\cdot\text{NO}$ está associada à dinâmica da sua concentração.

1.2. O Óxido Nítrico – Propriedades Físico-químicas e Reactividade

O $\cdot\text{NO}$ é uma molécula simples, formada por um átomo de oxigénio ligado a um átomo de nitrogénio em estado de oxidação +2. Possui 8 electrões ligantes e 5 anti-ligantes, pelo que a força da ligação é de $2\frac{1}{2}$ e a distância da ligação N-O é intermédia entre uma ligação dupla e uma tripla. Por outro lado, a existência de um electrão desemparelhado significa que é um radical livre. O electrão desemparelhado é anti-ligante, e a sua remoção resulta na espécie oxidada NO^+ (ião nitrosónio), onde a ligação N-O é tripla. Pode também ser reduzido, formando-se NO^- (ião nitrosilo) que pode existir no estado tripleto ou singuleto (Bonner e Stedman, 1996).

Termodinamicamente, o $\cdot\text{NO}$ é instável – a energia de Gibbs para a sua formação a partir de oxigénio e de nitrogénio moleculares é muito elevada ($\Delta_f G_{298}^\circ = 86,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e ocorre apenas para temperaturas elevadas. A sua decomposição não é favorável do ponto de vista cinético, daí que o gás possa ser armazenado à pressão de 1 atm e temperatura ambiente sem decomposição apreciável. Para pressões elevadas ocorre desproporcionação com formação de N_2O e NO_2 (Bonner e Stedman, 1996).

A sua solubilidade em água é reduzida ($1,94 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{atm}^{-1}$) sendo ainda menor para uma solução salina ($1,74 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{atm}^{-1}$). Uma solução saturada com o gás a 25 °C e 1 atm atinge uma concentração de aproximadamente 2 mM. Por outro lado, o $\cdot\text{NO}$ não sofre qualquer reacção de hidratação (Zacharia e Deen, 2005).

O conhecimento da química do $\cdot\text{NO}$ em sistemas biológicos é normalmente organizado em função de efeitos directos e indirectos (Miranda *et al.*, 2000, Wink e Mitchell, 1998). Os efeitos directos resultam de reacções directas do $\cdot\text{NO}$ com alvos moleculares (complexos metálicos ou espécies radicalares) de onde resulta um efeito biológico enquanto os efeitos indirectos são mediados por produtos de reacção de $\cdot\text{NO}$ com O_2 ou $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar RNS que, por sua vez, reagem com moléculas biológicas (Wink e Mitchell, 1998).

Esta classificação, embora simplista, permite balançar dois aspectos relevantes que determinam a acção biológica do $\cdot\text{NO}$, nomeadamente a concentração em estado de equilíbrio e a duração de exposição: os directos estão geralmente associados a exposições curtas e/ou de baixa concentração enquanto que os indirectos a exposições prolongadas e/ou altas concentrações. Em ambas as situações a dependência do ambiente redox celular é um aspecto importante a considerar (Wink e Mitchell, 1998).

1.2.1. Efeitos Directos

Reacção com Complexos Metálicos

O $\cdot\text{NO}$ reage com metais de transição (livres ou em grupos prostéticos associados a proteínas) que existem em vários estados de oxidação variando entre si num único electrão. Estas reacções, que exibem constantes de velocidade da ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, podem classificar-se em dois tipos (Wink e Mitchell, 1998):

i) Ligação ao centro metálico sem alteração da carga formal de valência do metal (nitrosilação). Esta reacção ocorre tipicamente entre o $\cdot\text{NO}$ e o heme ferroso presente em algumas proteínas (reacção 1), nomeadamente com a guanilato ciclase solúvel (sGC), o alvo de acção biológica do $\cdot\text{NO}$ mais bem conhecido, várias enzimas do grupo citocromo P450 (catalizam a hidroxilação de vários substratos relevantes no metabolismo de drogas, na biossíntese de colesterol e esteróis) e a óxido nítrico sintase (NOS). A

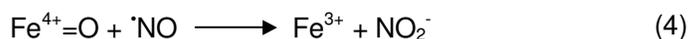
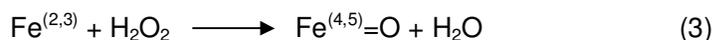
formação de complexos Fe(II)-nitrosilo é um exemplo claro deste tipo de reacção.



ii) Reacção de oxidação-redução entre o $\cdot\text{NO}$ e um complexo metálico dioxigénio (reacção 2), de que é exemplo a reacção com a oxi-hemoglobina, uma das principais vias de remoção em sistemas biológicos (Lancaster, 1994). Esta reacção resulta na formação de nitrato (NO_3^-) e meta-hemoglobina.



Outras reacções incluem a redução de complexos oxo-metálicos formados durante a oxidação de metais ou complexos metal-O por H_2O_2 (reacção 3). Estes complexos são oxidantes potentes e podem causar danos celulares (Puppo e Halliwell, 1988). A redução destes complexos pelo $\cdot\text{NO}$ revela o seu papel enquanto antioxidante, pois ao reagir com o complexo hipervalente (reacção 4), impede a sua participação noutras reacções, potencialmente deletérias (Kanner *et al.*, 1991, Gorbunov *et al.*, 1995).



Reacção com Espécies Radicalares

O $\cdot\text{NO}$ reage com outros radicais livres a velocidades elevadas. Os radicais alcóxilo ($\text{LO}\cdot$) e peróxilo ($\text{LOO}\cdot$) formados durante a peroxidação lipídica reagem rapidamente com o $\cdot\text{NO}$ ($k \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (reacção 5), funcionando como um terminador da cadeia de propagação, ou seja, como um antioxidante (Huie e Padmaja, 1993, Patel *et al.*, 2000).



Outros radicais com os quais o ^1NO reage incluem o radical tirosilo, formado, por exemplo, durante o *turnover* catalítico da reductase de ribonucleótidos (Kwon *et al.*, 1991, Lepoivre *et al.*, 1991), radicais tiólo ou radicais centrados em carbono, como aqueles formados no ADN exposto a radiação ionizante (Mitchell *et al.*, 1996).

1.2.2. Efeitos Indirectos

A variação da concentração e a fonte de ^1NO parecem determinar o seu efeito biológico. É aceite, embora sem validação experimental robusta, que enquanto que para concentrações baixas de ^1NO ($<1 \mu\text{M}$) predominam os efeitos directos acima referidos, para concentrações elevadas ($>1 \mu\text{M}$), normalmente associadas a processos patológicos, prevalecem os indirectos (Wink e Mitchell, 1998).

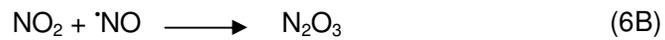
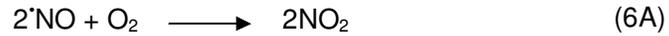
A reacção do ^1NO com espécies diamagnéticas, como os tióis ou outras biomoléculas, ocorre a uma velocidade lenta em sistemas biológicos (Wink *et al.*, 1994) e é precedida por activação do radical por reacção com O_2 ou O_2^\bullet . As reacções subsequentes incluem-se na categoria de efeitos indirectos do ^1NO (Wink e Mitchell, 1998).

Reacção com Oxigénio Molecular ou Auto-oxidação

Quando o ^1NO é exposto a O_2 pode gerar uma variedade de RNS com maior poder nitrosante e/ou oxidante do que o ^1NO ou o O_2 , individualmente. A auto-oxidação em fase gasosa é de segunda ordem relativamente ao ^1NO e primeira ordem em relação ao O_2 (reacções 6A-C).

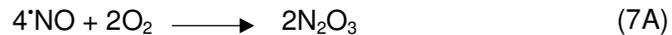
Globalmente, a reacção é de terceira ordem e o passo limitante envolve o encontro trimolecular entre duas moléculas de ^1NO e uma de O_2 . Significa isto que, para concentrações baixas de ^1NO , a reacção, embora relativamente rápida ($k_g = 3,4 \times 10^5 \text{ atm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), não tem impacto biológico (Wink *et al.*, 1996). O produto desta reacção é o NO_2 , que pode dimerizar, formando

N_2O_4 , ou então reagir com uma terceira molécula de $\cdot\text{NO}$ para formar N_2O_3 (Wink e Mitchell, 1998).



$$-d(p\cdot\text{NO})/dt = k_g \cdot p^2 \cdot \text{NO} \cdot p\text{O}_2 \quad (6\text{C})$$

A auto-oxidação de $\cdot\text{NO}$ em fase aquosa é também de terceira ordem global e a reacção é semelhante à observada em fase gasosa. Contudo, não há formação de NO_2 livre e o intermediário N_2O_3 é hidrolisado, formando-se nitrito (NO_2^-) como produto final (reacções 7A a C). A estequiometria da reacção é diferente da observada em fase gasosa. A constante de velocidade para a auto-oxidação em fase aquosa é $k = 8 \times 10^6 \text{ M}^2\text{s}^{-1}$ e a velocidade é independente de pH (Ford *et al.*, 1993).



$$-d[\text{HNO}_2]/dt = k_{\text{aq}} \cdot [\cdot\text{NO}]^2 \cdot [\text{O}_2] \quad (7\text{C})$$

Tal como a auto-oxidação em fase gasosa, para concentrações baixas de $\cdot\text{NO}$ (0,1 – 1 μM), onde se observa $[\text{O}_2] \gg [\cdot\text{NO}]$, esta reacção é pouco significativa e o $\cdot\text{NO}$ difunde uma distância considerável desde o seu local de síntese. Na proximidade de macrófagos activas, onde a concentração de $\cdot\text{NO}$ pode atingir valores bastante elevados (acima de 1 μM) a produção de N_2O_3 por auto-oxidação pode ser significativa. Neste contexto, a concentração de $\cdot\text{NO}$ pode regular o seu tempo de vida: enquanto que para concentrações baixas não haverá auto-oxidação significativa e o $\cdot\text{NO}$ pode difundir longas

distâncias, quando a concentração do gás é maior, o seu tempo de vida e a difusão são limitadas (Wink *et al.*, 1993, Wink e Mitchell, 1998).

Sendo gases hidrofóbicos, o $\cdot\text{NO}$ e o $\text{O}_2\cdot^-$ partilham preferencialmente na fase lipídica, isto é, em membranas biológicas, onde a reacção de auto-oxidação prossegue a uma velocidade semelhante à observada em fase aquosa. Em células, 90 % da reacção de auto-oxidação do $\cdot\text{NO}$ parece ocorrer na zona hidrofóbica de membranas, onde pode ser acelerada cerca de oito vezes relativamente à fase citosólica (Liu *et al.*, 1998). Os intermédios da auto-oxidação de $\cdot\text{NO}$ em fase lipídica são semelhantes aos encontrados na fase gasosa, o que significa que reacções de nitrosação e nitração, promovidas pelo NO_2 , ocorrerão preferencialmente em proteínas membranares (Wink e Mitchell, 1998).

Reacção com o Anião Superóxido

Em 1992 foi descrita a formação de ONOO^- como o produto da reacção rápida entre dois radicais pouco reactivos, mas ubíquos e sintetizados em sistemas biológicos, o $\cdot\text{NO}$ e o $\text{O}_2\cdot^-$ (reacção 8). O ONOO^- é uma espécie altamente nitrante e oxidante, com E^0 (ONOO^- , $2\text{H}^+/\text{NO}_2$, H_2O) de + 1,6 V a pH 7 (Koppenol *et al.*, 1992).



$$-d[\text{ONOO}^-]/dt = k.[\cdot\text{NO}].[O_2\cdot^-] \quad (8B)$$

Os valores de constante de velocidade descritos para esta reacção variam entre 4,3 e $19 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Goldstein e Czapski, 1995, Huie e Padmaja, 1993, Kissner *et al.*, 1997) assumindo-se normalmente um valor de $k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ que indica que a velocidade é controlada pela difusão das espécies.

Tanto o $\cdot\text{NO}$ como o $\text{O}_2\cdot^-$ são efémeros em sistemas biológicos e a síntese de ONOO^- tem como requisito que os dois radicais sejam gerados

simultaneamente no mesmo compartimento. Enquanto o $\cdot\text{NO}$ tem um tempo de vida médio da ordem de alguns segundos e atravessa prontamente membranas biológicas (Denicola *et al.*, 1996, Lancaster, 1994), o $\text{O}_2^{\cdot-}$ permanece em sistemas biológicos apenas por alguns milissegundos e não permeia membranas senão através de canais aniónicos (Fridovich, 1995) ou alternativamente na forma protonada. Assim, a produção de ONOO^- ocorre preferencialmente na proximidade dos locais de geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Dada a sua potencial relevância no meio biológico enquanto mediador de acções atribuídas ao $\cdot\text{NO}$, interessa salientar que a produção de ONOO^- em sistemas biológicos é controlada por diversos factores, incluindo as concentrações relativas dos dois reagentes que, por sua vez, é determinada por reacções de competição com outros alvos moleculares. De facto, a concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o seu tempo de vida são muito baixas devido actividade da superóxido dismutase (SOD). Esta enzima, presente no citosol, na mitocôndria e no espaço extracelular, cataliza a reacção de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Johnson e Giulivi, 2005), que é posteriormente convertido em água pela catalase (Chelikani *et al.*, 2004). A elevada velocidade da reacção ($k \sim 2,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Fielden *et al.*, 1974) e o facto de a SOD existir a uma concentração de 4 a 10 μM contribui para que esta enzima compita activamente com o $\cdot\text{NO}$ pela reacção com $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Nakano *et al.*, 1990). Por seu lado, a concentração de $\cdot\text{NO}$ em sistemas biológicos é mantida baixa devido principalmente à reacção rápida ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) com a oxi-hemoglobina (Herold *et al.*, 2001).

Embora o ONOO^- não tenha sido ainda directamente detectado *in vivo*, existe hoje um corpo de resultados que suportam a hipótese desta potente espécie oxidante e nitrante ser produzida *in vivo*, bem como a sua participação na génese de danos celulares e tecidulares observados em neurodegenerescência, processos inflamatórios agudos e crónicos, sepsia, isquémia-reperfusão e doenças vasculares (revisto em Pacher *et al.*, 2007). Por outro lado, é actualmente aceite que pequenas quantidades de ONOO^-

podem ser removidas de forma eficaz por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos (Gutierrez *et al.*, 1996).

Em sistemas biológicos, o tempo de vida do ONOO^- é de aproximadamente 10-20 ms (Denicola *et al.*, 1996) e a sua elevada reactividade implica que o seu raio de difusão é da ordem de 100 μm . Em soluções fisiológicas a forma aniónica existe em equilíbrio com a protonada (ONOOH), sendo que as duas espécies têm reactividades distintas (Radi *et al.*, 1991).

Stresses Oxidativo, Nitrosativo e Nitrativo

Os efeitos indirectos do $\cdot\text{NO}$ em sistemas biológicos podem traduzir-se em três tipos de reacções associadas respectivamente, às noções de stresses oxidativo, nitrosativo e nitrativo: oxidação-redução, nitrosação e nitração. Dependendo da RNS predominante e do ambiente celular, numa situação de desequilíbrio uma ou mais destas reacções pode predominar e caracterizar o tipo de stresse.

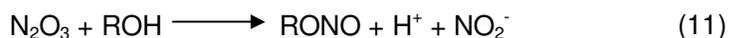
A química de oxidação-redução envolve a transferência de electrões entre os substratos. As espécies reactivas derivadas da reacção de $\cdot\text{NO}$ com O_2 com $\text{O}_2\cdot^-$ podem ter um poder oxidante moderado, ou seja, ser capazes de remover electrões a outras moléculas. O NO_2 é um oxidante forte, com potencial de oxidação (E_{ox}) de aproximadamente +1,2 V, mas a sua actividade é limitada pela sua rápida reacção com $\cdot\text{NO}$ para formar N_2O_3 , um oxidante relativamente fraco, com E_{ox} de +0,7 V (Wink e Mitchell, 1998).

No sistema nervoso central o ONOO^- é sugerido como a principal RNS mediadora de stresse oxidativo (Beckman, 1991). A impossibilidade de ser medido em sistemas biológicos devido ao seu reduzido tempo de vida tem mantido acesa a discussão sobre a sua participação nos danos oxidativos atribuídos ao $\cdot\text{NO}$ (Fukuto e Ignarro, 1997).

Para além do ONOO^- ser uma espécie oxidante potente, com capacidade para oxidar tióis, iniciar a peroxidação lipídica, nitrar resíduos de tirosina, clivar ADN e oxidar a guanosina (Pryor e Squadrito, 1995), a sua

decomposição resulta na formação das espécies *trans*-ONOOH, $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{OH}\cdot$, todas elas oxidantes (Pryor e Squadrito, 1995, Radi *et al.*, 2001).

Contrariamente à oxidação, a nitrosação resulta na formação de ligações covalentes entre um equivalente NO^+ e uma espécie nucleofílica como resíduos de amina, tiol ou hidroxilo (reações 9 a 11) (Williams, 1988). O N_2O_3 e os seus isómeros são as principais espécies nitrosativas (Jour'dheuil *et al.*, 1999, Wink *et al.*, 1997).



A passagem de uma química oxidativa para nitrosativa depende largamente da relação de concentrações $\cdot\text{NO}/\text{O}_2\cdot^-$: à medida que esta relação cresce para um, aumenta a química oxidativa, mas para valores superiores a um, isto é, quando a concentração de $\cdot\text{NO}$ excede a de $\text{O}_2\cdot^-$, passa a predominar uma química nitrosativa. Assim, a concentração relativa dos radicais bem como a variação desta no tempo determinam a formação de intermediários oxidativos ou nitrosativos (Espey *et al.*, 2002).

Tipicamente, a nitração consiste na adição electrofílica de um equivalente NO_2^+ a espécies nucleofílicas. O principal biomarcador de stresse nitrativo em sistemas biológicos é a 3-nitrotirosina (3-NT), que já foi identificada em vários estados patológicos (Crow e Ischiropoulos, 1996, MacMillan-Crow *et al.*, 1996, Radi, 2004).

No mecanismo de nitração dependente de radicais livres, a formação de 3-NT ocorre quando as espécies $\cdot\text{NO}_2$ e radical tirosilo combinam numa reacção limitada pela difusão para formar o resíduo nitrado. O $\cdot\text{NO}_2$ pode resultar da decomposição do ONOO \cdot ao passo que o radical tirosilo é formado por oxidação do resíduo por complexos oxo-metálicos, radicais carbonilo ou,

mais dificilmente, OH^\bullet (Radi, 2004). O radical tirosilo pode, alternativamente, reagir com o $^\bullet\text{NO}$, formando a 3-nitrosotirosina que é subseqüentemente oxidada a 3-NT.

Num segundo mecanismo de nitração, independente de radicais livres, o ONOO^- reage com um centro metálico para formar NO_2^+ que ataca electrofilicamente o resíduo de tirosina (Beckman *et al.*, 1992, Esteves *et al.*, 2003).

A nitração e a nitrosação não são necessariamente vias autónomas e divergentes, podendo ambas resultar na formação dos mesmos produtos finais: a nitrosação do grupo hidroxilo de um composto fenólico como a tirosina resulta num composto *O*-nitroso que sofre rearranjo espontâneo para formar 3-NT (Wink *et al.*, 1994).

Embora a relevância biológica da nitração de proteínas não esteja ainda consolidada devido ao reduzido número de resíduos detectados em situações patológicas como a inflamação (Aslan *et al.*, 2003, Brennan *et al.*, 2002), o facto de o número de proteínas susceptíveis a serem nitradas ser muito reduzida e de nestas apenas alguns resíduos de tirosina serem alterados aponta para um papel importante na regulação da sua actividade (Souza *et al.*, 1999).

Na Fig. 1.1 está esquematizada a química biológica do $^\bullet\text{NO}$ conforme descrito até aqui. Repare-se que este esquema é uma simplificação e que em sistemas biológicos o $^\bullet\text{NO}$ e as RNS derivadas participam provavelmente num leque alargado de outras reacções em competição entre si.

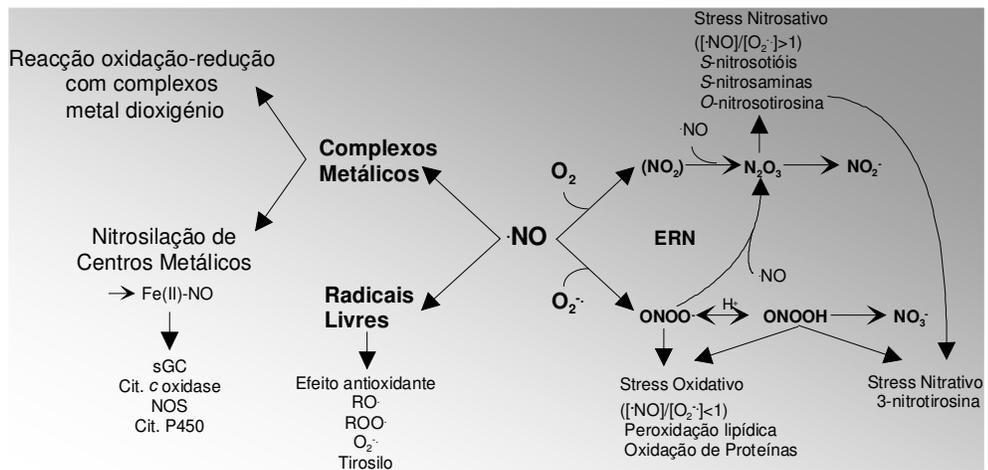


Figura 1.1 – Química biológica do [•]NO, com distinção entre efeitos directos (à esquerda do [•]NO) e indirectos (à direita do [•]NO). O gradiente em fundo pretende simular o gradiente de concentração de [•]NO, relacionando a mesma com os efeitos observados. Adaptado de Davis *et al.*, 2001, Wink e Mitchell, 1998.

1.3. Sinalização Celular – Alvos Moleculares do Óxido Nítrico

Referiu-se de início que o NO é um mensageiro intercelular. Após a descrição das suas propriedades físico-químicas e da sua reactividade, de seguida descreve-se o seu papel enquanto molécula sinalizadora e referem-se os seus principais alvos moleculares.

Apesar da descrição do primeiro radical livre orgânico (trifenilmetilo) remontar já ao início do século passado (Gomberg, 1900), até recentemente os radicais livres eram considerados como moléculas demasiado reactivas para poderem desempenhar um papel relevante em sistemas biológicos. No decorrer do século XX, várias observações convergiram para alterar esta visão, tendo-se chegado ao conceito da Biologia de Radicais Livres como é hoje conhecido.

A presença de radicais livres foi descrita em sistemas biológicos há mais de 60 anos (Commoner *et al.*, 1954), sendo simultaneamente associada a formação de radicais livres ao efeito tóxico observado a pressões elevadas de O_2 (Gerschman *et al.*, 1954) e proposta a teoria de envelhecimento celular como resultante dos efeitos oxidativos cumulativos das ROS (Gerschman *et al.*, 1954). A descoberta da SOD (McCord e Fridovich, 1969) iniciou uma mudança de opinião relativamente às ROS, que foram então descritas como produtos secundários do metabolismo oxidativo responsáveis por danos celulares observados em situações patológicas. Foi proposto o conceito de “Paradoxo do Oxigénio”, segundo o qual, embora absolutamente necessário para a produção de energia utilizável pelas células, o O_2 é, paradoxalmente, uma espécie com efeitos deletérios em quase todas as moléculas biológicas (Hess e Manson, 1984). Durante a década de 1980, predominou esta visão das ROS enquanto espécies exclusivamente tóxicas que ameaçavam a homeostase celular. A descrição de efeitos fisiológicos de ROS e outras espécies reactivas, algumas radicalares, como a activação da guanilato ciclase pelo OH^\cdot (Mittal e Murad, 1977) e H_2O_2 (White *et al.*, 1976) bem como a descoberta do NO e do seu papel na regulação do tónus vascular, na

neurotransmissão e defesa imunitária em finais da década de 1980 lançaram o conceito de sinalização redox. Actualmente, as ROS/RNS, embora potencialmente tóxicas, são descritas como intervenientes em vias de regulação redox das funções celulares (Saran *et al.*, 1998).

A sinalização redox tem vindo a ser reconhecido como um processo celular relevante e partilha muitas das características observadas na sinalização dita “clássica”.

De um modo genérico, e tendo em linha de conta a reactividade do NO com centros metálicos acima descrita, podem dividir-se os alvos celulares cuja actividade é controlada/alterada pelo NO em proteínas hémicas e não-hémicas.

1.3.1. Reacção com Proteínas Hémicas

O NO liga-se ao ferro hémico de grupos prostéticos no estado ferroso ($K_d > 10^{-9}$, Cooper, 1999) e no estado férrico (Brown, 1995, Cooper, 1999) e também a zinco e outros metais de transição.

Guanilato Ciclase Solúvel

A guanilato ciclase solúvel (sGC, EC 4.6.1.2) foi o primeiro alvo fisiológico do NO a ser identificado (Arnold *et al.*, 1977). A enzima faz parte da família de nucleótido ciclasas onde se incluem a guanilato ciclase membranar e a adenilato ciclase e cataliza a conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (cGMP).

A sGC é um heterodímero de massa molecular 72 kDa formado por uma subunidade α (1 ou 2) e uma subunidade β (1 ou 2) (Koesling, 1999). Embora ainda não esteja totalmente esclarecido o mecanismo de activação da sGC, sabe-se que o NO se liga ao ferro hémico resultando daí uma alteração conformacional e quebra da ligação axial do heme a um resíduo de histidina. (Stone e Marletta, 1996).

O cGMP formado por actividade desta enzima é um mensageiro intracelular secundário, isto é, traduz o sinal de NO numa resposta celular. A

elevação da concentração intracelular de cGMP resulta na activação proteína cinases dependentes de cGMP – cGKI e cGKII – que fosforilam resíduos de serina e treonina (Jurado *et al.*, 2005) em proteínas que regulam processos fisiológicos diversos no hipocampo, nomeadamente alguns associados à aprendizagem (Schlossmann e Hofmann, 2005).

Óxido Nítrico Sintase

A interacção do NO com a enzima responsável pela sua síntese, a NOS, funciona como um mecanismo de retroacção negativo. Embora não se conheça o mecanismo de inibição, pensa-se que o radical se ligue ao grupo hémico da enzima. A eficiência de inibição depende do estado do ferro hémico, sendo maior para o estado férrico que para o ferroso (Griscavage *et al.*, 1995). As isoformas têm sensibilidades distintas para a inibição por NO (Griscavage *et al.*, 1995) que pode ocorrer por mecanismos distintos, nomeadamente nitração de um resíduo de tirosina pelo ONOO^- (Robinson *et al.*, 2001), quebra de uma ligação heme-tiolato no local activo da enzima (Pasquet *et al.*, 1996) ou S-nitrosilação de um grupo tiólico, o que já foi demonstrado para uma das isoformas de NOS (Kurjak *et al.*, 1999).

Catalase

Conjuntamente com a SOD, a catalase é uma enzima fundamental na remoção de ROS, catalizando a conversão de H_2O_2 (produzida por dismutação de O_2^- pela SOD) em H_2O . O NO liga-se ao heme férrico da catalase inibindo a sua actividade (Brown, 1995, Brunelli *et al.*, 2001), sendo esta uma via de “cross-talk” entre duas espécies reactivas: H_2O_2 e NO . Embora esta ligação seja fraca comparativamente à ligação de NO a grupos hémicos em estado ferroso, parece ocorrer *in vivo* (Brown, 1995, Brunelli *et al.*, 2001, Cooper, 1999) e o conseqüente aumento da concentração de H_2O_2 pode resultar na activação de vias de sinalização sensíveis a ROS.

Citocromo c Oxidase

A citocromo c oxidase é uma outra proteína hémica cuja actividade é regulada por ligação do $\cdot\text{NO}$. Porém, esta interacção é discutida em pormenor na secção 1.3.3. Óxido Nítrico e a Mitocôndria em consequência da relevância que tem no âmbito desta tese.

1.3.2. Reacção com Proteínas não-Hémicas

As proteínas podem conter ferro não-hémico, nomeadamente em centros de Fe-S. Um exemplo é a aconitase, uma enzima mitocondrial que participa no ciclo de Krebs e que é inibida por ligação de $\cdot\text{NO}$ ou ONOO^- (Castro *et al.*, 1994, Gardner *et al.*, 1997) que removem o Fe do centro Fe-S.

Os complexos da cadeia transportadora de electrões da mitocôndria também contêm centros de Fe-S que podem ser atacados por $\cdot\text{NO}$ ou ONOO^- . A exposição prolongada a $\cdot\text{NO}$ resulta na inactivação do complexo I, com consequente elevação dos níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , sugerindo aqui outro ponto de “cross-talk” entre sinalização do $\cdot\text{NO}$ e H_2O_2 (Brookes e Darley-Usmar, 2002).

Uma via de sinalização atribuída ao $\cdot\text{NO}$ é a S-nitrosação ou S-nitrosilação de proteínas, que pode ser promovida principalmente por NO^+ , (formado por da oxidação de $\cdot\text{NO}$ por metais de transição) ou N_2O_3 (Keshive *et al.*, 1996). Exemplos de vias de sinalização moduladas por S-nitrosação incluem a inibição do receptor NMDA (Lipton *et al.*, 1998) e da caspase 3 (Rossig *et al.*, 1999, Zech *et al.*, 1999) e a activação da H-ras (Landar *et al.*, 1997).

1.3.3. Óxido Nítrico e a Mitocôndria

Na mitocôndria o $\cdot\text{NO}$ pode ser consumido ou produzido (Tatoyan e Giulivi, 1998) e a sua acção tem aí diversos efeitos com impacto não só na fisiologia como na patologia da célula.

Todos os componentes da cadeia transportadora de electrões da mitocôndria bem como a ATPase são inibidas directa ou indirectamente pelo $\cdot\text{NO}$ para concentrações ditas patológicas (revisto em Brown, 2007). Entre eles

a citocromo *c* oxidase (cyt *c* ox) é o elemento mais sensível, o que desde cedo sugeriu um papel fisiológico para tal interacção.

A cyt *c* ox é o complexo terminal da cadeia transportadora de electrões e é responsável por 90-95 % do consumo celular de O₂. Localiza-se na membrana mitocondrial interna e cataliza a oxidação do citocromo *c*²⁺ a citocromo *c*³⁺ acoplada à redução de O₂ a H₂O, com bombagem simultânea de protões da matriz para o espaço intermembranar da mitocôndria. Possui dois grupos hémicos (*a* e *a*₃) e dois centros de cobre (Cu_A e Cu_B). O centro catalítico é formado por um centro binuclear que consiste no citocromo *a*₃ (Fe²⁺) e o centro Cu_B (Cu⁺) (Babcock e Wikstrom, 1992).

O [•]NO liga-se ao ferro do heme *a*₃ no estado ferroso (Giuffre *et al.*, 2000). Devido à elevada afinidade do [•]NO pelo centro hémico ($K_d = 10^{-10}$ M, Cooper, 2002) e a rapidez da ligação ($k \sim 10^8$ M⁻¹s⁻¹, Blackmore *et al.*, 1991), esta reacção terá relevância em termos fisiológicos. Estas considerações apontam para uma noção relevante com implicações no metabolismo celular, pois ocorre uma competição efectiva entre [•]NO e O₂ pela ligação à enzima, com preferência para o [•]NO (Torres *et al.*, 2000). Por outras palavras, o [•]NO regula a respiração mitocondrial.

Embora nunca observado em sistemas biológicos complexos, prevê-se que a inibição da cyt *c* ox tenha um efeito visível no consumo de O₂ com conseqüente aumento da sua disponibilidade nos tecidos. Isto corresponde a um papel fundamental do [•]NO no sistema circulatório, em particular na microcirculação: a redução do consumo de O₂ nas células que se encontram mais próximas dos capilares permite a sua difusão até zonas mais afastadas dos vasos e por isso mais privadas de O₂ (Giulivi, 2003, Thomas *et al.*, 2001).

Para além do seu papel na produção de energia, a mitocôndria pode também participar em vias de sinalização, produzindo moléculas sinalizadoras (Brookes e Darley-Usmar, 2002, Brookes *et al.*, 2002, Moncada e Erusalimsky, 2002) de onde se destaca o H₂O₂. Durante o metabolismo normal, aproximadamente 2 % do O₂ consumido ao nível da respiração mitocondrial é reduzido a O₂^{•-} (Boveris e Cadenas, 1975). Este é rapidamente convertido pela

SOD em H_2O_2 , que participa em várias cascatas de sinalização (Brookes e Darley-Usmar, 2002, Palacios-Callender *et al.*, 2004). Então, o $\cdot NO$ pode regular a produção mitocondrial de moléculas sinalizadoras.

A inibição prolongada da *cyt c ox* leva à acumulação de componentes da cadeia transportadora de electrões a montante num estado altamente reduzido, o que facilita a oxidação do ubiquinol a semiquinona, cuja auto-oxidação produz $O_2^{\cdot -}$ (Poderoso *et al.*, 1996). Por outro lado, para além da *cyt c ox*, o $\cdot NO$ pode também inibir os complexos I e III da cadeia transportadora de electrões (Clementi *et al.*, 1998, Poderoso *et al.*, 1996), embora para concentrações mais elevadas e com cinética mais lenta.

Quando a exposição a $\cdot NO$ é prolongada, a inibição da respiração torna-se irreversível (Cassina e Radi, 1996, Clementi *et al.*, 1998, Riobo *et al.*, 2001). Nestas condições, o excesso de $O_2^{\cdot -}$ produzido pode reagir com $\cdot NO$, produzindo-se $ONOO^{\cdot -}$ (Koppenol *et al.*, 1992), uma RNS capaz de inibir irreversivelmente a respiração mitocondrial gerando um estado de “nitroxia” em que a bioenergética da célula fica gravemente comprometida e que, em última análise, pode resultar em morte celular (Borutaite e Brown, 2003, Moncada e Erusalimsky, 2002).

O complexo I é inibido reversivelmente por $\cdot NO$, $ONOO^{\cdot -}$ e S-nitrosotióis (Borutaite *et al.*, 2000, Clementi *et al.*, 1998), mas o $ONOO^{\cdot -}$ pode também inibir este complexo irreversivelmente, possivelmente por nitração de tirosinas (Yamamoto *et al.*, 2002), oxidação de resíduos ou ataque a centros de Fe-S (Welter *et al.*, 1996). A inibição dos complexos II e III por $ONOO^{\cdot -}$ é ainda controversa (Cassina e Radi, 1996, Pearce *et al.*, 2001, Welter *et al.*, 1996). O $\cdot NO$ e o $ONOO^{\cdot -}$ podem inibir a aconitase (citosólica e mitocondrial) por remoção de Fe dos respectivos centros de Fe-S (Castro *et al.*, 1998). Na Fig. 1.2 estão resumidas as principais interações das RNS com a mitocôndria.

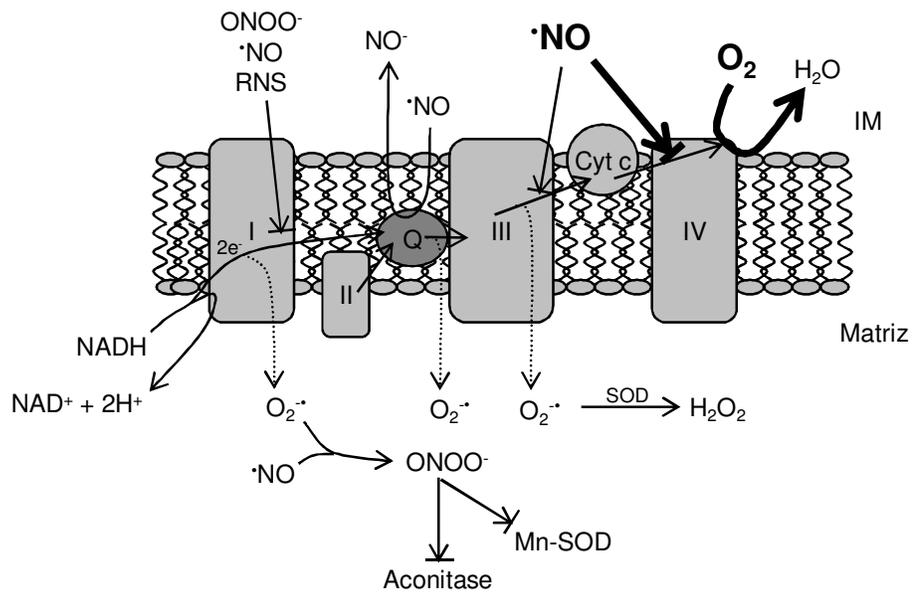


Figura 1.2 – Interação do $\cdot\text{NO}$ com a mitocôndria. Está evidenciado o sentido de fluxo de electrões doados ao complexo I pelo NADH, pontos de inactivação deste fluxo com consequente síntese de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Adaptado de Brown 2001, Brown 2007 e Brunelli, *et al.* 2001)

1.4. A Óxido Nítrico Sintase

A reacção de síntese de NO é catalizada pela NOS (EC 1.14.13.39). Existem três isoformas da enzima que diferem entre si não só em termos do gene de que são produto, como no que respeita à sua localização, regulação, propriedades catalíticas e sensibilidade a inibidores (revisto em Alderton *et al.*, 2001).

As isoformas foram inicialmente classificadas de acordo com o tecido onde foram isoladas pela primeira vez: neuronal ou NOS I (Bredt e Snyder, 1990, Schmidt e Murad, 1991), indutível ou NOS II (Stuehr *et al.*, 1991) e endotelial ou NOS III (Pollock *et al.*, 1991). Presentemente, alguns classificam a mtNOS (isoforma mitocondrial, Tatoyan e Giulivi, 1998) como uma isoforma distinta, embora na realidade pareça tratar-se de uma variante da isoforma neuronal (Elfering *et al.*, 2002). O gene que codifica a NOS I é estruturalmente muito diverso, especialmente em termos de promotores e, adicionalmente, a regulação pós-transcricional na forma de corte alternativo do ARN resulta nas variantes α , β , γ e μ (Fig. 1.3).

A NOS, activa apenas na forma homodimérica, contém os seguintes cofactores: um grupo hémico protoporfirina IX (McMillan *et al.*, 1992, Stuehr e Ikeda-Saito, 1992, White e Marletta, 1992), um FAD e um FMN (Bredt *et al.*, 1992, Hevel *et al.*, 1991) e uma (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (H_4B) (Hevel e Marletta, 1992, Schmidt *et al.*, 1992).

Embora distintas em vários aspectos, as isoformas de NOS partilham três características estruturais (Fig. 1.3): o terminal amínio forma o domínio oxigenase catalítico e liga os cofactores heme, H_4B e o substrato L-arginina (L-arg); o terminal carboxílico forma o domínio redutase e liga os restantes cofactores (FMN, FAD) e o co-substrato NADPH; existe um local de ligação para a calmodulina (CaM) entre os dois domínios. (Ghosh e Stuehr, 1995, McMillan e Masters, 1995).

As isoformas NOS I e III são expressas constitutivamente e são activadas por ligação do complexo Ca^{2+} -CaM quando a concentração

intracelular de Ca^{2+} é elevada. A isoforma NOS II, por seu turno, encontra-se activa para concentrações basais de Ca^{2+} , sendo a sua regulação efectuada ao nível da expressão (Cho *et al.*, 1992, Bredt e Snyder, 1990). A dependência sobre Ca^{2+} observada para as isoformas constitutivas deve-se à existência de um laço auto-inibitório no subdomínio de ligação de FMN (Fig. 1.3) que destabiliza a ligação da CaM para concentrações baixas do catião (Nishida e Ortiz de Montellano, 1999). A ligação do complexo Ca^{2+} -CaM aumenta a velocidade de transferência de electrões do NADPH para o domínio redutase (Gachhui *et al.*, 1998), que é essencial ao mecanismo de catálise.

Em todas as isoformas existe um local de ligação de zinco (Fig. 1.3) que se coordena a dois resíduos de cisteína, formando um centro tetratiolato. A ligação deste ião metálico parece desempenhar importantes funções estruturais (Raman *et al.*, 1998), nomeadamente ao nível da estabilização da forma dimérica da enzima (Hemmens *et al.*, 2000).

Nas isoformas constitutivas é ainda possível encontrar elementos estruturais que regulam a sua localização subcelular, nomeadamente um motivo PDZ em NOS I, que permite o estabelecimento de interações proteína-proteína específicas, e um local de miristoilação e outro de palmitoilação na NOS III, que permitem a sua ancoragem na membrana (Fig. 1.3) (Alderton *et al.*, 2001).

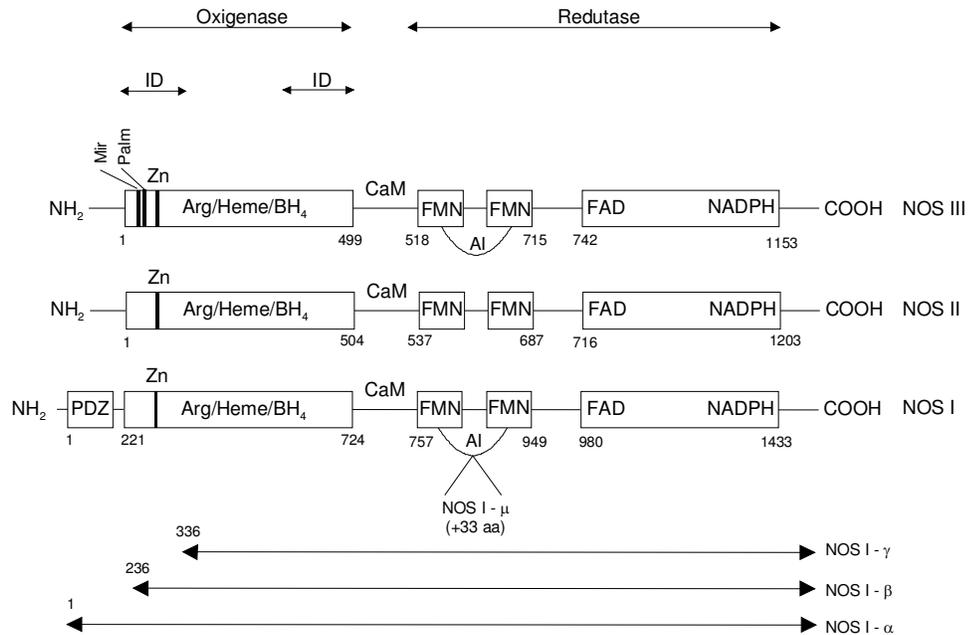


Figura 1.3 – Esquemática da estrutura da subunidade de cada isoforma de NOS, evidenciando a interface de dimerização (ID), os domínios oxigenase e redutase, locais de ligação dos cofactores, do substrato e Zn, o laço auto-inibitório (AI) no subdomínio de ligação de FMN em NOS I e III, locais de palmitoilação e miristoilação em NOS III e o motivo PDZ em NOS I. Para a NOS I são também esquematizadas as variantes resultantes de modificação pós-transcricional do ARN (Adaptado de Alderton *et al.*, 2001).

A NOS cataliza a reacção de oxidação de L-arginina (L-arg) a [•]NO e L-citrulina. A reacção requer O₂ e NADPH como co-substratos e ocorre em dois passos: num primeiro a L-arg é hidroxilada a N^o-hidroxi-L-arginina. Este intermediário é oxidado a [•]NO e L-citrulina no segundo passo da reacção (Fig. 1.4A).

O domínio reductase liga os dois cofactores de flavina e funciona como aceitador dos electrões provenientes do NADPH, passando-os para o grupo hémico, de modo semelhante ao observado para as citocromo P450 reductases. Os cofactores de flavina permitem que um dador de 2 electrões (NADPH) os

transfira para um aceitador de um electrão (heme) (Adak *et al.*, 1999). Por outro lado, a transferência de electrões entre o FAD e o FMN requer a presença da Ca^{2+} -CaM (Matsuda e Iyanagi, 1999). Curiosamente, os electrões provenientes do domínio redutase de uma subunidade (DR1) são transferidos para o heme do domínio oxigenase da outra subunidade (DO2), conforme esquematizado na Fig. 1.4B (Siddhanta *et al.*, 1996).

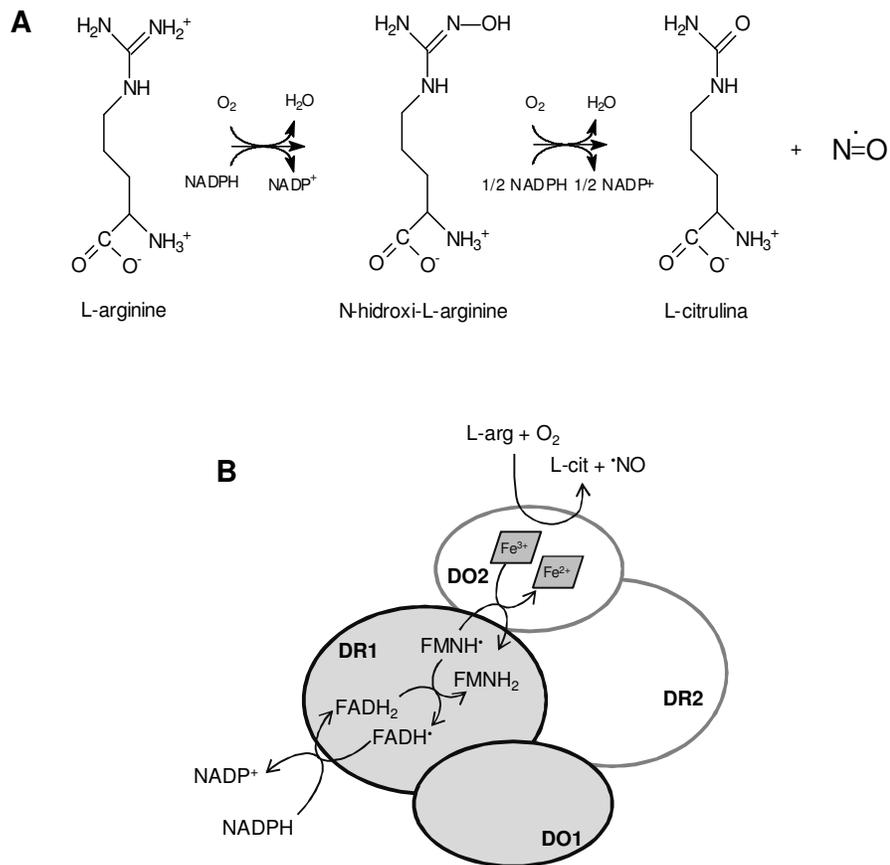


Figura 1.4 – A) Reacção de oxidação de L-arginina a $\cdot\text{NO}$ e L-citrulina catalizada pela NOS, com formação do intermediário N^{ω} -hidroxi-L-arginina; B) Esquema do dímero NOS indicando o fluxo de electrões deste do dador inicial (NADPH) ao final (heme ferrico). DR1 e 2 – Domínios redutase, DO1 e 2 – domínios oxigenase. Adaptado de Alderton *et al.*, 2001.

1.5. O Hipocampo

O conceito de NO enquanto neuromodulador tomou forma quando se relacionou a activação do receptor do glutamato do tipo NMDA com a síntese do radical em fatias de cérebro (Garthwaite *et al.*, 1988, Garthwaite *et al.*, 1989). A actividade reguladora do NO é particularmente relevante no hipocampo uma vez que tem sido proposto o seu envolvimento nos mecanismos de memória e aprendizagem bem como nos mecanismos de morte celular associados ao envelhecimento e neurodegenerescência nesta estrutura do sistema nervoso central (SNC). Neste contexto é importante salientar que o NO é um mensageiro distinto dos convencionais – como é um gás hidrofóbico e altamente difusível, não pode ser armazenado em vesículas e libertado face a uma estimulação. Antes, quando a célula produtora recebe o estímulo apropriado, sintetiza NO que então difunde intra e intercelularmente, sem que estruturas membranares limitem a sua esfera de acção. Por outro lado, não existem receptores membranares específicos para o NO como acontece para outros neurotransmissores. O seu principal alvo molecular, como já foi mencionado, é a sGC que se encontra no citosol das células alvo.

1.5.1. Estrutura

Os mamíferos possuem um hipocampo em cada hemisfério. É uma estrutura de forma curva que se localiza no lobo temporal mediano do SNC (Fig. 1.5A). Em termos citoarquitectónicos, cada hipocampo é constituído por duas camadas de células principais em forma de “C” que se encaixam uma na outra (Fig. 1.5B). A primeira destas camadas é formada por células piramidais (que no humano formam as subregiões CA1 a CA4 e no rato formam as subregiões CA1 e CA3) enquanto que a segunda é formada pelas células granulares do giro dentado (DG).

Esta estrutura aloja um circuito neuronal trisináptico (Fig. 1.5B). O córtex entorrinal é origem de uma forte projecção para o DG e estas fibras perfuram o subículo, terminando nas células granulares do DG. Os axónios das células granulares possuem várias varicosidades e por isso mesmo são

denominadas de fibras espinhosas. Estas fibras colateralizam na camada polimórfica da subregião CA3 e terminam em sinapses nas dendrites proximais das células piramidais. Os axónios das células piramidais de CA3 projectam axónios altamente colateralizados que, para além de participarem/colaborarem em ligações associativas dentro da mesma subregião, também emitem uma projecção principal, colectivamente designadas de colaterais de Schaffer, que termina nas células piramidais de CA1. Estas projectam uma fibra para o subículo, acabando a informação por voltar para o córtex entorrinal (Amaral e Witter, 1989).

Na década de 1970 foi proposta a “hipótese lamelar” segundo a qual as quatro vias activadas sucessivamente no hipocampo em resposta à aplicação de um estímulo ao córtex entorrinal se orientam na mesma direcção, transversalmente ao eixo longitudinal do hipocampo. Assim, numa fatia obtida por secção transversal do hipocampo (Fig. 1.5A), é possível obter o circuito completamente operacional (Fig. 1.5B), podendo cada fatia funcionar independentemente (Andersen *et al.*, 1971). Embora tenha já sofrido alguma remodelação, considerando-se presentemente que existem também importantes projecções no sentido longitudinal do hipocampo (Amaral e Witter, 1989), na essência esta teoria mantém-se válida, reforçando assim o interesse no uso de secções transversais de hipocampo em variadíssimos estudos.

Para além do córtex entorrinal, o hipocampo recebe também informação oriunda do septo, amígdala, tálamo, hipotálamo e núcleos monoaminérgicos do tronco cerebral e, em algumas espécies, do hipocampo contralateral (situado no hemisfério oposto). Embora não exista enervação do córtex sensorial primário, a informação sensorial chega indirectamente ao hipocampo a partir do córtex associativo relacionado com o estado de alerta, atenção, emoção e memória. O hipocampo integra toda esta informação, sendo por isso encarado como uma região cortical de associação supramodal (Copper e Lowenstein, 2003).

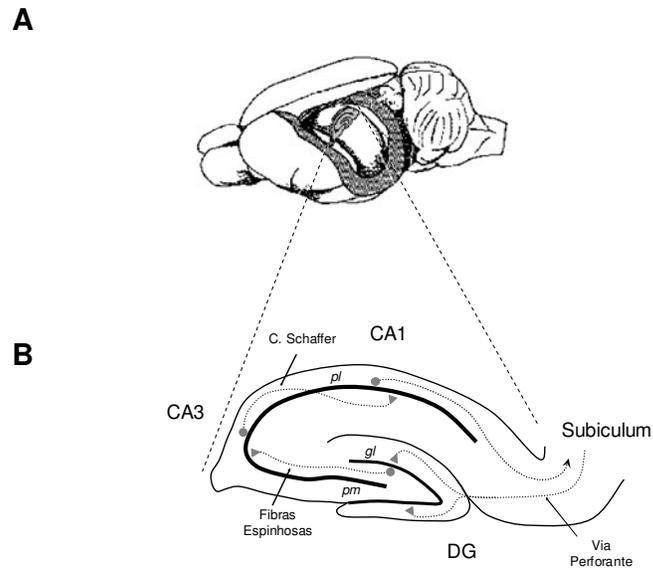


Figura 1.5 – A) Localização do hipocampo no sistema nervoso central do rato com indicação do sentido do corte transversal que permite obter a fatia de hipocampo; B) Fatia de hipocampo e rato onde se observam subregiões CA1, CA3 e DG, bem como as camadas de células principais (pl – camada de células piramidais ou *stratum pyramidale*; gl – camada de células granulares ou *stratum granulosum* e pm – camada de células polimórficas) e o circuito neuronal (Adaptado de Ledo *et al.*, 2004).

1.5.2. Função

Há muito que se considera que os processos de memória e aprendizagem têm por base neuromolecular a alteração da força sináptica, e o hipocampo, sendo uma estrutura claramente dedicada ao processo de formação de memórias do tipo declarativo, tem sido amplamente utilizado como preparação de eleição para o estudo destes mecanismos (Bliss e Collingridge, 1993).

A primeira indicação de que o hipocampo participaria nos processos de formação de memória surgiu em meados da década de 1950 quando se observou num doente sujeito à remoção bilateral do lobo temporal a incapacidade de formar novas memórias, embora as formadas antes da cirurgia se mantivessem intactas (Scoville e Milner, 1957).

Dos substratos neuronais de aprendizagem e memória podem destacar-se a facilitação, que consiste no aumento do potencial pós-sináptico em resposta a uma estimulação pré-sináptica de alta frequência (Capogna, 1998); potenciação pós-tetânica, que consiste no aumento da libertação de transmissores após um *input* excitatório rápido e resulta numa sensibilização do neurónio durante um longo período de tempo (Weeks *et al.*, 1997) e potenciação sináptica de longa duração (LTP), onde o neurónio permanece num nível de excitação prolongado em resultado de um *input* excitatório rápido aplicado a um neurónio já despolarizado e que, muito provavelmente, implica alteração na expressão de proteínas (Hevroni *et al.*, 1998).

Em 1973, o fenómeno de LTP foi descrito no hipocampo, em particular nas sinapses entre as fibras do córtex entorrinal e as células granulares do DG (Bliss e Lomo, 1973). O mesmo fenómeno pode ser observado nas restantes sinapses principais do hipocampo, embora em cada subregião possua propriedades específicas (Nicoll e Malenka, 1995). A LTP partilha características com modelos comportamentais de memória e aprendizagem, tais como a especificidade de *input* e associatividade e é geralmente aceite

que está na base celular destes processos cognitivos (Copper e Lowenstein, 2003).

A LTP possui características que permitem considerá-la como o mecanismo neuromolecular subjacente ao processo de formação de memórias atribuído ao hipocampo: observa-se em todas as sinapses principais do hipocampo, é rapidamente induzida e permanece estável durante horas ou mesmo dias, dependendo do número de repetições do estímulo (Milner *et al.*, 1998). A LTP não é um processo exclusivo do hipocampo, sendo observado no córtex cerebral e na amígdala, mas foi inicialmente descrito naquela estrutura e aí tem sido extensivamente estudado

Embora nas três principais sinapses do hipocampo se observe LTP, distinguem-se duas formas. Nas sinapses estabelecidas entre as fibras espinhosas e as células piramidais da subregião CA3 a LTP é não associativa e não requer a actividade simultânea dos elementos pré- e pós-sinápticos. No DG e na subregião CA1 a LTP é associativa e requer actividade coincidente nos elementos pré e pós sinápticos (Milner *et al.*, 1998). Enquanto neste último caso a LTP é dependente da activação de receptores do glutamato do tipo NMDA, o mesmo já não acontece na subregião CA3. Este receptor permite detectar a actividade simultânea dos dois elementos da sinapse pois a sua abertura requer a ligação do agonista proveniente de um terminal pré-sináptico activo e despolarização da célula pós-sináptica (Bliss e Collingridge, 1993).

O influxo de Ca^{2+} para a célula pós-sináptica é um requisito da indução de LTP, activando directa e/ou indirectamente três proteína cinases: a proteína cinase II dependente de Ca^{2+} /CaM (Malenka *et al.*, 1989, Malinow *et al.*, 1988), a proteína cinase C (Malinow *et al.*, 1988) e a tirosina cinase *fyn* (Grant *et al.*, 1992, O'Dell *et al.*, 1991) que desencadeiam cascatas de sinalização intracelulares. Seguem-se as fases de expressão e manutenção, cuja localização é ainda debatida, podendo ser pré-sináptica e/ou pós-sináptica (Bliss e Collingridge, 1993).

1.5.3. Receptores do Glutamato no Hipocampo

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC dos mamíferos, podendo atingir na fenda sináptica uma concentração da ordem de grandeza de milimolar durante alguns milissegundos (Clements, 1996, Clements *et al.*, 1992, Nicholls e Attwell, 1990). No hipocampo 90 % das sinapses são glutamatérgicas (Vizi e Kiss, 1998).

O neurotransmissor é armazenado em vesículas no terminal pré-sináptico, sendo libertado quando este recebe um estímulo apropriado. Uma vez na fenda sináptica, liga-se a receptores específicos produzindo-se uma resposta nas células onde esses receptores se encontram. A resposta ao glutamato é mediada por vários tipos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, funcional e farmacologicamente distintos. A activação de receptores metabotrópicos resulta na activação de proteínas G, que podem conduzir à supressão de corrente de canais de K⁺, ao aumento de corrente em canais iónicos não selectivos, à inibição de receptores de ácido γ -amino butírico (GABA) e à potenciação de receptores ionotrópicos (Conn e Pin, 1997, Pin e Duvoisin, 1995). Os receptores ionotrópicos são canais iónicos cuja actividade depende da ligação de um ligando específico, neste caso glutamato, e são responsáveis pela maior parte da transmissão sináptica excitatória no SNC.

Existem três tipos de receptores ionotrópicos de Glutamato com propriedades distintas. Os nomes foram atribuídos em função da selectividade dos seus agonistas não endógenos – NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-4-metil-4-isoxazolepropionato) e KA (cainato). Estes 2 últimos são normalmente designados de não-NMDA, pois a especificidade de ligação a cada um dos agonista não é total. Para além das diferenças farmacológicas entre os diferentes receptores ionotrópicos, existem também diferenças ao nível da permeabilidade iónica: enquanto os receptores NMDA são permeáveis principalmente a Ca²⁺ e apenas ligeiramente permeáveis a Na⁺, os receptores

não-NMDA apresentam tipicamente maior permeabilidade a Na^+ (Dingledine *et al.*, 1999, Kew e Kemp, 2005, Ozawa *et al.*, 1998).

Os receptores NMDA são constituídos por combinação heteróloga de subunidades de três famílias – NR1, NR2A-D e NR3A e B. O receptor funcional possui pelo menos uma subunidade do tipo NR1 (que pode existir em 8 variantes de processamento pós-transcricional) e outra do tipo NR2, enquanto subunidades do tipo NR3 podem ou não estar presentes. Como existem várias possibilidades de combinação podem encontrar-se receptores com propriedades de afinidade pelos ligandos, permeabilidade iónica e regulação muito distintas. Os receptores NMDA apresentam uma cinética relativamente lenta e são altamente permeáveis a Ca^{2+} . Contrariamente aos outros tipos de receptores do glutamato, a abertura do canal requer a ligação do agonista e do co-agonista glicina. Para um potencial de membrana de repouso o canal iónico do receptor encontra-se bloqueado por Mg^{2+} , que é removido quando a membrana é ligeiramente despolarizada (Revisto em Kew e Kemp, 2005).

Na sinapse glutamatérgica, os receptor NMDA são normalmente co-expressos com receptores do tipo AMPA cuja activação permite atingir a despolarização necessária para aliviar o bloqueio imposto ao receptor NMDA pelo Mg^{2+} . Ao contrário dos receptores NMDA, caracterizados por ter uma cinética lenta, os receptores de AMPA respondem muito rapidamente à ligação de agonista (Nowak *et al.*, 1984, Ottersen e Landsend, 1997, Palmer *et al.*, 2005).

1.5.4. Outros Neurotransmissores

Embora a base citoarquitectónica do hipocampo seja o neurónio glutamatérgico, ocorre a libertação de outros neurotransmissores. Os dados neuroanatómicos indicam que praticamente todos os interneurónios do hipocampo (a segunda população neuronal mais numerosa) são GABAérgicos (Freund e Buzsaki, 1996). Estes neurónios constituem cerca de 10 % do total de neurónios e enervam maioritariamente as células principais do hipocampo, mas também interneurónios (Acsady *et al.*, 1996, Gulyas *et al.*, 1996). A sua

principal função é regular o circuito excitatório glutamatérgico das células principais.

Para além de Glutamato e GABA, libertados por neurónios do hipocampo, esta estrutura é enervada por fibras oriundas de outras regiões do SNC e que libertam neurotransmissores diferentes, nomeadamente fibras colinérgicas com origem no septo medial e na área de Broca (Umbriaco *et al.*, 1995), fibras noradrenérgicas com origem no *locus coeruleus* (Loy *et al.*, 1980) e ainda fibras serotonérgicas oriundas núcleos dorsais e medianos de Rafe, (Umbriaco *et al.*, 1995). É importante referir que a maior parte das varicosidades contendo estes neurotransmissores não participam na transmissão sináptica, havendo antes libertação para o espaço extrasináptico (Vizi e Kiss, 1998, Umbriaco *et al.*, 1995). Os neurotransmissores libertos fora da sinapse funcionam como moduladores tónicos da actividade neuronal – são neuromoduladores ou neuro-hormonas – afectam um volume grande de tecido nervoso e a resposta celular depende da distribuição de receptores nas células alvo (Vizi e Kiss, 1998). Alguns autores chamam esta forma de transmissão não-sináptica de “transmissão em volume” (Agnati *et al.*, 1995).

O NO produzido por activação do receptor NMDA pode ser encarado, devido à sua difusão, como um neurotransmissor não-sináptico (Garthwaite *et al.*, 1988).

1.5.5. O Óxido Nítrico no Hipocampo

No SNC, a síntese de NO foi inicialmente descrita no cerebelo em resposta à activação de receptores do glutamato ionotrópicos (Garthwaite *et al.*, 1988). A identificação desta molécula altamente difusível no SNC como participante em vias de sinalização neuronal revolucionou o próprio conceito de transmissão neuronal, pois, como já foi referido, contrariamente aos neurotransmissores clássicos (Glutamato, acetilcolina, glicina, dopamina etc.) o NO não pode ser armazenado em vesículas e não possui um receptor membranar específico. Sendo um gás hidrofóbico, permeia membranas biológicas (Shaw e Vosper, 1977) e não distingue entre células funcionalmente

acopladas ao neurónio produtor e células adjacentes. Quando a sua síntese é estimulada num determinado neurónio por elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} , o NO produzido pode afectar um grande volume de tecido, independentemente da existência ou não de ligação sináptica entre o neurónio produtor e a célula alvo (Beckman e Koppenol, 1996, Lancaster, 1994, Wood e Garthwaite, 1994).

No SNC, nomeadamente no hipocampo, é possível encontrar as três isoformas de NOS. A isoforma neuronal, NOS I, inicialmente descrita no cerebelo, já foi identificada em várias outras regiões, embora com níveis de expressão diferentes. Em ratos e em ratinhos a enzima foi descrito na via olfactiva, em todas as regiões corticais e neocorticais, no cerebelo e no estriado (Gotti *et al.*, 2005, Vincent e Kimura, 1992).

No que respeita o hipocampo, a NOS I foi inicialmente localizada nos interneurónios GABAérgicos (Bredt *et al.*, 1991, Valtschanoff *et al.*, 1993), mas a primeira descrição da expressão de NOS I nas células piramidais da subregião CA1 surgiu em 1994 (Wendland *et al.*, 1994), sendo posteriormente confirmado por Burette *et al.*, 2002. A NOS I é expressa em todas as subregiões do hipocampo e o nível de expressão varia durante o desenvolvimento (Blackshaw *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2003).

A isoforma endotelial – NOS III – é expressa nos vasos sanguíneos do SNC, maioritariamente nas artérias e arteríolas, mas também em veias, vénulas e capilares, onde o NO participa na regulação fisiológica do relaxamento vascular (Topel *et al.*, 1998). O NO originário da actividade desta isoforma parece poder desempenhar um papel na plasticidade sináptica, pois em ratinhos silenciosos para apenas uma das isoformas constitutivas de NOS, a LTP desenrola-se de forma normal, o mesmo já não ocorrendo em ratinhos silenciosos para ambas. Esta observação aponta para um mecanismo de compensação da NOS I pela NOS III (Son *et al.*, 1996). Bon e Garthwaite propuseram que a actividade cada isoforma tem uma função específica neste processo de plasticidade sináptica. Enquanto a NOS III mantém um tónus de NO de baixa concentração, a NOS I produz uma elevação transiente da

concentração do radical em resposta à activação do receptor NMDA (Bon e Garthwaite, 2003).

A NOS II é expressa por macrófagos activados por exposição a determinados estímulos (citocinas, por exemplo). É uma enzima de alto débito – produz uma elevada quantidade de NO por um longo período de tempo (entre horas a dias, desde que os substratos estejam disponíveis, Alderton *et al.*, 2001). Estudos recentes indicam que no SNC ela é expressa exclusivamente por células da microglia activadas, as células imunologicamente competentes do SNC (Duport e Garthwaite, 2005).

Por fim, a NOS mitocondrial (mtNOS), provavelmente uma variante da NOS I resultante de processamento pós-transcricional do ARN, e cuja actividade tem sido objecto de controvérsia, também já foi identificada no hipocampo (Lores-Arnaiz *et al.*, 2005).

1.5.6. O Óxido Nítrico e Receptores N-Metil-D-Aspartato

As subunidades dos receptores NMDA e AMPA possuem terminais carboxílicos intracelulares através dos quais estabelecem ligações com componentes citosólicos (Hollmann e Heinemann, 1994). Esta característica tem consequências biológicas notórias, permitindo uma regulação fina do funcionamento dos receptores, nomeadamente por interacção com proteínas citosólicas e/ou com elementos do citoesqueleto e torna possível o seu acoplamento directo a cascatas de sinalização intracelulares.

Nos receptores NMDA, a subunidade NR1 interage com a proteína do citoesqueleto α -actina, o que regula a sua localização relativamente à sinapse; quando a ligação é quebrada, o receptor desloca-se para fora da sinapse (passa a ser extra-sináptico), o que torna a célula menos vulnerável à estimulação excessiva que se observa durante um insulto excitotóxico (Arundine e Tymianski, 2003). A subunidade NR2, por seu lado, possui no seu terminal carboxílico um motivo PDZ (motivo de interacção proteica descrita inicialmente em PSD-95, DLG, Z0-1) que lhe permite ligar a elementos presentes da densidade pos-sináptica através de interacções proteína-proteína

específicas. Um exemplo crítico é a PSD-95 (*post-synaptic density protein 95*) que existe na densidade pós-sináptica e liga várias proteínas simultaneamente. Poder-se-á dizer que funciona como uma matriz, mantendo vários elementos na proximidade física uns dos outros, acoplando a sua actividade (Sheng e Pak, 1999).

Visto que a NOS I possui também um motivo PDZ, não foi surpreendente verificar que a PSD-95 liga a esta enzima (Brennan *et al.*, 2002, Christopherson *et al.*, 1999, Stricker *et al.*, 1997) numa estrutura supraproteica que inclui outras proteínas com consequências no acoplamento físico e funcional do receptor NMDA à NOS I (Figs. 1.6). Esta noção torna-se notória considerando que este receptor é um canal permeável a Ca^{2+} e que a NOS I é activada pela ligação do complexo Ca^{2+} -CaM. Isto é, quando ocorre um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , a proximidade física entre receptor e enzima permite o seu acoplamento funcional. Estando a NOS I muito próximo do local onde ocorre influxo de Ca^{2+} é natural que se atinja rapidamente uma velocidade de síntese de NO próxima do máximo. Porém este mecanismo não permite uma regulação fina da produção do radical: o NO produzido em consequência da activação de receptores NMDA tende a atingir concentrações elevadas e potencialmente tóxicas (Aarts e Tymianski, 2003). Este acoplamento físico e funcional entre receptor e enzima já foi demonstrado em neurónios piramidais de hipocampo (Yang *et al.*, 2004) e em fatias de hipocampo de rato (Burette *et al.*, 2002).

1.5.7. Difusão e Regulação da Actividade do Óxido Nítrico

Devido às suas propriedades físico-químicas já mencionadas anteriormente, nomeadamente o seu baixo peso molecular e hidrofobicidade, o NO permeia facilmente membranas biológicas (Shaw e Vosper, 1977), sendo provável que difunda vários diâmetros celulares. A distância efectiva que o NO difunde desde o seu ponto de síntese é limitada pela velocidade de reacção com os seus alvos moleculares (Beckman e Koppenol, 1996, Lancaster, 1994, Wood e Garthwaite, 1994). Alguns resultados obtidos em culturas celulares

sugerem que o NO produzido endogenamente pode difundir até uma distância de 100 a 200 μm a partir do seu local de síntese, o que está de acordo com o seu coeficiente de difusão elevado, 3300 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Malinski *et al.*, 1993; Meulemans, 1994). Em estruturas biológicas que preservam a organização e arquitectura celulares, nomeadamente do SNC, não existem resultados experimentais sólidos para o raio de difusão.

A primeira indicação clara da actividade de mensageiro intercelular do NO no SNC surgiu da observação de que era possível induzir potenciação da força sináptica dependente de NO em pares de neurónios separados entre si 100 μm no hipocampo (Schuman e Madison, 1994). Enquanto isso, um estudo paralelo estimou o diâmetro da esfera de influência do NO produzido por uma única fonte de diâmetro entre 1 e 10 μm em 200 μm , o que corresponde a um volume de tecido nervoso contendo 2 milhões de sinapses (Wood e Garthwaite, 1994). Estas duas observações, seleccionadas de entre muitas outras, suportam a noção de mensageiro intercelular difusível no SNC atribuída ao NO .

Assim, para uma molécula não passível de armazenamento em vesículas e que difunde isotropicamente a partir do seu ponto de síntese, o perfil de concentração do NO no tempo e no espaço é determinado pela regulação da síntese e pelo tipo e distribuição dos seus alvos moleculares na vizinhança do local de produção. Embora o NO não seja uma molécula particularmente reactiva, a sua reacção rápida com o O_2^- , radicais peróxido lipídicos, proteínas contendo metais de transição, resíduos tiólicos existentes em proteínas ou compostos de baixo peso molecular (por exemplo glutatião) e o O_2 certamente regulam o seu tempo de vida e a sua biodisponibilidade. Em macrófagos activados isolados determinou-se uma esfera de difusão de NO com diâmetro de 500 μm , sendo dramaticamente reduzida na presença de proteínas e lípidos no meio reaccional (Porterfield *et al.*, 2001). A reacção do NO com a hemoglobina é claramente a principal via de remoção do radical em organismos vivos (Lancaster, 1997). Outras vias menos estudadas incluem a desactivação do radical por reacção com flavoproteínas observada em

algumas linhas celulares (Gardner *et al.*, 2001), ou com uma proteína presente do SNC ainda não identificada, mas claramente distintas das hemoproteínas mais óbvias (Griffiths e Garthwaite, 2001). Alguns autores sugerem ainda uma remoção de NO mediada por um elemento membranar de origem lipídica (Keynes *et al.*, 2005). Uma outra reacção que pode modular os sinais de NO é a auto-oxidação na fase lipídica. Embora pouco significativa em solução aquosa para concentrações fisiológicas de O_2 e baixas concentrações de NO , devido à natureza hidrofóbicos de ambos os gases ela prossegue a um ritmo considerável no interior de membranas biológicas (Liu *et al.*, 1998).

Para além da regulação da actividade da NOS I pela disponibilidade dos seus substratos, cofactores e concentração intracelular de Ca^{2+} , o acoplamento ao receptor NMDA regula a localização sub-celular da enzima e consequentemente a bioactividade do NO . Existem algumas proteínas capazes de competir com a PSD-95 pela ligação à NOS I, removendo-a deste complexo e assim afastando a enzima da influência da elevação de Ca^{2+} que ocorre aquando da activação do receptor. Um exemplo é a CAPON. Esta proteína citosólica compete com a PSD-95 pela ligação à NOS I sendo assim responsável pelo seu desacoplamento do receptor NMDA (Jaffrey *et al.*, 1998). A CAPON interage também com a sinapsina I através de um domínio fosfotirosina localizado no terminal amínico e o complexo ternário NOS/CAPON/sinapsina I formado promove a translocação da NOS I para outros locais subcelulares, nomeadamente pré-sinápticos (Fig. 1.7) (Jaffrey *et al.*, 2002).

Para além destas, outras proteínas ligam a NOS I e regulam a sua localização, como, por exemplo, a *heat shock proteina 90* (Bender *et al.*, 1999) e a fosfofrutocinase (Firestein e Bredt, 1999). Ainda mais a montante, ocorre regulação da actividade da NOS por fosforilação por proteína cinases (proteína cinase C, proteína cinase dependente de cAMP, proteína cinase dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$), o que sugere que a síntese neuronal de NO é modulada por uma miríade de cascatas de sinalização intracelular (Bredt *et al.*, 1992).

Por fim, e como já foi mencionado, a NOS é sujeita a regulação pelo próprio NO que se liga ao centro hémico para formar um complexo ferri-nitrosilo estável ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$), inactivar a enzima (Alderton *et al.*, 2001, Cooper, 1999, Griscavage *et al.*, 1995).

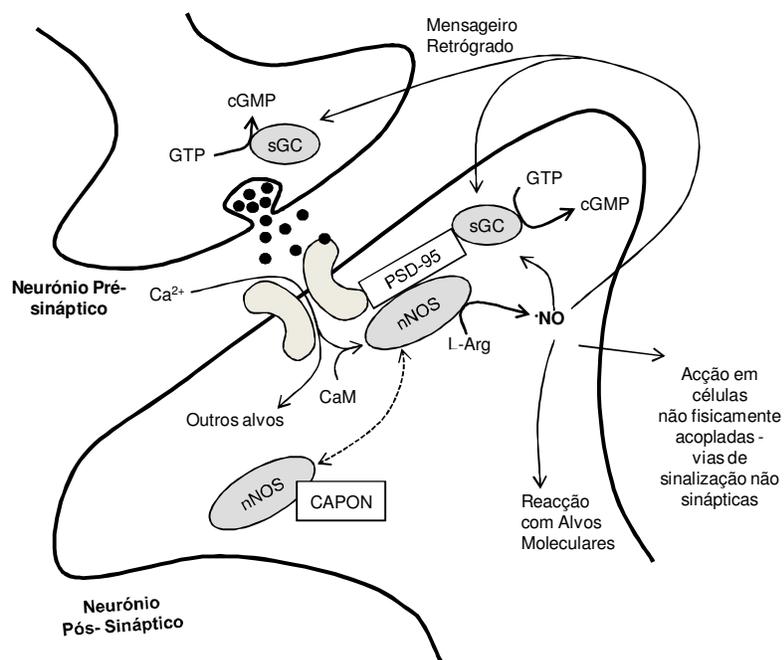


Figura 1.6 – A sinapse glutamatérgica com NOS I acoplada ao receptor NMDA. No esquema realçam-se a via de síntese de NO no terminal pós sináptico, difusão intra e intercelular, interação com alvos moleculares e regulação da actividade da NOS I. (Adaptado de Ledo *et al.*, 2004).

1.5.8. Bioactividade do Óxido Nítrico no Hipocampo

O aumento da força sináptica observada na LTP pode resultar de modificações pós-sinápticas, como por exemplo no aumento da sensibilidade ao neurotransmissor devido a uma maior expressão de receptores, pré-sinápticas, como por exemplo aumento da libertação de neurotransmissor a partir do terminal pré-sináptico, ou ambas. O fluxo de informação do terminal pós-sináptico, onde ocorre a elevação concentração de Ca^{2+} necessária à indução de LTP, para o pré-sináptico requer a existência de um neurotransmissor retrógrado. Em 1991, dois grupos demonstraram que o 1NO é produzido na célula pós-sináptica da subregião CA1 em resposta a um estímulo tetânico das fibras colaterais de Schaffer e que a difusão do radical no espaço extracelular era condição necessária à potenciação (O'Dell *et al.*, 1991, Schuman e Madison, 1991). Mais tarde confirmou-se que o 1NO produzido pós-sinápticamente difunde na fenda sináptica até chegar à contraparte sináptica (Arancio *et al.*, 1996). O 1NO parece exercer a sua acção no terminal pré-sináptico regulando, por exemplo, a endocitose pré-sináptica de vesículas (Micheva *et al.*, 2003) e a libertação de neurotransmissores (revisto em Prast e Philippu, 2001).

A transdução do sinal produzido por síntese de 1NO envolve a activação da sGC e aumento da concentração de cGMP. Este mensageiro intracelular secundário activa proteína cinases dependentes de cGMP e desencadeia cascatas de fosforilação. Existem também alguns efeitos atribuídos ao 1NO e não dependentes de cGMP (Jacoby *et al.*, 2001, Kleppisch *et al.*, 1999, Lev-Ram *et al.*, 2002), nomeadamente a S-nitrosilação de enzimas, proteínas G, factores de transcrição, transportadores, receptores de transmissores (Lei *et al.*, 1992) e canais iónicos (Stamler, 1994, Stamler *et al.*, 1997, Yao *et al.*, 1997) como o canal de Ca^{2+} do tipo L (Campbell *et al.*, 1996), modificação de resíduos de tirosina e estimulação da ADP-ribosilação (Schuman *et al.*, 1994).

O fenómeno inverso da LTP é o enfraquecimento da força sináptica por um longo período, denominada de depressão de longa duração (LTD), e normalmente surge em resposta a uma estimulação tetânica fraca. No hipocampo, a LTD é dependente da activação de receptores do glutamato ionotrópicos (nomeadamente do tipo NMDA) e metabotrópicos (Bashir *et al.*, 1993, Dudek e Bear, 1992, Stanton *et al.*, 1991, Wexler e Stanton, 1993). Observa-se elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} nos terminais pós- e pré-sináptico, e também neste caso, o NO foi identificado como um mensageiro retrógrado (Izumi e Zorumski, 1993). Contrariamente ao observado em LTP, o NO diminui a quantidade de neurotransmissor libertada, o que claramente resulta na diminuição da força sináptica (Stanton *et al.*, 2003).

1.6. Detecção de Óxido Nítrico

Do que foi descrito até aqui compreende-se que a actividade do NO em mecanismos fisiológicos e patológicos do hipocampo está criticamente dependente da sua dinâmica de concentração e do raio de difusão do radical. Assim, a medida da dinâmica de concentração de NO no tempo e no espaço é de suma importância para o entendimento da sua actividade biológica. De facto, embora seja uma das moléculas biológicas mais estudadas, a sua natureza radicalar e curto tempo de vida têm dificultado a sua medição directa e em tempo real no meio biológico. Muito do que se sabe sobre a actividade biológica do NO tem por base estudos qualitativos clássicos de farmacologia com utilização de inibidores e medidas indirectas de actividade.

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de uma metodologia apropriada para a medida de NO , *in vitro* ou *in vivo* é a dupla necessidade de sensibilidade e selectividade. Grande parte dos trabalhos publicados relativos à biossíntese e efeitos fisiopatológicos do NO não reportam os valores de concentração do radical. Por outro lado, a grande parte dos métodos existentes são indirectos, medindo produtos de reacção ou decomposição do NO , ou a extensão de alguns efeitos atribuídos ao NO .

O $\cdot\text{NO}$ possui quatro propriedades que estabelecem as bases dos vários métodos de detecção: *i)* é possível medir a sua actividade biológica, nomeadamente a extensão do relaxamento muscular em vasos sanguíneos ou a inibição da actividade de plaquetas (Furchgott e Zawadzki, 1980, Ignarro *et al.*, 1987, Salvemini *et al.*, 1990); *ii)* a sua reactividade com espécies com actividade redox, nomeadamente com o ferro hémico da oxi-hemoglobina ou com armadilhas de spin (Drapier *et al.*, 1991, Lancaster *et al.*, 1992); *iii)* em sistemas biológicos, os produtos de decomposição do $\cdot\text{NO}$ (NO_2^- e NO_3^-) e os produtos resultantes da sua síntese (L-citrulina) são estáveis e podem ser quantificados por uma variedade de métodos (Bredt e Snyder, 1990, Green *et al.*, 1982); *iv)* $\cdot\text{NO}$ pode ser detectado directamente através de interações com o seu electrão desemparelhado, quer por quimioluminescência quer por oxidação ou redução num sensor electroquímico (Fontijn *et al.*, 1970, Friedemann *et al.*, 1996, Kikuchi *et al.*, 1993, Malinski e Taha, 1992, Shibuki e Okada, 1991).

Os métodos mais comuns incluem a quimioluminescência, espectrofotometria de UV-Vis, fluorescência, espectroscopia paramagnética electrónica e electroquímica. Cada técnica tem as suas vantagens individuais, bem como desvantagens que limitam a sua aplicabilidade, desde sensibilidade e selectividade limitadas à necessidade de grande processamento da amostra ou recurso a equipamentos muito especializados ou caros.

Os métodos electroquímicos permitem não só a detecção directa e em tempo real de $\cdot\text{NO}$. Por outro lado, o facto de existirem eléctrodos de variadíssimas formas geométricas e dimensões, permite realizar medições em diferentes preparações, como tecidos e células individuais.

A detecção electroquímica de $\cdot\text{NO}$ baseia-se na sua oxidação à superfície activa de um eléctrodo, com consequente geração de uma corrente de oxidação que pode ser medida. Mecanicamente, a detecção electroquímica decorre em duas etapas: a primeira é a reacção electroquímica à superfície do eléctrodo (reacção 12), com transferência de um electrão, a que

se segue uma reacção química (reacção 13), com formação de NO_2^- e é dependente do pH (Malinski e Czuchajowski, 1996).



Como a oxidação do NO_2^- no eléctrodo ocorre a um potencial apenas 60 a 80 mV acima do potencial de oxidação do $\text{}^{\cdot}\text{NO}$, a oxidação de $\text{}^{\cdot}\text{NO}$ na superfície do eléctrodo pode resultar na transferência de dois electrões adicionais consequência da oxidação do NO_2^- a NO_3^- .

A corrente de oxidação do $\text{}^{\cdot}\text{NO}$ pode ser medida amperométrica ou voltametricamente – no primeiro caso o potencial de oxidação é mantido constante enquanto se mede a corrente e no segundo caso o potencial varia dentro de um intervalo que inclui o potencial de oxidação do $\text{}^{\cdot}\text{NO}$ (Malinski e Czuchajowski, 1996). Embora os dois métodos permitam obter informação quantitativa, a amperometria é mais apropriada na detecção de $\text{}^{\cdot}\text{NO}$ em sistemas biológicos, pois é um dos métodos electroanalíticos mais sensíveis e permite um registo contínuo da corrente (Allen *et al.*, 2002). Os métodos voltamétricos fornecem informação qualitativa, pois permitem identificar e isolar outras espécies electroactivas presentes na preparação (Stamford *et al.*, 1992).

Em 1990, Shibuki desenvolveu aquele que seria o primeiro sensor electroquímico para medir $\text{}^{\cdot}\text{NO}$ em fatias de cérebro (Shibuki, 1990, Shibuki e Okada, 1991). Este sensor era constituído por um eléctrodo de Clark, semelhante aos detectores utilizados para medir O_2 electroquimicamente, tendo o autor revertido a polaridade para permitir a oxidação de $\text{}^{\cdot}\text{NO}$.

Em 1992, Malinski e Taha descreveram um microeléctrodo de fibra de carbono para medir com a superfície activa modificada por electropolimerização da níquel porfirina (Ni^{II} tetrakis(3-metoxi-4-hidroxifenil)porfirina – Ni^{II} (TMHPP)) e deposição uma camada de Nafion®, um

polímero com esqueleto de politetrafluoretileno com cadeias laterais de ácido sulfónico, desenvolvido pela Dupond (Malinski e Taha, 1992).

A porfirina utilizada por Malinski e Taha teria, aparentemente, propriedades catalíticas, favorecendo a oxidação do $\cdot\text{NO}$ à superfície do eléctrodo com aumento de sensibilidade e desviando o potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$ para um valor mais baixo do que aquele observado para o carbono não modificado.

A utilização de Nafion® para revestimento de eléctrodos foi inicialmente proposta em 1984 com o objectivo de melhorar a selectividade de eléctrodos de grafite utilizados para medir aminas e indolaminas biogénicas no SNC, nomeadamente dopamina, 5-hidroxitriptamina e epinefrina. Os autores constataram que o Nafion® melhorava significativamente a selectividade contra espécies relevantes como os seus metabolitos e o ascorbato (Gerhardt *et al.*, 1984). O uso deste filme foi depois alargado aos microeléctrodos de fibra de carbono, conferindo propriedades analíticas superiores em termos de selectividade (Brazell *et al.*, 1987).

Quando o Nafion® está convenientemente hidratado, os grupos sulfonato são neutralizados por catiões do meio e o filme torna-se bastante impermeável a pequenas moléculas carregadas negativamente (Allen *et al.*, 2002, Chiou e Paul, 1988, Sakai *et al.*, 1986). Por outro lado, o Nafion® previne a diminuição do sinal voltamétrico no decorrer de medições em tecidos ou *in vivo* (Kristensen *et al.*, 1987).

Uma das principais características a ter em consideração no desenvolvimento de eléctrodos para medir $\cdot\text{NO}$ é a sua selectividade contra outras espécies electroactivas presentes na preparação. Ao potencial utilizado para medir $\cdot\text{NO}$ (normalmente + 0,9 V), os eléctrodos de carbono não modificados medem ascorbato, catecolaminas e os seus metabolitos, indóis e os seus metabolitos e ainda NO_2^- . Excluindo este último, os restantes compostos têm massa molecular muito superior a $\cdot\text{NO}$, com carga neutra ou negativa, e apresentam um potencial de oxidação inferior ao do radical, desde -0,2 a +0,75 V (Stamford *et al.*, 1992). Já o NO_2^- é oxidado a um potencial

ligeiramente superior ao do NO (cerca de 60 a 80 mV) e é o seu principal produto de reacção em preparações biológicas.

Assim, outros autores, apenas utilizaram polímeros para melhorar da selectividade dos microeléctrodos de fibra de carbono. A escolha dos polímeros obedece a determinados critérios, como a permeabilidade a moléculas de reduzida dimensão e insolubilidade em solução aquosa (Pariante *et al.*, 1994). O microeléctrodo de fibra de carbono apresentado e utilizado neste trabalho foi revestido com *orto*-fenilenediamina (*o*-PD) electropolimerizada e Nafion®, à semelhança do que foi inicialmente apresentado por Friedemann *et al.* em 1996.

A *o*-PD tem sido utilizada para preparar sensores de NO com elevada selectividade. A espessura típica de um filme de *o*-PD electrodepositado na superfície de um eléctrodo de carbono é de 60 nm, com um poro de 1 nm de diâmetro (Ohnuki *et al.*, 1983), o que impede o acesso à superfície activa do eléctrodo de moléculas com massa molecular superior a 170 g/mol (Pontie *et al.*, 2000). Vários autores reportaram a eficácia deste polímero em conferir selectividade aos sensores contra compostos relevantes como a dopamina, o 5-hidroxitriptamina, ascorbato, entre outros (Ferreira *et al.*, 2005, Friedemann *et al.*, 1996, Pontie *et al.*, 1999).

1.7. Objectivos e Organização do Trabalho

O NO é reconhecidamente um mensageiro intercelular com características que o distinguem dos mensageiros ditos clássicos. As propriedades físico-químicas associadas à reactividade em sistemas biológicos determinam que a sua bioactividade seja criticamente influenciada pela dinâmica de concentração, isto é, a forma como a concentração varia não só no tempo como no espaço. Um aumento transitório da concentração de NO por estimulação da NOS é traduzida numa actividade biológica, quer do lado da fisiologia, quer do lado da patologia.

Embora se encontrem na literatura vários estudos que abordam fenomenologicamente, a actividade de NO em várias preparações obtidas a

partir do SNC, incluindo o hipocampo, pouco se sabe sobre os aspectos quantitativos, facto que limita a previsão da sua acção no SNC. O conhecimento sobre a variação temporal e espacial da sua concentração quando se activa a sua principal via de síntese neuronal, o receptor NMDA, reveste-se pois de uma relevância extraordinária para o conhecimento da actividade biológica deste radical com consequências na fisiologia e patologia do cérebro.

Assim, os objectivos do trabalho aqui apresentado reúnem-se em 3 capítulos e são os seguintes:

- Desenvolver e caracterizar microellectrodos de fibra de carbono revestidos com polímeros de Nafion® e *o*-PD para medir directamente, em tempo real e com elevada resolução espacio-temporal a dinâmica de concentração de $^{\bullet}\text{NO}$ em fatias de hipocampo de rato (Capítulo 3);
- Caracterização da síntese endógena de $^{\bullet}\text{NO}$ na fatia de hipocampo de rato por estimulação do receptor do glutamato do tipo NMDA, com particular atenção para a heterogeneidade das subregiões e para a determinação experimental do raio de difusão do gás em CA1 (Capítulo 4);
- Estudo da influência mútua dos perfis de $^{\bullet}\text{NO}$ e O_2 nas fatias. Concretamente, procurou saber-se se o $^{\bullet}\text{NO}$ produzido endogenamente na subregião CA1 modula aí o consumo de O_2 , confirmando, pela primeira vez num sistema biológico complexo, a regulação da respiração mitocondrial pelo $^{\bullet}\text{NO}$ (Capítulo 5).

2.

Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Na preparação de soluções utilizaram-se sais de qualidade p.a. sem qualquer purificação adicional. Os reagentes utilizados no revestimento da superfície activa dos microelectrodos de fibra de carbono, avaliação das suas propriedades analíticas bem como agonistas e antagonistas/inibidores utilizados nas experiências em fatias de hipocampo tiveram a seguinte proveniência:

- Aldrich: Nafion®;
- Biochemical: L-glutamato (L-glu);
- Fluka Chimica: ascorbato, dopamina (DA) e *orto*-fenilenodiamina (*o*-PD);
- Merck: NaNO₂, tirosina e peróxido de hidrogénio (H₂O₂);
- Sigma: ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA), dietilenotriamina/NO (DETA/NO), 5-hidroxitriptamina (5-HT), glutatião reduzido (GSH) e L-arg (L-arg);
- Tocris: *N*-metil-D-aspartato (NMDA), *N*_G-nitro-L-arg (L-NNA) e ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico (D-AP5);
- Riedel de Haën: solução padrão NaNO₂ 0,1 M.

Os gases utilizados, nomeadamente *NO, árgon e Carbox (mistura dos gases O₂ e CO₂ nas proporções 95:5) foram adquiridos à AirLiquid.

2.2. Soluções

Prepararam-se as soluções utilizadas neste trabalho em água bidesionizada ultra pura (milli-Q) com resistividade superior a 18 MΩ.cm.

Electrólito Suporte

O electrólito de suporte utilizado na medição electroquímica de *NO foi o tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 com a seguinte composição (em mM): 140 NaCl, 2,7 KCl, 8,1 Na₂HPO₄ e 1,8 KH₂PO₄. Para remover vestígios de ferro e outros metais adicionou-se o agente quelante DTPA 0,1 mM.

Soluções para Revestimento dos Microelctrodos

O Nafion® (Fig. 2.1A) utilizou-se na forma apresentada comercialmente, uma solução 5% massa/volume numa mistura de álcoois alifáticos.

Preparou-se uma solução 5mM de *o*-PD (Fig. 2.1B) para revestimento da superfície activa dos microelctrodos em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 e suplementado com ascorbato 0,1 mM e previamente saturado com árgon durante 10 minutos para remoção de O₂. Manteve-se a solução ao abrigo da luz para limitar a foto-oxidação.

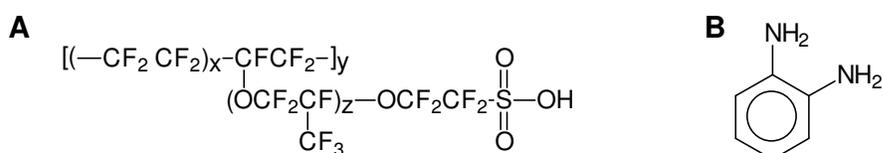


Figura 2.1 – Estrutura química do Nafion® (A) e da *o*-fenilenediamina (B), compostos utilizados no revestimento da superfície activa dos microelctrodos de fibra de carbono.

Soluções para Calibração do Sensor de *NO ISO-NOP

O sensor de *NO ISO-NOP foi calibrado com *NO produzido *in situ* a partir da redução de NO₂⁻ por KI em meio ácido (reacção 14), de acordo com as instruções do fabricante.



Preparou-se uma solução de NO₂⁻ 100 µM a partir da solução padrão de NaNO₂ 0,1 M e soluções 0,1 M KI e 0,1 M H₂SO₄.

Soluções Padrão de NO

Prepararam-se as soluções padrão de NO a partir de um composto dador de NO , o DETA/ NO (Fig. 2.2). Este composto liberta NO de forma controlada, sendo o seu tempo de meia vida de 52 horas à temperatura ambiente e pH 7,4. É estável em meio alcalino, ocorrendo libertação de NO com a diminuição do pH (Keefer *et al.*, 1996).

Preparou-se uma solução stock de DETA/ NO 10 mM em NaOH 0,01M. Para iniciar a libertação de NO , o DETA/ NO foi diluído em PBS pH 7,4.

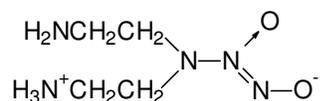


Figura 2.2 – Estrutura química do DETA/ NO utilizado para preparar soluções padrão de NO (adaptado de Keefer *et al.*, 1996).

Determinou-se o perfil de libertação de NO a partir do dador DETA/ NO utilizado o eléctrodo de NO comercial ISO-NOP, também conhecido por sensor de NO , previamente calibrado. Iniciou-se a reacção de libertação por adição de um volume determinado de DETA/ NO a 20 mL de PBS previamente saturado com árgon contido num vaso selado com uma borracha de silicone. Repetiu-se o ensaio para as concentrações 10, 50 e 100 μM . O ensaio realizou-se à temperatura ambiente ($\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Alternativamente, prepararam-se soluções padrão de NO gás por saturação de água ultra-pura com NO na forma gasosa. Dado que a reacção de NO com O_2 produz um gás altamente tóxico e corrosivo, tomaram-se precauções especiais na preparação destas soluções, sendo o manuseamento realizado numa “hotte”.

Nas tubagens do sistema utilizado para colheita do gás NO a partir de uma botija limitou-se o uso de materiais poliméricos permeáveis a gás. Sempre

que possível utilizou-se tubo em aço inoxidável, sendo as ligações no mesmo com os recipientes de vidro e entre estes com de tubo teflon e/ou silicone.

Para preparar as soluções de $^{\bullet}\text{NO}$ borbulhou-se o gás em água ultra pura previamente saturada com árgon durante 1 hora. O gás foi previamente “lavado”, primeiro em HCl 1 mM para reduzir vestígios de NO_2^- e depois em NaOH 10mM, para remover vestígios de contaminantes reactivos existentes na botija de gás comprimido. Na Fig. 2.3 mostra-se um esquema do sistema utilizado para preparação de soluções padrão de $^{\bullet}\text{NO}$ a partir do gás. Aferiu-se a concentração da solução padrão utilizando o sensor ISO-NOP calibrado, adicionando um alíquota de 20 μL de solução padrão a 20 mL de PBS pH 7,4 previamente saturado com árgon, num vaso selado.

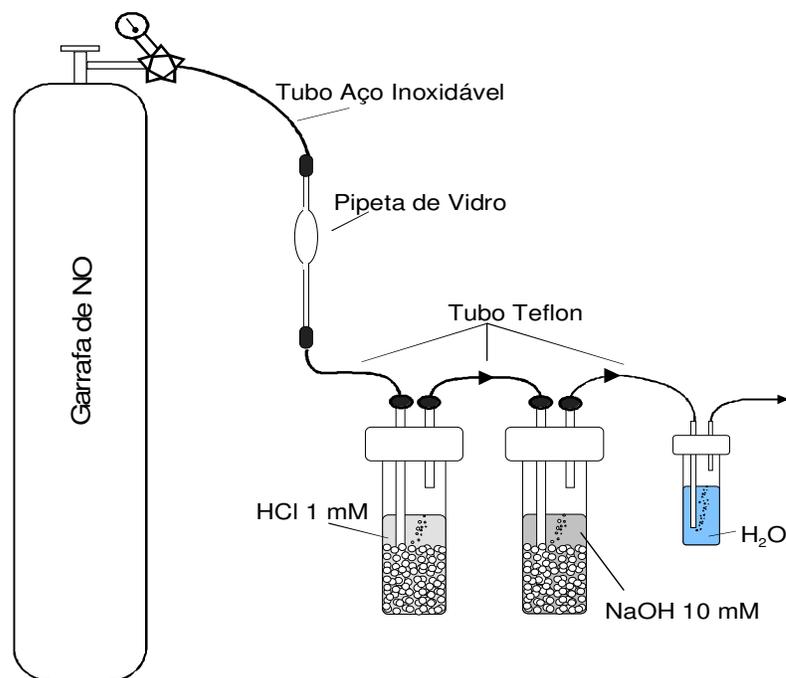


Figura 2.3 – Esquema representativo do sistema utilizado para preparar soluções padrão de $^{\bullet}\text{NO}$ a partir de gás.

Soluções para Estudo da Selectividade

No estudo da selectividade dos microelctrodos de fibra de carbono revestidos preparam-se soluções stock dos compostos a testar, sendo depois diluídos para a concentração desejada no electrólito suporte PBS pH 7,4.

Prepararam-se soluções stock de DA e 5-HT em ácido perclórico 1 % para minimizar a sua oxidação no período de armazenamento. Obteve-se uma solução de ONOO⁻ 100 μM por adição de NO₂⁻ a uma solução ácida de H₂O₂ (Beckman e Koppenol, 1996) e utilizou-se sem diluição. Para obter uma solução de óxidos superiores de nitrogénio (N_xO_y) 20 μM, também utilizada sem diluição, expôs-se uma solução de ¹⁴N a O₂.

Os restantes interferentes analisados, nomeadamente tirosina, ascorbato, L-glu, L-arg, NMDA e H₂O₂, diluíram-se a partir de soluções stock preparados em água ultra pura.

Fluído Cerebrospinal Artificial

O meio de perfusão utilizado na monitorização de ¹⁴NO em fatias de hipocampo de rato foi o fluído cerebrospinal artificial (aCSF) com seguinte composição (em mM): 124 NaCl, 2 KCl, 25 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 1,5 CaCl₂, 1,4 MgCl₂ e 10 D-glucose. Removeu-se o magnésio da solução nos ensaios de estimulação com NMDA.

A solução de aCSF foi continuamente borbulhada com Carbox previamente humidificado.

aCSF Modificado

Durante as fases de isolamento e recuperação das fatias de hipocampo utilizou-se uma solução de aCSF com uma composição diferente, designada aqui de aCSF modificado, com o objectivo de melhorar a condição geral do tecido. A composição do aCSF modificado foi a seguinte (em mM): 124 NaCl, 2 KCl, 25 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 0,5 CaCl₂, 10 MgCl₂, 0,2 ascorbato, 1 GSH e 10 D-glucose. A elevação da concentração de magnésio (10 mM) e diminuição da de cálcio (0,5 mM) reduziram a excitabilidade celular

(limitando a actividade do receptor NMDA) enquanto que o ascorbato e o GSH actuaram como antioxidantes.

Para o isolamento de fatias de hipocampo utilizou-se o aCSF modificado à temperatura de 4 °C previamente saturado com Carbox durante 20 minutos. Para a recuperação das fatias, utilizou-se o aCSF modificado à temperatura ambiente e continuamente borbulhado com Carbox.

Soluções Stock de Agonistas e Antagonistas

Prepararam-se as soluções de agonistas, antagonistas e inibidores por diluição de soluções stock preparados em água ultra-pura. As soluções preparadas foram: L-glu, L-arg e L-NAME 500 mM; NMDA e L-NNA 50 mM; D-AP5 10 mM.

2.3. Instrumentação Electroquímica

Para aferição das soluções padrão e estudo do perfil de libertação do NO a partir de um dador utilizou-se o eléctrodo comercial ISO-NOP, também conhecido como sensor de NO (World Precision Instruments Inc., EUA), um eléctrodo de platina de 2 mm e referência interna revestido com uma membrana de teflon permeável a gases. As medições foram feitas com um amperímetro ISO-NO Mark II controlado pelo software Duo 18 (World Precision Instruments Inc., EUA).

Para os ensaios de modificação química da superfície activa dos microeléctrodos de fibra de carbono (MFC) e avaliação das suas características analíticas utilizou-se o potenciostato PGSTAT 12 (Eco Chimie, Holanda controlado pelo software GPES versão 4.9). Neste caso utilizou-se uma célula de 3 eléctrodos: microeléctrodos de fibra de carbono como eléctrodo de trabalho, o eléctrodo de Ag/AgCl (3M) como referência e um fio de platina como eléctrodo auxiliar. A voltametria cíclica de varrimento rápido (FCV) efectuou-se num potenciostato EI-400 (Ensmann Instruments, Bloomington, EUA) com monitorização da corrente num osciloscópio digital (Tetronix TDS 220, Portland, OR, EUA).

As medições de *NO nas fatias de hipocampo realizaram-se em modo amperométrico, ao potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl, numa célula electrolítica de 2 eléctrodos: o microeléctrodo de fibra de carbono e um *pellet* de Ag/AgCl. A medição da corrente resultante da oxidação do *NO efectuou-se no sistema de detecção electroquímica inNO modelo T (Innovative Instrumentes, Tampa, FL, EUA), com monitorização do sinal em software próprio (inNO versão 3.1). Considerando a ordem de grandeza da corrente amperométrica registada na reacção oxidação-redução (na ordem de grandeza de picoampére) e a concentração salina do meio de perfusão utilizado foi possível desprezar a “queda de potencial” (IR) na célula electroquímica e utilizar uma célula de dois eléctrodos. Para os registos em amperometria de impulso diferencial utilizou-se o potenciostato PGSTAT.

A medição da concentração de O_2 efectuou-se com o picoamperímetro AMU 130 (Tacussel, França). O potencial aplicado foi de -0,8 V vs Ag/AgCl, sendo o sinal amperométrico monitorizado num registador de papel (Zipp&Zonen, Holanda).

2.4. Microeléctrodos de Fibra de Carbono

2.4.1. Fabricação

Os microeléctrodos de fibra de carbono (MFC) foram fabricados conforme descrito por Barbosa *et al.*, 1998 e Ferreira *et al.*, 2005. Inseriu-se uma fibra de carbono individual (8 μm diâmetro, Courtaulds) num capilar de vidro (1,16 mm \varnothing interno, 2,0 mm \varnothing externo, Harvard Apparatus, USA) colocado antecipadamente num recipiente contendo acetona, como esquematizado na Fig. 2.4. A acetona serviu não só para facilitar a inserção da fibra, mas também para remover resina e outras impurezas existentes na sua superfície. Após evaporação da acetona, colocou-se o capilar num *puller* vertical (Harvard Apparatus) e procedeu-se ao seu estiramento (Fig. 2.5). Cortou-se a fibra exposta a cerca de 1 cm da zona de selagem.

Com o capilar estirado contendo a fibra colocado no suporte de um microscópio e com o auxílio de uma pinça de pontas finas e um retículo

graduado colocado na ocular do microscópio, cortou-se a fibra exposta a um comprimento de 100-150 μm para o caso de MFC utilizados para medir NO e de 20-50 μm para medição de O_2 .

Para terminar o processo de fabrico, colocou-se uma pequena quantidade de cola de prata condutora (RS, Northants, Reino Unido) no fundo do capilar. Inseriu-se depois um fio de cobre, com a extremidade exposta, até contactar com a cola de prata. Por fim, selou-se a parte superior do capilar com cola de cianoacrilato (cola rápida comum).

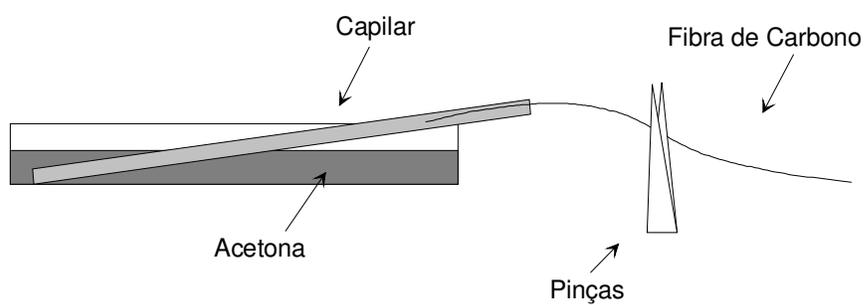


Figura 2.4 – Esquema da primeira fase de construção dos microelétrodos de fibra de carbono – inserção da fibra do capilar.

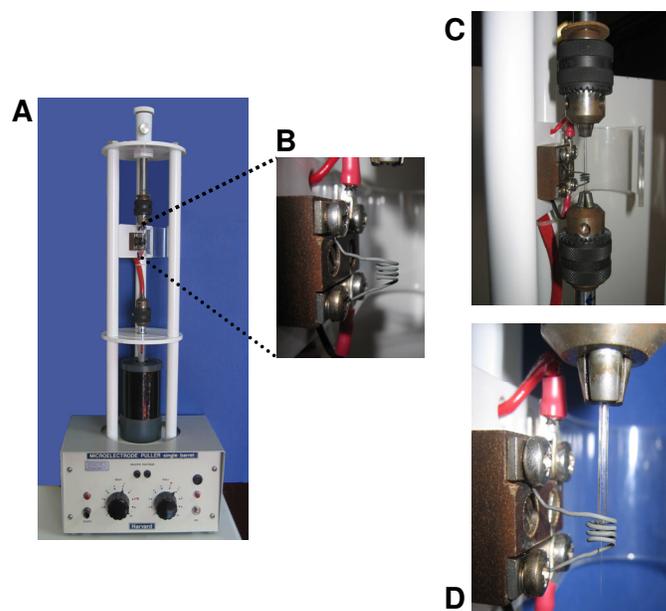


Figura 2.5 – A) *Puller* vertical de microelétrodos; B) pormenor do fio de platina em espiral; C) *Puller* com pipeta colocada, antes do momento de estiramento; D) Capilar estirado.

2.4.2. Revestimento com Polímeros

Revestiu-se a superfície dos MFC utilizados para medir NO com polímeros de Nafion® e *o*-PD. Após o corte da fibra de carbono, mergulhou-se a ponta do MFC na solução de Nafion® durante 30 segundos, sendo depois colocado numa estufa a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos para secagem. O Nafion® forma um polímero aniónico à superfície do eléctrodo que barra a passagem de espécies aniónicas.

Para electropolimerização de *o*-PD, colocou-se o MFC numa solução de *o*-PD e aplicou-se um potencial de $+0.9\text{ V}$ vs Ag/AgCl por um período de 10 minutos. O *o*-PD forma um filtro molecular, permitindo apenas a passagem de moléculas com massa molecular $<170\text{ g/mol}$ (Pontie *et al.*, 2000).

No âmbito deste trabalho, os microelectrodo de fibra de carbono revestidos com Nafion® e *o*-PD, utilizados para medir [•]NO foram designados de MFC-NO enquanto que os utilizados sem revestimento para medir O₂ se designaram de MFC-O₂.

Na Fig. 2.6 está esquematizado um MFC cujo processo de fabrico e revestimento se descreve atrás.

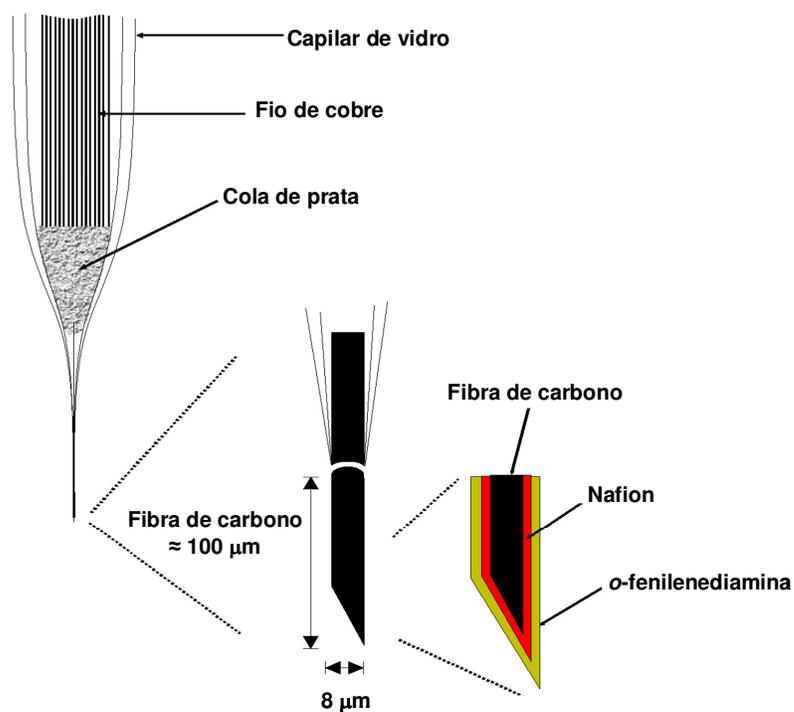


Figura 2.6 – Representação esquemática de um MFC-NO, mostrando em pormenor os revestimentos com Nafion® e *o*-fenilenediamina bem com as dimensões da fibra exposta.

2.4.3. Avaliação Geral

Microscopia de Varrimento Electrónico

Para melhor visualizar a superfície da fibra dos MFC, bem como a zona de selagem utilizou-se a microscopia de varrimento electrónico para obter fotografias de alguns eléctrodos.

Um requisito desta técnica é que as amostras sejam constituídas por um material condutor. Como o capilar de vidro não é condutor, revestiram-se os MFC fotografados com uma camada fina de ouro por *sputtering*.

Na sequência de fotografias de microscopia apresentadas na Fig. 2.7 pode observar-se em pormenor a extremidade dos MFC. Em B pode ver-se o aspecto rugoso da fibra, evidenciando as estrias longitudinais da mesma e o aspecto do corte. Em C é possível ver a selagem entre o capilar de vidro e a fibra de carbono.

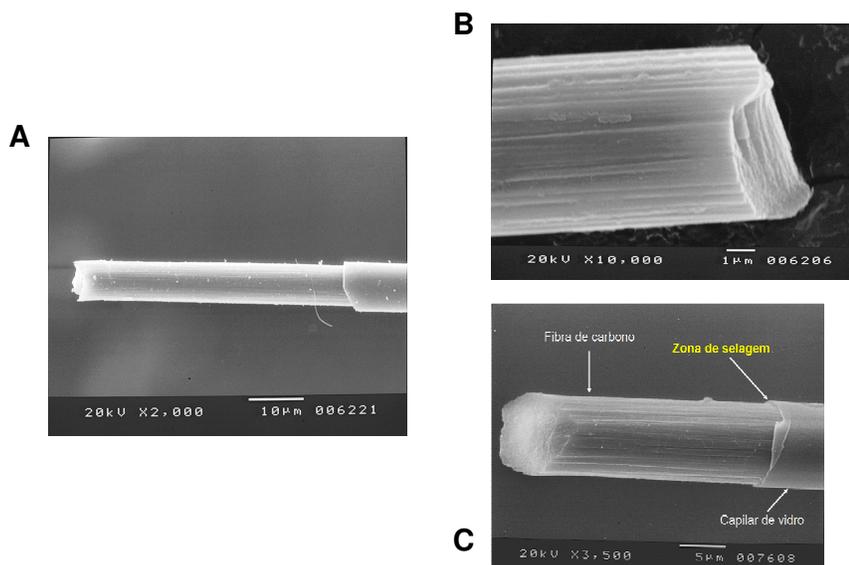


Figura 2.7 – Fotografias de microscopia de varrimento electrónico de MFC. A) Imagem da superfície activa de um MFC; B) Aspecto morfológico da superfície da fibra; C) Pormenor da zona de selagem entre a fibra de carbono e o capilar de vidro estirado.

Controlo de Qualidade

Utilizou-se a voltametria cíclica de varrimento rápido (FCV) para seleccionar, de entre os MFC fabricados, aqueles com melhores características de resposta. Em termos eléctricos, um eléctrodo tem um comportamento entre o resistivo e capacitivo. Um microeléctrodo com boas características eléctricas terá, contudo, um comportamento mais capacitivo que resistivo (Stamford *et al.*, 1992).

Na avaliação dos MFC, aplicou-se uma onda triangular entre -0.4 e +1.6 V vs Ag/AgCl, a uma velocidade de varrimento de 200 V/s em intervalos de 30 ms. Na Fig. 2.8 mostram-se 2 voltamogramas, em A de um microeléctrodo com boas características, isto é, apresentando transitórios bem definidos nos pontos de reversão de potencial, e em B de um eléctrodo com características deficientes e por isso rejeitado.

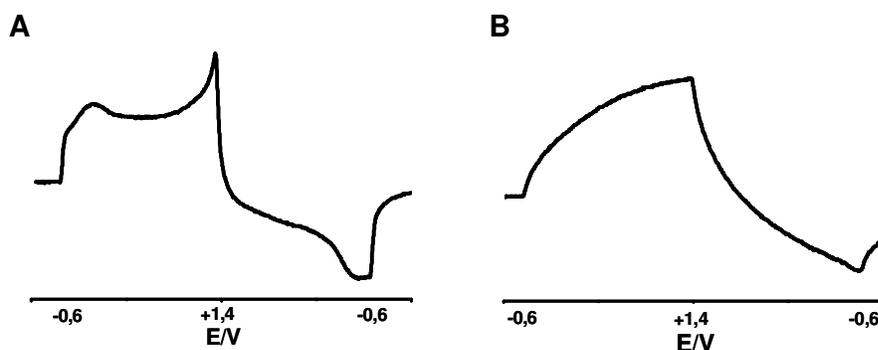


Figura 2.8 – Voltamogramas cíclicos de 2 MFC em PBS pH 7.4. A) MFC com boas propriedades de condução de corrente; B) MFC com elevada resistência e fraca condução de corrente.

Para as experiências de FCV utilizou-se o sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) esquematizado na Fig. 2.9 associado a uma célula de fluxo especificamente desenhada para o efeito (Fig. 2.10). Os ensaios realizaram-se a um fluxo de 2 mL/min de PBS pH 7,4, à temperatura ambiente.

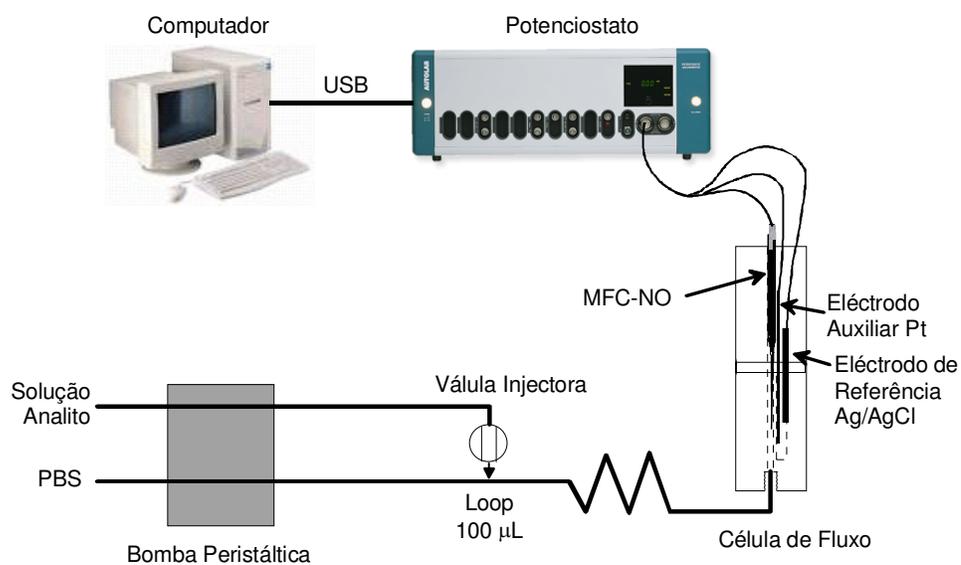


Figura 2.9 – Esquemática do sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizado na avaliação das propriedades analíticas dos MFC.

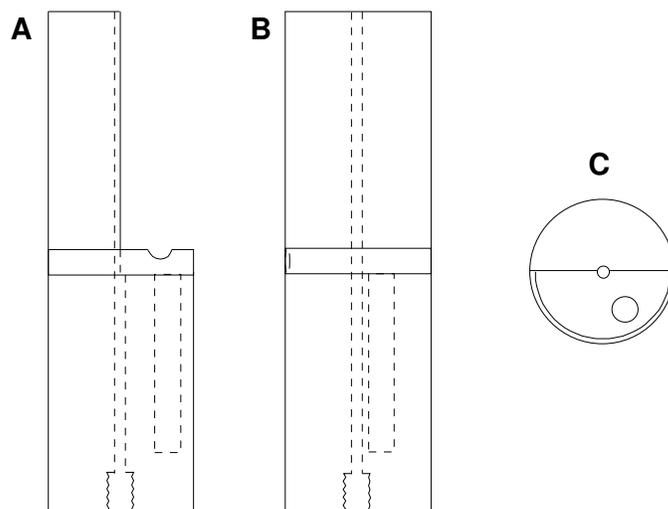


Figura 2.10 – Esquema do dispositivo acrílico utilizada para avaliações em FIA. A) perfil lateral; B) perfil anterior; C) perfil superior.

Sujeitaram-se, depois, os microelétrodos seleccionados a um pré-tratamento, também por FCV, que consistiu em aplicar uma onda triangular entre +0,4 e +2,4V vs Ag/AgCl por um período de 30 segundos, mantendo-se os restantes parâmetros semelhantes aos da avaliação. Este processo, designado de anodização, permitiu modificar os grupos funcionais da superfície activa da fibra de carbono, resultando num aumento a sensibilidade do eléctrodo

2.4.4. Propriedades Analíticas

Na avaliação das propriedades analíticas utilizou-se um vaso de vidro de 2 mL de volume com tampa apropriada para colocação dos 3 eléctrodos e o sistema de FIA. Os ensaios realizaram-se com um fluxo de PBS de 2 mL/min. A válvula de mudança rápida presente a montante da célula de fluxo permitiu a injeção de soluções contendo o analito de interesse em alíquotas de 100 µL.

Potencial de Oxidação de NO e do NO_2^-

Determinou-se o potencial de oxidação do NO e do NO_2^- nos MFC-NO por voltametria de onda quadrada em PBS previamente saturado com argon. Os ensaios realizaram-se no intervalo de potencial entre +0,4 e +1,0 V vs Ag/AgCl, com potencial de impulso de 2 mV, potencial de onda quadrada 25 mV e a uma de frequência de 25 Hz. Obtiveram-se voltamogramas para NO 10 µM e NO_2^- 100 µM.

Sensibilidade e Limite de Detecção

Avaliou-se a sensibilidade dos MFC-NO amperometricamente ao potencial de +0,9 V vs Ag/AgCl e em FIA. Após obtenção de uma corrente de fundo estável, injectaram-se alíquotas de 100 µL de DETA/NO 10, 30, 70 e 100 µM. Para cada concentração realizaram-se 3 injeções sucessivas.

Calculou-se o limite de detecção (L.O.D) dos MFC-NO a partir da equação 15, onde **m** é o declive da recta de calibração e **S.D.** é o desvio padrão da regressão linear.

$$\text{L.O.D.} = 3 (\text{S.D./m}) \quad (15)$$

Selectividade

Determinou-se a selectividade dos MFC-NO por comparação da corrente de oxidação para 1 μM $\cdot\text{NO}$ (obtido a partir de 100 μM de DETA/NO) com as de ascorbato 100 μM , NO_2^- 100 μM , DA 4 μM , 5-HT 4 μM , L-glu 1 mM, L-arg 1 mM, NMDA 100 μM , tirosina 10 μM , H_2O_2 200 μM , N_xO_y 20 μM e ONOO^- 100 μM .

Os ensaios realizaram-se sistema de FIA ao potencial constante de +0.9 V vs Ag/AgCl. Após obtenção de uma corrente de fundo estável, injectaram-se 3 alíquotas de 100 μL de cada composto.

Tempo de Resposta

Determinou-se o tempo de resposta no sistema de FIA ao potencial de +0,9 V vs Ag/AgCl. O tempo de resposta calculado correspondeu ao tempo necessário para atingir 50% da resposta máxima ($T_{50\%}$) para uma injeção única de 300 nM de $\cdot\text{NO}$ (30 μM DETA/NO).

2.5. Preparação de Fatias de Hipocampo de Rato

2.5.1. Animais

Obtiveram-se fatias agudas de hipocampo de ratos estirpe Wistar machos com massa corporal entre 100 e 150 g, provenientes do Charles-River Laboratories em Barcelona. Os animais foram adquiridos semanalmente e passaram por uma quarentena mínima de 3 dias no biotério de manutenção da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra antes de serem utilizados,

com livre acesso a alimentação e água. Manteve-se a temperatura das instalações constante, com ciclos de luz/escuridão de 12 horas.

2.5.2. Isolamento de Fatias de Hipocampo de Rato

Sacrificaram-se os ratos por deslocamento cervical, sendo a cabeça destacada com uma guilhotina e colocada numa caixa de petri grande. Removeu-se o cérebro e colocou-se numa segunda caixa de petri, esta revestida com papel de filtro para imobilizar o órgão e facilitar o isolamento. Adicionou-se aCSF modificado gelado e saturado com carbox. O tempo entre a morte do animal e a colocação do cérebro em aCSF modificado gelado não ultrapassou 1 minuto.

Isolou-se o hipocampo de cada hemisférico e colocaram-se no suporte do seccionador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper, Campden Instruments, Reino Unido) revestido com uma folha de papel de acetato cortada ao tamanho do suporte. Obtiveram-se fatias transversais com espessura de 400 μm . A folha de acetato contendo o tecido seccionado foi colocada numa caixa de petri e adicionou-se aCSF modificado gelado e saturado com carbox. Separaram-se as fatias foram separadas e transferiram-se para uma câmara de pré-incubação (modelo BSC-PC, Harvard Apparatus) contendo aCSF modificado à temperatura ambiente e saturado com carbox. As fatias ficaram em recuperação durante pelo menos uma hora ao abrigo da luz antes de serem utilizadas.

2.6. Monitorização da Concentração de Óxido Nítrico em Fatias de Hipocampo

Para monitorização da dinâmica de concentração de NO em fatias de hipocampo de rato utilizou-se o sistema experimental que se mostra nas Figs. 2.11 e 2.12. Para maximizar a estabilidade mecânica e permitir a fixação magnética de peças de equipamento como os micromanipuladores, utilizou-se uma placa de ferro com cerca de 50 kg. Colocaram-se os componentes do sistema mais sensíveis a interferências eléctricas no interior de uma gaiola de

Faraday. Colocaram-se vários pontos de “terra” com ligação de todos a um ponto comum na gaiola de Faraday ligado a um ponto de “terra” para minimizar o ruído eléctrico. No interior da gaiola colocaram-se ainda a câmara de perfusão, dois micromanipuladores fixos por magnetes à placa de aço e uma lupa para visualização do tecido. Fora da gaiola colocaram-se o banho de água termostaticado para aquecimento do meio de perfusão, a fonte de luz fria, o picoinjector, o controlador de temperatura e o computador para aquisição de dados.

Colocaram-se as soluções de perfusão num banho de água (GFL, EUA) aquecida a 36 °C, mantendo-se um fluxo permanente de carbox nas soluções.

2.6.1. Sistema de Perfusão

As soluções fluíram no sistema em regime de sifão, em tubagem de polietileno com diâmetro interno de 2 mm e a altura do banho determinou a velocidade do fluxo (≈ 2 mL/min). Uma válvula de comutação colocada a montante da câmara de perfusão permitiu trocar facilmente entre as diferentes soluções controlo e teste. Para a velocidade de fluxo do sistema, a válvula de mudança rápida permitiu que a solução alcançasse a câmara de perfusão com um atraso de aproximadamente 80 s.

2.6.2. Câmara de Perfusão

Para os ensaios em fatias de hipocampo utilizou-se uma câmara de fluxo modelo BSC-BU com tampa BSC-ZT termostaticada por um controlador de temperatura modelo TC-202A (Harvard Apparatus, USA). Em cada experiência colocou-se uma fatia de hipocampo na rede de nylon da câmara. Para garantir a imobilização do tecido, raspou-se a rede com uma agulha para criar uma superfície rugosa e esmagou-se a fímbria da fatia contra a rede.

Durante cada ensaio, manteve-se o fluxo constante de solução à temperatura de 32 °C, sendo a mesma registada por uma sonda ligada ao controlador da temperatura da câmara.

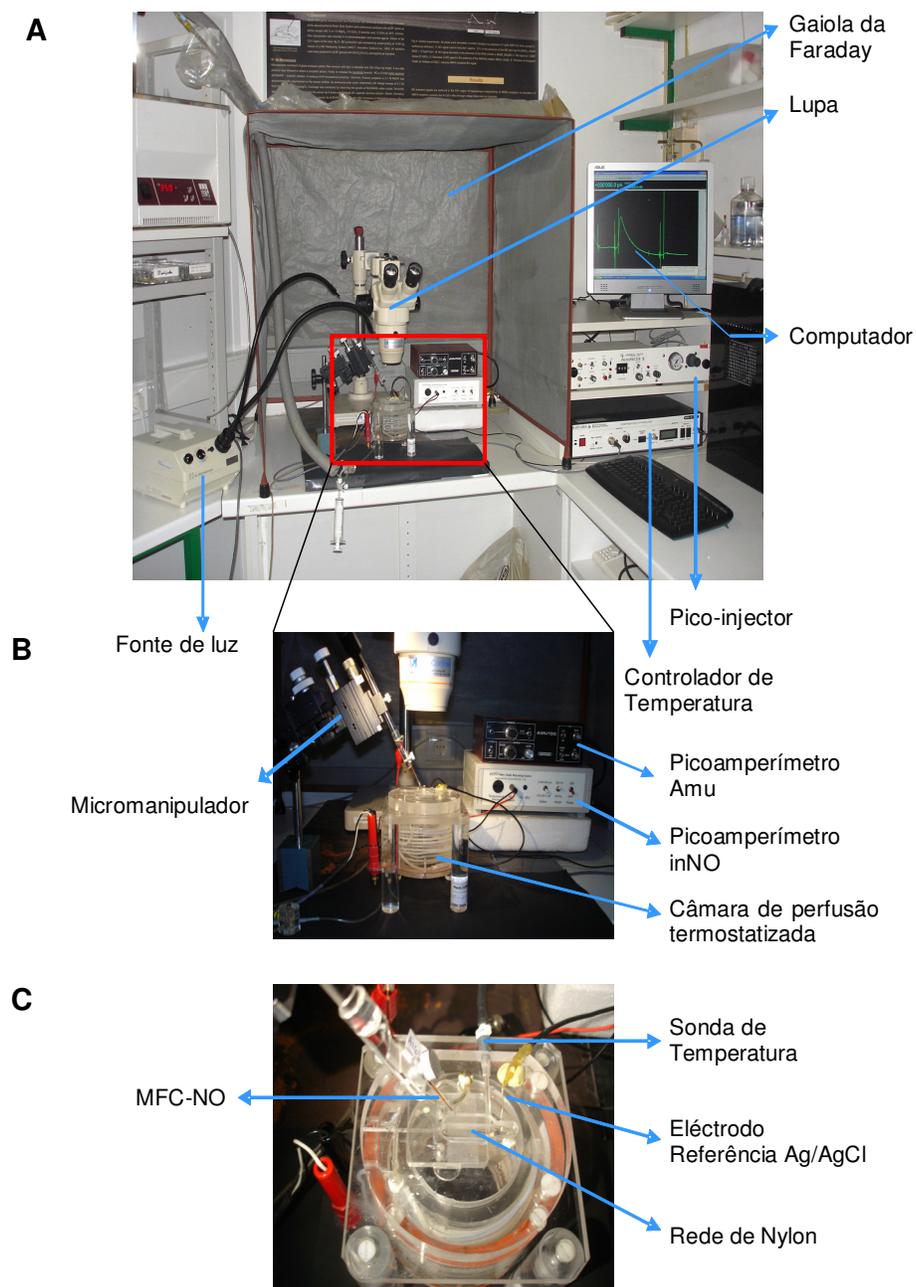


Figura 2.11 – Fotografias do sistema experimental utilizado na monitorização de NO em fatias de hipocampo. A) Aspecto geral do sistema, com a gaiola de Faraday, a lupa, a câmara de perfusão e os amperímetros ao centro, equipamento à direita e o banho e fonte de luz à esquerda. B) Detalhe da câmara de persufão. C) Vista de cima da mesma com pormenor dos eléctrodos e da sonda de temperatura.

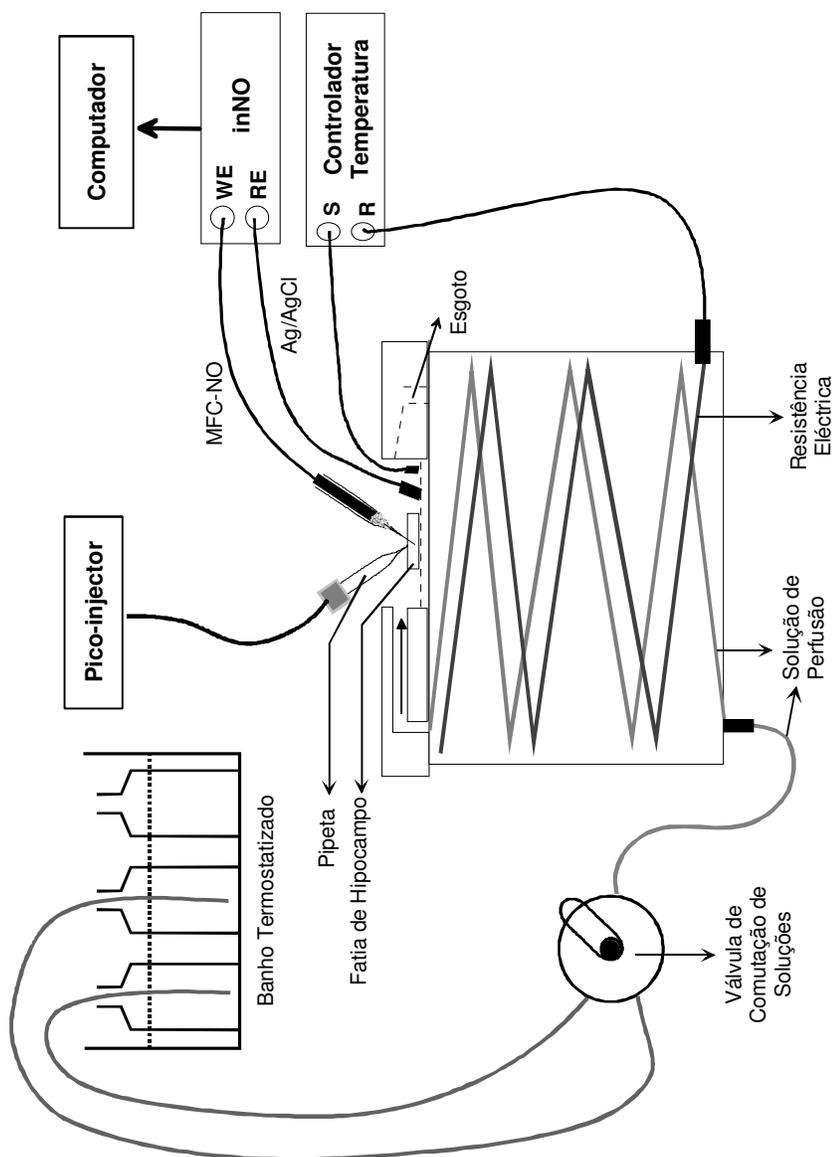


Figura 2.12 – Esquemática do sistema utilizado para monitorizar a dinâmica de concentração de NO em fatias de hipocampo de rato. No picoamperímetro, WE representa eléctrodo de trabalho e RE eléctrodo de referência. No Controlador de Temperatura, S indica sensor e R resistência.

2.6.3. Inserção do Microeléctrodo de Fibra de Carbono no Tecido

Utilizando um micromanipulador, inseriu-se um MFC-NO na subregião desejada da fatia de hipocampo, a um ângulo de 60° relativamente ao plano do tecido para que a extremidade (100 a 150 µm) ficasse colocado na camada central do tecido (entre 100 e 300 µm de profundidade).

Para estudar a dinâmica de concentração de ¹NO nas diferentes subregiões do hipocampo colocou-se o MFC-NO na camada de células principais em cada subregião: nas subregiões CA1 e CA3 em *stratum pyramidale* (st. Pyr., camada de corpos celulares dos neurónios piramidais) e no DG em *stratum granulosum* (st. Gran., camada de corpos celulares dos neurónios granulares). Nos restantes estudos, nomeadamente determinação do raio da esfera de difusão, verificação analítica do sinal, estimulação por perfusão e determinação simultânea de O₂ e ¹NO, inseriu-se o microeléctrodo em st. Pyr. da subregião CA1 da fatia de hipocampo.

2.6.4. Estimulação por Perfusão

A estimulação da síntese de ¹NO nas fatias de hipocampo de rato realizou-se aplicando o substrato natural da NOS L-arg (0,5 mM) ou agonistas do receptor do glutamato do tipo NMDA (L-glu 1 e 5 mM e NMDA 10, 25, 50 e 100 µM) ao meio de perfusão. Por intermédio da válvula de comutação colocada alternou-se o meio de perfusão de aCSF solução teste. Excluindo a perfusão com L-arg, os restantes estímulos foram aplicados por um período de 2 minutos.

2.6.5. Estimulação Localizada

Para a estimulação localizada aplicou-se um protocolo de ejeção sob pressão à superfície do tecido com um pico-injector (Picospritzer II, General Valve, Fairfield, NJ, EUA). Utilizou-se uma pipeta de vidro com diâmetro interno de ponta de 8 µm contendo uma solução de NMDA 5 mM em tampão fosfato 0,1 M com 154 mM NaCl, pH 7,4. A ponta da pipeta foi colocada à superfície

do tecido, a 50 μm de distância do local de inserção do MFC-NO. Cada estímulo teve a duração de 3 s, utilizando uma pressão de 10 Psi.

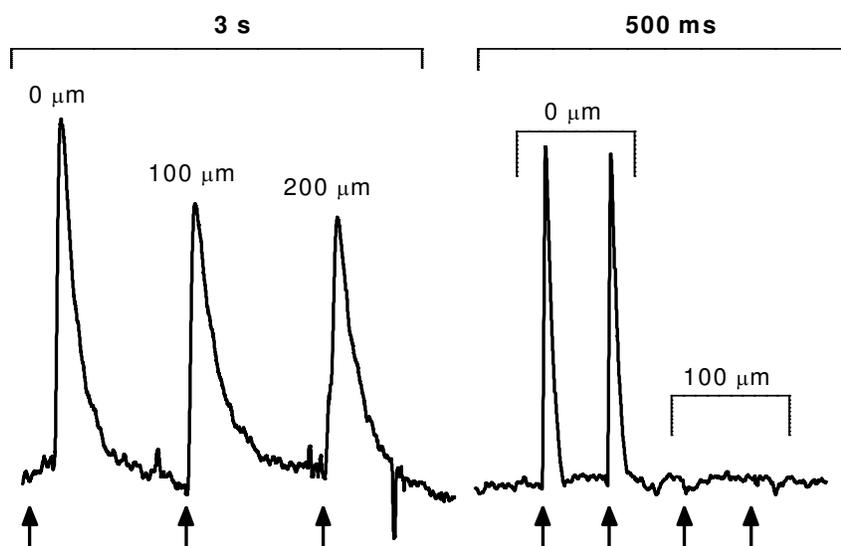


Figura 2.13 – Registo da corrente de oxidação para a ejeção localizada de ascorbato (5 mM) a diferentes distâncias do local de inserção do MFC, na subregião CA1 (st. Pyr.) e para diferentes tempos de estimulação. As setas indicam o momento de estimulação.

2.7. Determinação da Esfera de Difusão do Óxido Nítrico

A determinação da esfera de difusão do NO produzido em resposta à activação do receptor NMDA realizou-se na subregião CA1 da fatia de hipocampo.

Foi necessário efectuar algumas alterações tanto ao nível de colocação da fatia na câmara como ao nível do protocolo de estimulação para realizar este ensaio. Assim, colocou-se a fatia de hipocampo na câmara de perfusão

com o eixo da camada de células piramidais da subregião CA1 perpendicular ao sentido do fluxo de meio. A estimulação do tecido realizou-se por ejeção localizada de NMDA 5 mM. A concentração e a pressão do estímulo foram mantidas, mas diminuiu-se o tempo para 500 ms. Utilizando uma solução de ascorbato 5 mM, determinaram-se as condições de estimulação que garantissem que o raio de difusão do estímulo fosse menor que 100 μm . Como se pode ver na Fig. 2.13, para as condições de estimulação local acima referidas, o estímulo difundiu mais de 200 μm enquanto que para um tempo de estimulação de 500 ms, à distância de 100 μm não se detectou qualquer corrente amperométrica resultante da oxidação de ascorbato. Não se realizou este estudo com o próprio NMDA uma vez que não é electroactivo.

Estimulou-se o tecido a diferentes distâncias do local de inserção do MFC-NO na camada de células piramidais da subregião CA1, nomeadamente a 0, 100, 200, 300 e 400 μm de distância. Em cada fatia, realizaram-se estimulações para todas as distâncias, alterando o lado de estimulação relativamente ao MFC-NO, para aumentar a distância entre locais de estimulação sucessivos. Em fatias diferentes, estimulou-se aleatoriamente no sentido crescente e decrescente de distâncias.

2.8. Medição da Pressão Parcial de Oxigénio na Fatia de Hipocampo de Rato

2.8.1. Eléctrodo de Oxigénio

Para medir a pressão parcial de oxigénio ($p\text{O}_2$) nas fatias de hipocampo de rato utilizaram-se microeléctrodos de fibra de carbono não modificados (MFC- O_2) cujo comprimento de ponta foi reduzido (20-50 μm) de modo a aumentar a resolução espacial da medida efectuada. Esta metodologia baseou-se na apresentada por outros autores (Jiang *et al.*, 1991, Mulkey *et al.*, 2001).

2.8.2. Medição Electroquímica

Calibrou-se cada MFC-O₂ na câmara de perfusão de fatias em PBS pH 7,4 e à temperatura ambiente. Para uma pressão atmosférica de 1 atm e temperatura ambiente de ≈22 °C considerou-se o valor de pO₂ no electrólito como sendo 150 torr. Alterou-se pO₂ no PBS de 150 torr para 0 torr borbulhando árgon e depois para 750 torr borbulhando Carbox. Na Fig. 2.14 mostra-se uma calibração típica do MFC-O₂ e a respectiva curva de calibração.

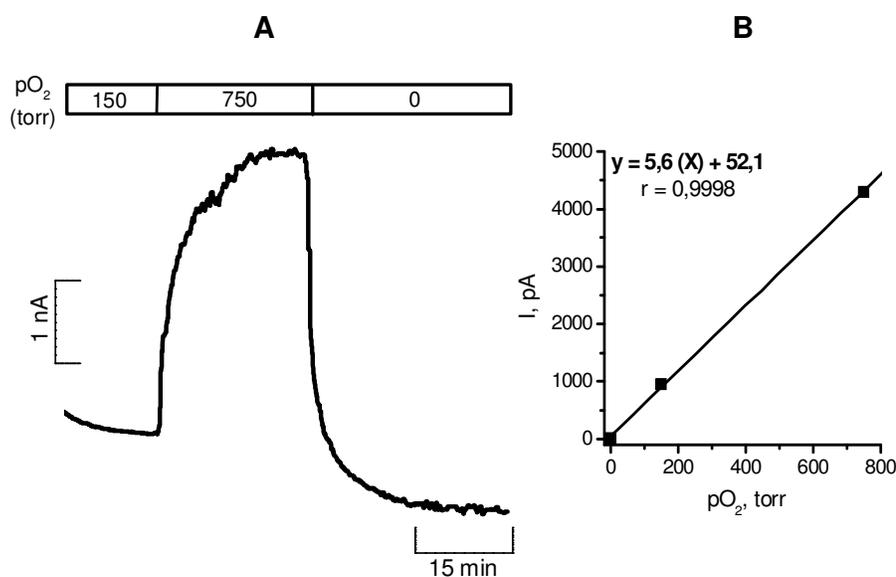


Figura 2.14 – A) Registo amperométrico de uma calibração de um MFC-O₂; B) Curva de calibração e equação da recta correspondente.

2.8.3. Perfil da Pressão Parcial de Oxigénio ao Longo da Profundidade do Tecido

Depois de obtida uma corrente basal no meio de perfusão, colocou-se MFC-O₂ à superfície do tecido e depois a 100, 200, 300 e 400 μm de profundidade com auxílio de um micromanipulador. Para cada nível de

profundidade, esperou-se que se obtivesse uma corrente estável antes de passar à seguinte. Esta medição realizou-se em st. Pyr. nas subregiões CA1 e CA3 e em st. Gran. na subregião DG.

2.8.4. Monitorização Simultânea de Óxido Nítrico e Oxigénio em Fatias de Hipocampo

Na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo de rato monitorizou-se simultaneamente a dinâmica de concentração de $\cdot\text{NO}$ e pO_2 em resposta à estimulação com NMDA em perfusão.

Colocaram-se os dois MFC na subregião CA1 (st. Pyr.), paralelamente um ao outro, mas com sentidos de inserção opostos, conforme ilustrado na Fig. 2.15. A distância entre os dois eléctrodos foi de aproximadamente 50 μm .

Estimulou-se o tecido em perfusão com NMDA a diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM) por períodos de 2 minutos. A troca de soluções realizou-se com recurso à válvula de comutação localizada a montante da câmara de perfusão. Nos casos em que se retirou o Ca^{2+} no meio ou o mesmo foi substituído por Ba^{2+} , a mudança de solução efectuou-se do mesmo modo.

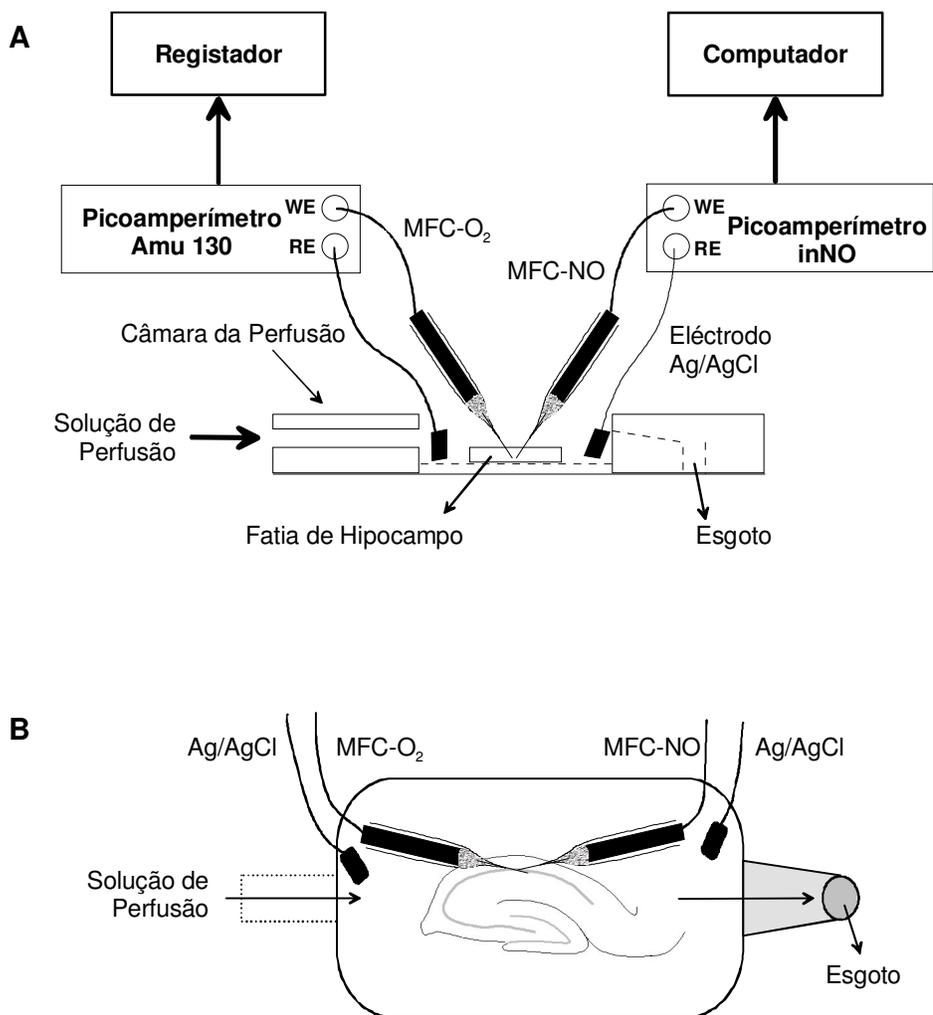


Figura 2.15. Esquemática do sistema utilizado para monitorizar simultaneamente NO e O_2 na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo de rato. A) vista de frente; B) vista de cima.

2.9. Análise de Dados

Para calcular os parâmetros cinéticos, à fase ascendente ajustou-se uma função sigmoideal e à descendente uma função de decaimento exponencial de 1ª ordem. As operações realizaram-se utilizando as funções de subtração de linha de base, integração e ajuste disponíveis no OriginLab versão 6.0. A análise dos registos amperométricos de NO está ilustrada na Fig. 2.16. Para cada sinal de NO calculou-se a carga total (integral da corrente em função do tempo) e a amplitude máxima.

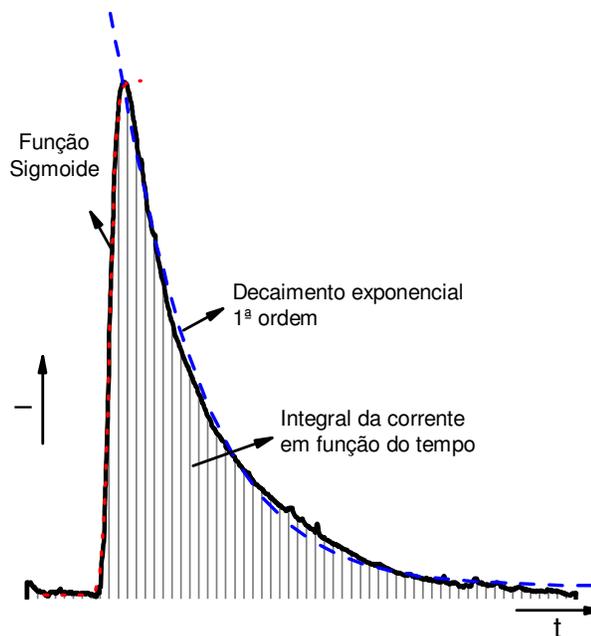


Figura 2.16 – Representação esquemática da análise realizada de um sinal de NO obtido em resposta à estimulação com NMDA.

Os valores referidos no texto são apresentados como o valor médio \pm erro padrão da média (S.E.M.). Avaliou-se o significado estatístico da diferença entre dois valores pelo teste de t de Student enquanto que para a análise de mais de dois grupos de resultados realizou-se por ANOVA seguido do teste comparativo múltiplo de Bonferroni.

3.

Propriedades Analíticas dos Microelétrodos de Fibra de Carbono

3.1. Introdução

Como referido no Capítulo 1, a detecção electroquímica de *NO tem vantagens sobre as demais metodologias pois permite a sua medição directa e em tempo real.

A electroquímica estuda os fenómenos químicos associados à separação de carga que podem resultar na transferência de carga homogénea ou heterogénea. Neste último caso, a transferência de carga ocorre na interface eléctrodo-solução, em que o eléctrodo é aceitador ou dador de electrões e por isso funciona como agente oxidante ou redutor da espécie química presente em solução (Brett e Brett, 1993a).

A célula electroquímica é um sistema multi-fase no qual se utiliza energia eléctrica para promover a electrólise de uma espécie química presente em solução. Uma célula simples é composta por dois eléctrodos imersos numa solução electrolítica, que toma a designação de electrólito de suporte, e que contém a substância analítica de interesse, o analito. A reacção electroquímica de interesse ocorre à superfície de um eléctrodo de trabalho enquanto o segundo eléctrodo – o contra-eléctrodo ou auxiliar – fecha o circuito de medição (Thomas e Henze, 2001). Actualmente, utilizam-se células de três eléctrodos com controlo potencioestático, garantindo-se assim a exactidão do potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho (Brett e Brett, 1993b, Kissinger e Ridgway, 1996). Nas situações em que a corrente que flui no circuito é da ordem de picoampére, como resulta da utilização de microelétrodos, a queda óhmica de potencial (IR) é desprezável. Nestas condições experimentais, utiliza-se frequentemente um microeléctrodo e um eléctrodo de referência de Ag/AgCl.

São várias as técnicas electroanalíticas utilizadas no estudo de reacções de oxidação-redução e, embora se possam classificar de diferentes formas, para o caso do trabalho aqui apresentado dividem-se em técnicas de potencial constante, de varrimento linear ou por impulsos de potencial. Na amperometria o eléctrodo de trabalho é mantido a um potencial constante

relativamente ao eléctrodo de referência sendo registada a corrente de oxidação ou de redução. É uma técnica muito utilizada quando se pretende monitorizar a variação da concentração de um analito em função do tempo, muito embora não forneça informação de natureza qualitativa. Nas técnicas de varrimento, o potencial aplicado varia linearmente ao longo do tempo, permitindo a caracterização qualitativa e quantitativa das espécies electroactivas presentes em solução. A técnica de varrimento diz-se cíclica se o sentido do varrimento for bi-direccional. Nas técnicas de impulso, sobrepõe-se periodicamente um impulso de potencial a um valor base constante ou variável. A principal vantagem destas técnicas é o aumento da razão entre as correntes faradaica e não-faradaica, o que melhora a sensibilidade e o limite de detecção (Thomas e Henze, 2001, Brett e Brett, 1993a).

Neste capítulo apresentam-se os resultados referentes à caracterização dos microelétrodos de fibra de carbono utilizados para medição de *NO , tendo sido utilizadas algumas técnicas electroanalíticas, nomeadamente amperometria e voltametria de onda quadrada.

3.2. Resultados

3.2.1. Aferição das Soluções Padrão de Óxido Nítrico

Perfil de Libertação de NO a partir de DETA/ NO

Numa primeira etapa estudou-se o perfil de libertação do gás a partir do dador DETA/ NO . Isto é, determinou-se a relação entre a concentração de DETA/ NO adicionado e a concentração de NO em solução, bem como o tempo para o qual concentração atingiu um valor estacionário.

Utilizou-se o sistema de medição de NO da WPI com o sensor ISO-NOP porque possui um método de calibração robusto onde o NO é gerado quimicamente a partir de NO_2^- em meio ácido (ver reacção 14). Na Fig. 3.1 mostra-se o registo amperométrico de uma calibração deste sensor e a respectiva curva de calibração.

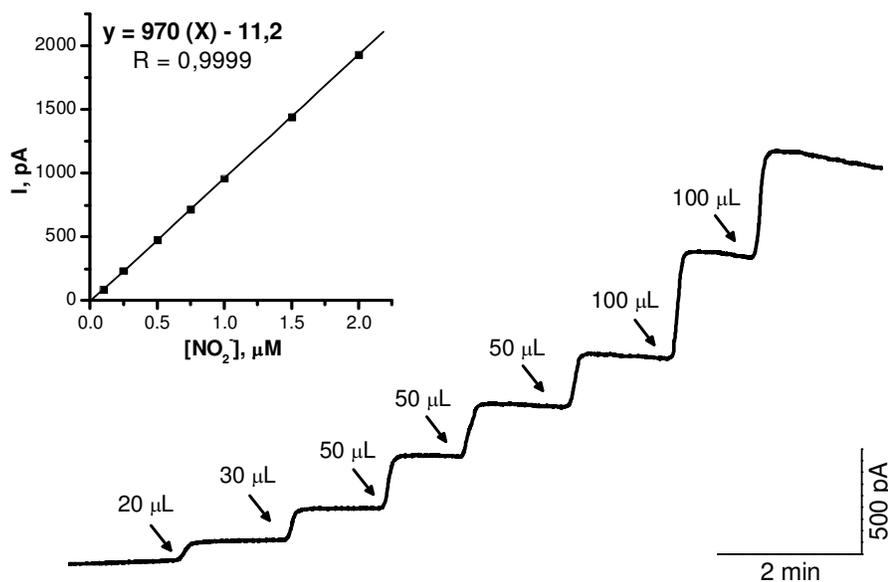


Figura 3.1 – Registo amperométrico de calibração do sensor NO da WPI ISO-NOP. Os volumes indicados correspondem a NO_2^- (100 μM) adicionado a 20 mL de PBS. No painel interior mostra-se a curva de calibração e a respectiva equação de regressão linear.

Observou-se que o sensor comercial apresenta linearidade da resposta no intervalo de concentrações de NO utilizado, ou seja, entre 0,1 e 2 μM .

Na Fig. 3.2 mostram-se os registos amperométricos da reacção de libertação de NO a partir de três concentrações de DETA/ NO e a respectiva correlação linear. Observou-se que a fase estacionária da reacção de libertação de NO foi alcançada ao fim de cerca de 60 minutos. A partir da equação da recta determinou-se uma relação entre concentrações de DETA/ NO e NO de $\approx 100:1$. Deste modo, na preparação de soluções de NO a partir de DETA/ NO , utilizaram-se as soluções 60 minutos após a diluição da solução stock em PBS pH 7,4. O coeficiente de correlação foi de 0,998, indicando uma boa linearidade no intervalo de concentrações 10-100 μM .

Solução Padrão de NO Gás

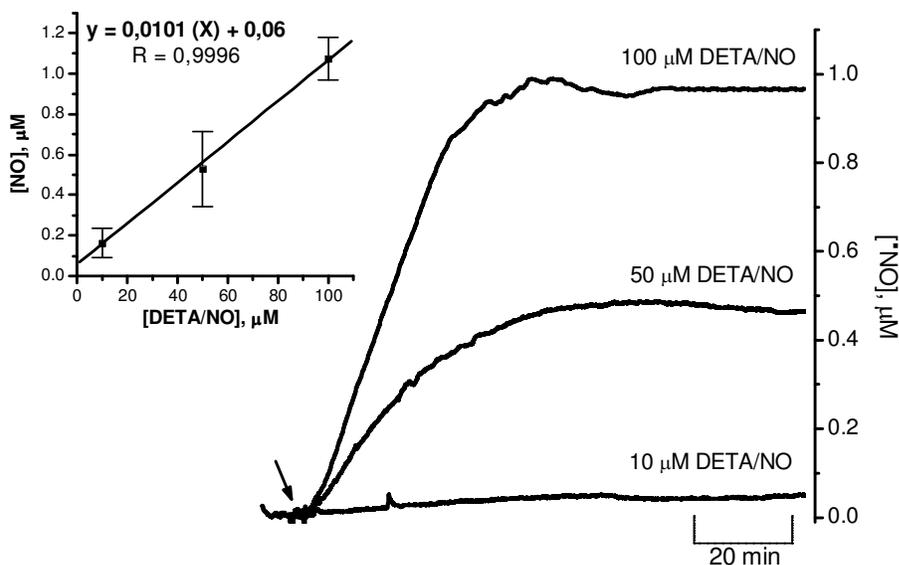


Figura 3.2 – Perfil de libertação de NO a partir 3 concentrações de DETA/ NO . A seta indica o momento de adição à solução. No painel interior mostra-se a relação entre a concentração inicial de DETA/ NO (inicial) e a de NO (após 60 minutos) e a respectiva regressão linear. Os valores representam a média \pm S.E.M. (n=3).

Utilizando o sensor ISO-NOP previamente calibrado determinou-se a concentração da solução padrão preparada por saturação de água ultra-pura com NO gás. O valor médio de concentração da solução padrão foi de $2,05 \pm 0,08$ mM (n=3).

3.2.2. Potencial de Oxidação

Determinou-se o potencial de oxidação para NO e NO_2^- por voltametria de onda quadrada. Na Fig. 3.3 mostram-se os dois voltamogramas obtidos em PBS pH 7,4, um para $10 \mu\text{M}$ de NO preparado a partir de gás e outro para $100 \mu\text{M}$ de NO_2^- . O valor de potencial de oxidação de NO foi de $+0,750 \pm 0,06$ V (n=7) enquanto que para o NO_2^- foi de $+0,933 \pm 0,07$ V (n=3), ambas em relação a um eléctrodo de referência Ag/AgCl (3M).

Com base nestes resultados, as medições amperométricas de NO realizaram-se a um potencial de $+0,9$ V, um valor 150 mV acima do potencial de oxidação determinado para os MFC-NO.

Quando se utilizam eléctrodos para medir NO , a possibilidade de interferência de NO_2^- na monitorização é uma preocupação que deve estar presente, não só por ser produto de reacção do NO em sistemas biológicos, mas também por o seu potencial de oxidação ser próximo do NO .

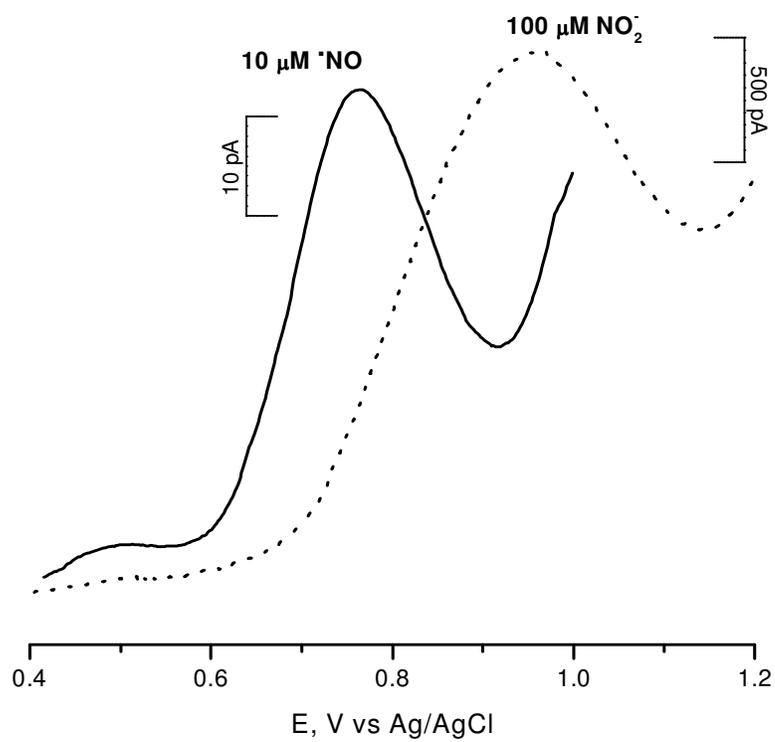


Figura 3.3 – Voltamogramas de onda quadrada representativos obtidos para $\text{NO } 10 \mu\text{M}$ (linha sólida) e $\text{NO}_2^- 100 \mu\text{M}$ (linha tracejada).

3.2.3. Sensibilidade e Limite de Detecção

Na Fig. 3.4 mostra-se um registo amperométrico típico de calibração de um MFC-NO realizada com soluções de NO obtidas a partir do dador DETA/NO, com a respectiva recta de regressão linear e equação da recta. Para além da boa reprodutibilidade de resposta para injeções sucessivas, observou-se uma excelente linearidade na recta de regressão linear. O valor médio de sensibilidade foi de $631 \pm 86 \text{ pA}/\mu\text{M}$ ($n=34$).

O valor médio do limite de detecção dos MFC-NO foi de $32 \pm 6 \text{ nM}$ ($n=9$).

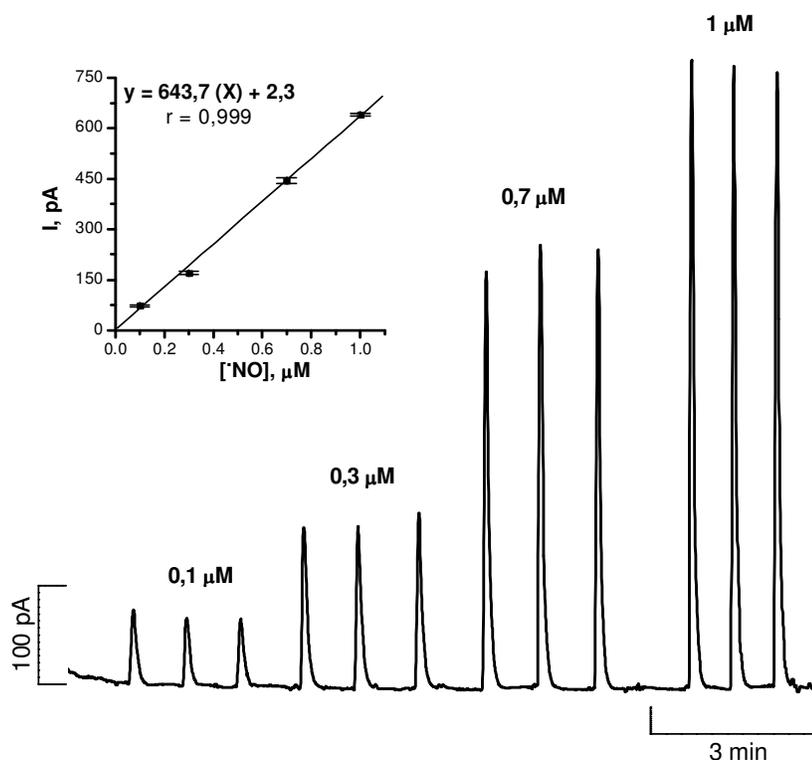


Figura 3.4 Registo amperométrico típico de calibração de um MFC-MFO com soluções padrão de NO preparadas a partir de DETA/NO. No painel interior encontra-se a recta de regressão linear e a respectiva equação.

3.2.4. Selectividade

O potencial de oxidação utilizado para medir $\cdot\text{NO}$, +0,9 V vs Ag/AgCl, permite medir também várias outras espécies electroactivas com potencial de oxidação inferiores ao do $\cdot\text{NO}$ e que podem ser encontradas em preparações do SNC. Espera-se que o revestimento os MFC com polímeros de Nafion® e σ -PD permita um ganho na selectividade da resposta dos mesmos.

Determinou-se a selectividade os MFC-NO relativamente a potenciais espécies interferentes presentes no hipocampo e agonistas utilizados calculando a razão entre as correntes amperométricas produzidas pelos interferentes com a obtida para $\cdot\text{NO}$ 1 μM obtido a partir de DETA/NO. Os valores da razão de selectividade são apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Razão de selectividade dos MFC-NO relativamente a um conjunto de interferentes.

Interferente	Razão de Selectividade \pm S.E.M. (n)
NO_2^-	1100:1 \pm 32 (n=6)
Ascorbato	720:1 \pm 16 (n=6)
DA	20:1 \pm (n=6)
5-HT	40:1 \pm 1 (n=6)
Tirosina	150:1 \pm 4 (n=5)
N_xO_y	250:1 \pm 10 (n=4)
ONOO^-	2120 \pm 128 (n=4)
H_2O_2	>10000 (n=5)
L-Glu	>10000 (n=6)
L-Arg	>10000 (n=6)
NMDA	>10000 (n=6)

3.2.5. Tempo de Resposta

O tempo de resposta dos MFC-NO é uma propriedade analítica que assume grande importância do contexto das medições de NO em preparações biológicas devido ao seu reduzido tempo de vida. A aplicação de diferentes polímeros na superfície de carbono dos microelétrodos pode comprometer o tempo de resposta do mesmo, principalmente por restringirem à difusão da espécie detectada até à superfície activa do eléctrodo. O tempo de resposta dos MFC-NO, avaliado em termos de $T_{50\%}$, foi de $1,11 \pm 0,15$ s ($n=9$).

3.3. Discussão

A detecção electroquímica oferece vantagens relativamente a outras metodologias de medição de $\cdot\text{NO}$, uma vez que não requer qualquer tratamento da amostra, sendo o gás detectado directamente e em tempo real. Por outro lado, as reduzidas dimensões dos MFC permite uma elevada resolução espacial. Neste capítulo apresentaram-se os resultados da avaliação das propriedades analíticas dos microelétrodos de fibra de carbono revestidos com polímeros e preparados especificamente para a medição de $\cdot\text{NO}$ em fatias de hipocampo de rato. Os MFC-NO foram produzidos por revestimento da superfície activa dos elétrodos com polímeros com o objectivo de melhorar aspectos analíticos como a selectividade da medida. Deste modo, avaliaram-se as principais características dos elétrodos, tais como sensibilidade, selectividade, tempo de resposta e limite de detecção, para além de se ter determinado o valor do potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$.

As dificuldades metodológicas inerentes à preparação de soluções de $\cdot\text{NO}$ directamente a partir do gás tem levado recorrentemente à escolha de outras formas de obtenção de soluções padrão, nomeadamente por decomposição química de determinados compostos geradores de $\cdot\text{NO}$ vulgarmente denominados de dadores, ou então por redução química de NO_2^- por I^- ou ascorbato em meio ácido.

Este último processo foi utilizado na calibração do sensor ISO-NOP de WPI. Não foi, contudo, possível utilizar este método de calibração para avaliar os MFC-NO não só pela elevada acidez poder comprometer a integridade dos filmes poliméricos, mas também devido à interferência causada pelo ascorbato ou I^- . Neste sentido, utilizaram-se soluções de $\cdot\text{NO}$ preparadas a partir do dador DETA/NO.

Este dador é um diazeniumdiolato ou NONOato no qual um dímero de $\cdot\text{NO}$ se encontra ligado ao nucleófilo através de um átomo de nitrogénio, formando-se assim um grupo funcional do tipo $\text{X}-[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$. Decompõe-se espontaneamente em solução aquosa, dando origem ao nucleófilo e a duas

moléculas de $\cdot\text{NO}$. A decomposição é dependente do pH, sendo estável para valores superiores a 9 e instantânea para valores de pH inferiores a 5. O tempo de meia vida deste dador de $\cdot\text{NO}$ a pH 7,4 e a 37°C é de aproximadamente 60 horas (Feelisch e Stamler, 1996).

Foi determinado o perfil de libertação de DETA/NO à temperatura ambiente e a um pH 7,4, tendo-se chegado à relação de 100:1 entre as concentrações de DETA/NO inicial e a de $\cdot\text{NO}$ ao tempo de 60 min, tempo para o qual se observou que a reacção de decomposição atinge um estado estacionário. Também se verificou ser boa a linearidade entre as concentrações de DETA/NO iniciais e a de $\cdot\text{NO}$ após 60 minutos de decomposição.

Deste modo, utilizou-se este dador para efectuar calibrações dos MFC-NO, tendo-se sempre o cuidado de utilizar as soluções onde se procedia à reacção de decomposição 60 minutos após a adição do DETA/NO.

A determinação do potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$ com MFC-NO realizou-se por voltametria de onda quadrada a partir de uma solução padrão de $\cdot\text{NO}$ gás. O valor de potencial de oxidação observado foi de +0,75 V vs Ag/AgCl. Este valor está em concordância com o reportado por outros autores para eléctrodos de fibra de carbono revestidos com *o*-PD e Nafion®. Na literatura, os valores de potencial de oxidação para este tipo de sensores variam entre +0,73 e +0,775 V vs Ag/AgCl ou SCE (Beckman, 1996, Ferreira *et al.*, 2005, Friedemann *et al.*, 1996, Pontie *et al.*, 1999, Pontie *et al.*, 2000).

Com base nestes resultados, fixou-se o potencial de oxidação para a medição da concentração de $\cdot\text{NO}$ em +0,9 V vs Ag/AgCl, valor igual ao utilizado em vários outros trabalhos onde se mediu o gás em preparações biológicas diversas (Friedemann *et al.*, 1996, Pontie *et al.*, 2000, Bedioui *et al.*, 1997, Kumar *et al.*, 2001, Malinski e Czuchajowski, 1996, Mori e Bertotti, 2000, Pontie *et al.*, 2000).

O elevado potencial de oxidação utilizado para medir o $\cdot\text{NO}$ tem implicações na selectividade da medida realizada com os MFC-NO uma vez que existe, em especial em preparações do SNC, um variado leque de

compostos electroactivos que podem interferir na resposta observada, nomeadamente ascorbato ($E_{ox} \approx -0,2$ e $+0,2$ V vs Ag/AgCl), aminas biogénicas como DA e os seus metabolitos ($E_{ox} \approx +0,15$ a $+0,25$ V vs Ag/AgCl) e indóis como 5-HT e seus metabolitos ($E_{ox} \approx +0,3$ a $+0,4$ V vs Ag/AgCl) (Stamford *et al.*, 1992) ou ainda a tirosina ($E_{ox} \approx 0,6$ V vs Ag/AgCl) que pode interferir com a medição de $\cdot\text{NO}$ (Stingele *et al.*, 1998). Para além destes, o NO_2^- é uma preocupação sempre presente quando se aborda a detecção electroquímica de $\cdot\text{NO}$, não só por ser o principal produto da sua metabolização, como também por ser oxidado a um valor de potencial ~ 150 mV superior ao gás, conforme confirmado na voltametria de onda quadrada obtida para este analito.

Embora o revestimento da superfície activa dos MFC com polímeros de Nafion® e *o*-PD pretendesse melhorar a selectividade dos eléctrodos por filtrarem espécies aniónicas e com elevado peso molecular, não se esperaria obter um sensor específico para $\cdot\text{NO}$. Deste modo, estudou-se a selectividade dos MFC- $\cdot\text{NO}$ em relação a vários possíveis interferentes bem como aos agonistas utilizados para estimular as fatias de hipocampo de rato. A avaliação revelou uma resposta pouco significativa a este tipo de interferentes comparativamente à observada para o $\cdot\text{NO}$. De qualquer modo, excluindo o caso do ascorbato, não se esperam grandes variações de concentração dos outros compostos referidos uma vez que são neurotransmissores minoritários no hipocampo e estão presentes em neurónios que projectam para dentro desta estrutura de outras partes do SNC estando, conseqüentemente, cortados na fatia (Umbriaco *et al.*, 1995, Vizi e Kiss, 1998).

Para os outros compostos testados, nomeadamente ONOO^- e N_xO_y , que podem resultar de reacções do $\cdot\text{NO}$ em preparações biológicas com O_2^- e O_2 , respectivamente, e H_2O_2 , cuja concentração pode aumentar em consequência da inibição da respiração mitocondrial, também se observaram boas razões de selectividade

O tempo de resposta dos MFC- NO , avaliado em termos de $T_{50\%}$, foi de aproximadamente 1 segundo. Este parâmetro analítico reveste-se de particular

importância quando se pretende monitorizar a dinâmica de concentração de $\cdot\text{NO}$ em preparações biológicas pois o tempo de meia vida deste radical varia entre os 3 e 30 segundos, dependendo da composição e do grau de oxigenação do meio (Furchgott e Vanhoutte, 1989, Ignarro *et al.*, 1987). Os ensaios posteriores em fatias de hipocampo revelaram que a dinâmica dos sinais obtidos em resposta à activação da principal via de síntese de $\cdot\text{NO}$ se situa na escala temporal dos minutos, sendo um tempo de resposta de um segundo perfeitamente aceitável.

Determinou-se para os MFC-NO um limite de detecção de aproximadamente 30 nM, tendo este valor sido calculado considerando o declive da recta de calibração dos sensores e o erro padrão desse mesmo parâmetro. O valor aqui reportado é semelhante a outros encontrados na literatura referentes à electro-oxidação directa de $\cdot\text{NO}$. Em particular para microelétrodos de fibra de carbono revestidos com *o*-PD e Nafion® os valores descritos variam entre 15 e 80 nM (Friedemann *et al.*, 1996, Park *et al.*, 1998, Kilinc *et al.*, 2002).

A concentração basal de $\cdot\text{NO}$ é da ordem de grandeza de alguns nanomolar e em situações fisiológicas a sua concentração eleva-se algumas centenas de nanomolar (Beckman, 1996). No hipocampo estão reportados na literatura variações da concentração de $\cdot\text{NO}$ entre 350 nM e 1 μM para estimulação com nicotina (Friedemann *et al.*, 1996) e 450 nM para L-arg (Xian *et al.*, 2000).

Desta forma, um sensor com limite de detecção de 30 nM permite estudar a dinâmica de concentração de $\cdot\text{NO}$ em condições fisiológicas.

Em síntese, os dados apresentados neste capítulo permitem afirmar que os MFC revestidos com polímeros de Nafion® e *o*-PD possuem características analíticas apropriadas para serem utilizados no estudo da dinâmica de concentração de $\cdot\text{NO}$ em fatias de hipocampo.

3.4. Conclusões

Neste capítulo apresentaram-se os resultados da avaliação de microelectrodos de fibra de carbono desenvolvidos especificamente para medir ${}^{\bullet}\text{NO}$ em fatias de hipocampo de rato – MFC-NO. Por um lado, a utilização de microelectrodos em modo amperométrico permite uma elevada resolução temporal e espacial nas medições e, por outro lado, o revestimento da superfície activa de carbono dos microelectrodos com polímeros seleccionados, confere selectividade adequada para a medição de ${}^{\bullet}\text{NO}$ em meios biológicos.

A avaliação dos microelectrodos consistiu na determinação do potencial de oxidação (+0,75 V), da sensibilidade de calibração (~630 nM), limite de detecção (~30 nM), tempo de resposta (~1s) e selectividade em relação a vários compostos potencialmente interferentes na medição electroquímica de ${}^{\bullet}\text{NO}$.

Os resultados obtidos permitem concluir que os microelectrodos de fibra de carbono revestidos com Nafion® e por electropolimerização de *orto*-fenilenodiamina apresentam uma performance analítica adequada à monitorização da produção de ${}^{\bullet}\text{NO}$ *in vitro* em fatias de hipocampo, e deixam antever a possibilidade de serem utilizados *in vivo* no cérebro, bem como noutras preparações biológicas.

4.

Dinâmica de Concentração do Óxido Nítrico em Fatias de Hipocampo de Rato

4.1. Introdução

Neste capítulo descrevem-se e discutem-se os resultados do estudo da dinâmica de concentração de ^1NO nas diferentes subregiões do hipocampo de rato em resposta à activação da principal via de síntese neuronal do radical: a activação do receptor do glutamato do tipo NMDA.

A acção do ^1NO enquanto mensageiro intercelular e neuromodulador no SNC tem sido demonstrada em variados estudos de natureza farmacológica, pouco se conhecendo da dinâmica de concentração do radical no SNC e em particular no hipocampo. A análise da produção de ^1NO por neurónios tem sido limitada a algumas regiões do SNC e normalmente tem recorrido a métodos indirectos, designadamente os bio-ensaios (Garthwaite *et al.*, 1988), quantificação de cGMP (East e Garthwaite, 1990, Morris *et al.*, 1994) e L-citrulina (Kiedrowski *et al.*, 1992, Toms e Roberts, 1994) bem como a medição de nitrito (Luo *et al.*, 1993, Shintani *et al.*, 1994). Estes trabalhos demonstraram a produção de ^1NO nos respectivos sistemas, mas não permitiram elucidar como varia a concentração de ^1NO no tempo e no espaço. Ora, sendo o ^1NO uma molécula que transporta informação associada à dinâmica da sua concentração, este é um conhecimento fundamental necessário à previsão da sua actividade biológica. Como referido anteriormente, as técnicas electroanalíticas com utilização de microeléctrodos possibilitam a medição directa de ^1NO com elevada resolução espacial e temporal.

No hipocampo, a produção de ^1NO dependente do receptor NMDA foi estimada por quantificação de cGMP (Fedele *et al.*, 2001), NO_x^- (Luo e Vincent, 1994), [14]-citrulina (Bhardwaj *et al.*, 1997; Blackshaw *et al.*, 2003) e utilizando sondas fluorescentes (Takata *et al.*, 2005). Há alguns estudos em fatias e *in vivo* onde foram utilizados microeléctrodos revestidos para medir a concentração de ^1NO produzido por vias não associadas directamente à estimulação do receptor NMDA. No entanto, nos estudos em fatias de hipocampo, a produção foi estimulada de um modo mecanisticamente

complexo com acetilcolina e nicotina (Smith *et al.*, 1998). Os estudos *in vivo* mediram a resposta à activação à perfusão com L-arg e acetilcolina (Xian *et al.*, 2000) e à isquémia/reperfusão (Jiang *et al.*, 1999). No entanto, no primeiro caso as medidas não foram efectuadas em contínuo e no segundo foram utilizados eléctrodos com 250 µm de diâmetro, sem preocupações relativos ao acoplamento mecânico e resolução espacial, demonstrando apenas a produção dependente de NOS I.

Apesar destes estudos terem comprovado a síntese de NO no hipocampo e, no caso da utilização de sondas fluorescentes ou de medidas indirectas, a sua produção associada à activação do receptor NMDA, ainda não foi apresentado qualquer estudo que respondesse a questões quantitativas que estão na base da sua actividade biológica, nomeadamente a caracterização cinética da produção e decaimento de NO , a avaliação da resposta ao longo do eixo tri-sináptico, a determinação da esfera de difusão e as relações quantitativas entre a potência do estímulo e a intensidade do sinal.

4.2. Resultados

4.2.1. Pressão parcial de Oxigênio na Fatia de Hipocampo

As fatias de hipocampo foram perfundidas por soluções saturadas com Carbox, uma mistura de gases contendo 95% de O₂. Para uma pressão atmosférica normal isto significa que a pressão parcial de O₂ (pO₂) da solução é de 750 torr, muito acima dos 10-40 torr reportados na literatura como fisiológicos para o SNC de roedores (Erecinska e Silver, 2001, Liu *et al.*, 1995, Mulkey *et al.*, 2001, Nair *et al.*, 1987). Considerando estes dados, e antevendo que as determinações da dinâmica de ¹NO para pO₂ elevado comprometeriam a projecção dos resultados para o *in vivo*, determinou-se o perfil de pO₂ ao longo da profundidade da fatia de hipocampo, nas diferentes subregiões, CA1, CA3 e DG, ao nível da camada de células principais.

Na Fig. 4.1A pode observar-se a variação de pO₂ entre o meio de perfusão e a fatia enquanto que em Fig. 4.1B se mostra em mais pormenor a variação de pO₂ a diferentes profundidades do tecido, na subregião CA1, st. Pyr. Observou-se uma variação acentuada de pO₂ entre o meio e a superfície do tecido, apontando para um consumo elevado de O₂ pelas células do tecido. O valor médio de pO₂ à superfície do tecido foi de 103 ± 12 torr (n=3).

Na tabela 4.1 apresentam-se os valores de pO₂ obtidos para as diferentes subregiões à profundidade de 200 μm (profundidade a que foram colocados os MFC-NO na monitorização de ¹NO em resposta à estimulação com NMDA). Como é notório, na subregião CA1 o valor de pO₂ está dentro dos valores reportados na literatura como sendo fisiológicos (10-40 torr) enquanto que em CA3 e DG se encontra um pouco acima, mas mesmo assim muito inferior ao valor de pO₂ da solução exterior ao tecido.

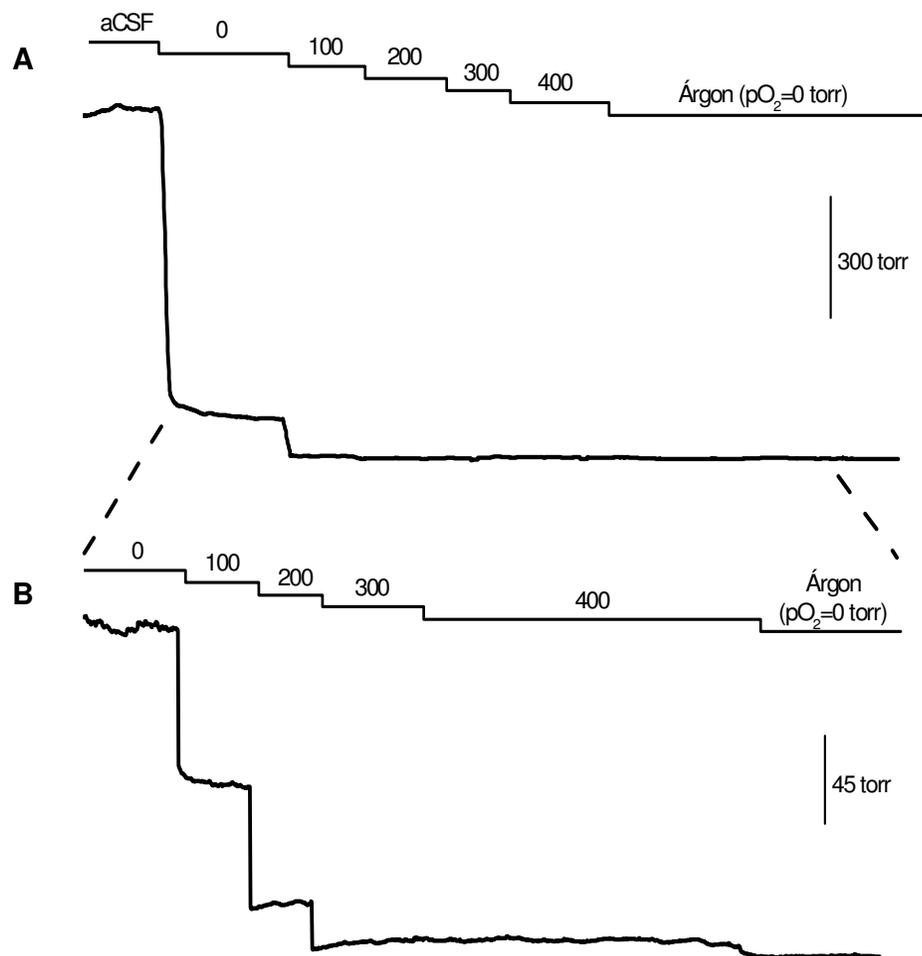


Figura 4.1 – Perfil de pO_2 na subregião CA1 do hipocampo. A) Variação de pO_2 entre o meio (aCSF) presente na câmara e sobrenadante à fatia e diferentes profundidades da fatia de hipocampo (0, 100, 200, 300 e 400 μm); B) Expansão do registo de pO_2 para a parte do registo relativo apenas às diferentes profundidades da fatia.

Tabela 4.1 – Valores médios \pm S.E.M. de pO_2 calculados para a profundidade de 200 μm relativamente à superfície superior para as diferentes subregiões.

Subregião	$pO_2 \pm$ S.E.M. (torr)
CA1 (n=8)	31 ± 5
CA3 (n=6)	72 ± 12
DG (n=9)	82 ± 6

4.2.1.1. Produção de Óxido Nítrico na Subregião CA1 da Fatia de Hipocampo

Como já foi mencionado, a principal via de produção de *NO em neurónios é a activação do receptor NMDA. Numa primeira abordagem ao estudo da produção de *NO em fatias de hipocampo de rato, estimulou-se esta via por perfusão do agonista endógeno do receptor, L-glu, e do agonista sintético e específico, NMDA. Embora a estimulação afectasse todo o tecido, os registos traduzem a variação da concentração de *NO na subregião CA1 (st. Pyr.).

4.2.1.2. Estimulação Transitória

L-glutamato

Nas sinapses glutamatérgicas, o receptor NMDA é normalmente co-expresso com o receptor de AMPA, receptores que, embora respondam ao mesmo agonista, têm sensibilidades, cinéticas e permeabilidades distintas. O receptor encontra-se bloqueado por Mg^{2+} a potenciais de membrana de

repouso. A activação de receptores AMPA, com cinética rápida e permeáveis a Na^+ , conduzem à despolarização necessária para alívio deste bloqueio.

Deste modo, determinou-se a dinâmica de concentração de NO para estimulação com L-glu 1 e 5 mM. Na Fig. 4.2 mostra-se um registo amperométrico típico para a duas estimulações sucessivas com L-glu 5 mM por períodos de 2 minutos. Em todos as experiências observou-se um decaimento da resposta para estimulações sucessivas.

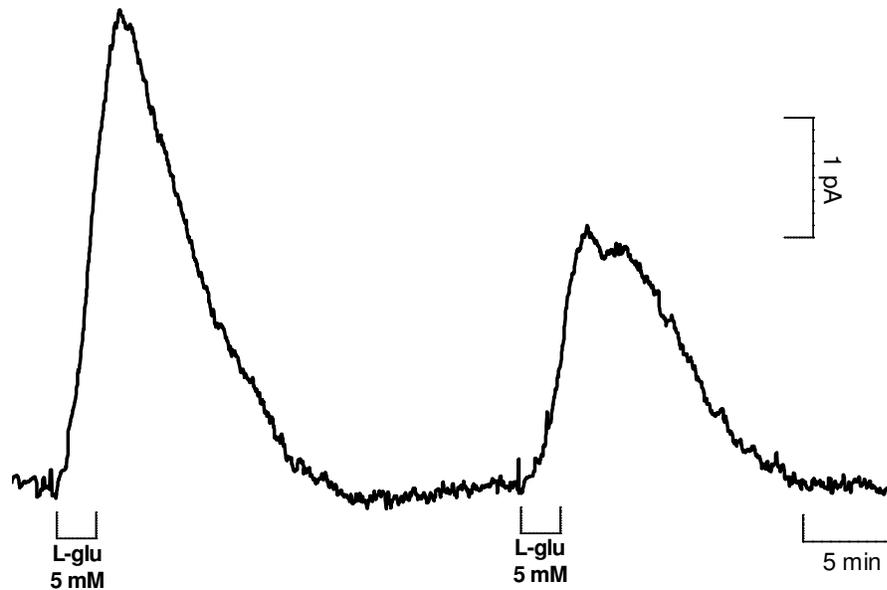


Figura 4.2 – Registo amperométrico de NO produzido na subregião CA1 em resposta à estimulação repetida do tecido por perfusão de L-glu (5mM, 2 min) em intervalos de 20 minutos.

Para as duas concentrações de L-glu utilizadas (1 e 5 mM) calculou-se o valor de carga total de cada sinal (Fig. 4.3). Observou-se relação directa entre a resposta e a concentração do estímulo. Para a estimulação com 5 mM, onde se aplicaram dois estímulos consecutivos, avaliou-se o decaimento da resposta calculando-se a razão entres as cargas do segundo e primeiro sinais (Q_2/Q_1). O valor desta razão foi de $0,6 \pm 0,11$ ($n=8$).

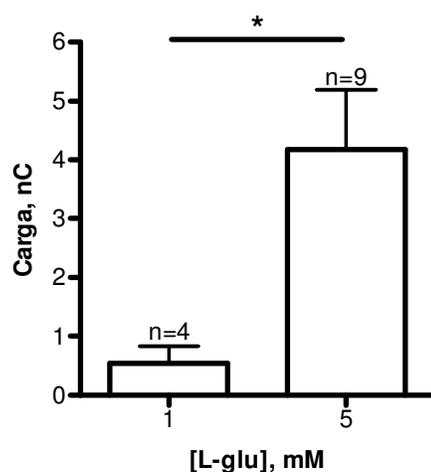


Figura 4.3 – Carga total do sinal primeiro de NO para diferentes concentrações de estimulação com L-glu (1 e 5 mM). As barras representam o valor médio \pm S.E.M. * $P < 0,05$.

Com base nas características do sinal, para os registos obtidos com estimulação a 5 mM calculou-se o tempo necessário para se atingir 80% do máximo da resposta ($T_{80\%}$) e a constante de tempo de decaimento para cada sinal (Tabela 4.2) adaptando a cada momento da curva um ajuste de uma curva sigmoide e um decaimento exponencial de primeira ordem, respectivamente. Para esta condição de estimulação não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos parâmetros cinéticos calculados para cada estímulo. Não foi possível fazer o

mesmo para os registos obtidos para estimulação com 1 mM devido à fraca relação sinal/ruído para essa condição de estimulação.

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos calculados a partir dos registos amperométricos de $\dot{\text{NO}}$ para estimulação por perfusão com L-glu 5 mM. Os valores apresentados são a média \pm S.E.M.

	1º Sinal	2º Sinal
$T_{80\%}$, s (n)	162 \pm 24 (9)	213 \pm 32 (8)
Constante tempo, s (n)	305 \pm 22 (9)	289 \pm 44 (8)

NMDA

Para activar especificamente o receptor NMDA utilizou-se o agonista sintético NMDA. Neste sentido, removeu-se Mg^{2+} do meio de perfusão de forma a contornar o bloqueio imposto por este ião ao receptor para potenciais de repouso.

Na Fig. 4.4 mostram-se três registos típicos da corrente amperométrica registada com o MFC-NO inserido na subregião CA1 da fatia de hipocampo para a estimulação com NMDA 10, 50 e 100 μM , aplicado em perfusão durante dois minutos. Observou-se uma dependência da resposta sobre a concentração do estímulo. Para cada registo calculou-se a carga total e construiu-se a curva dose-resposta apresentada na Fig. 4.5. Por aproximação a uma função sigmoide, calculou-se o valor de EC_{50} de $23,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

Para a estimulação com NMDA 100 μM , calculou-se a concentração máxima de $\dot{\text{NO}}$ atingida, sendo o valor médio de $195,7 \pm 42$ (n=8).

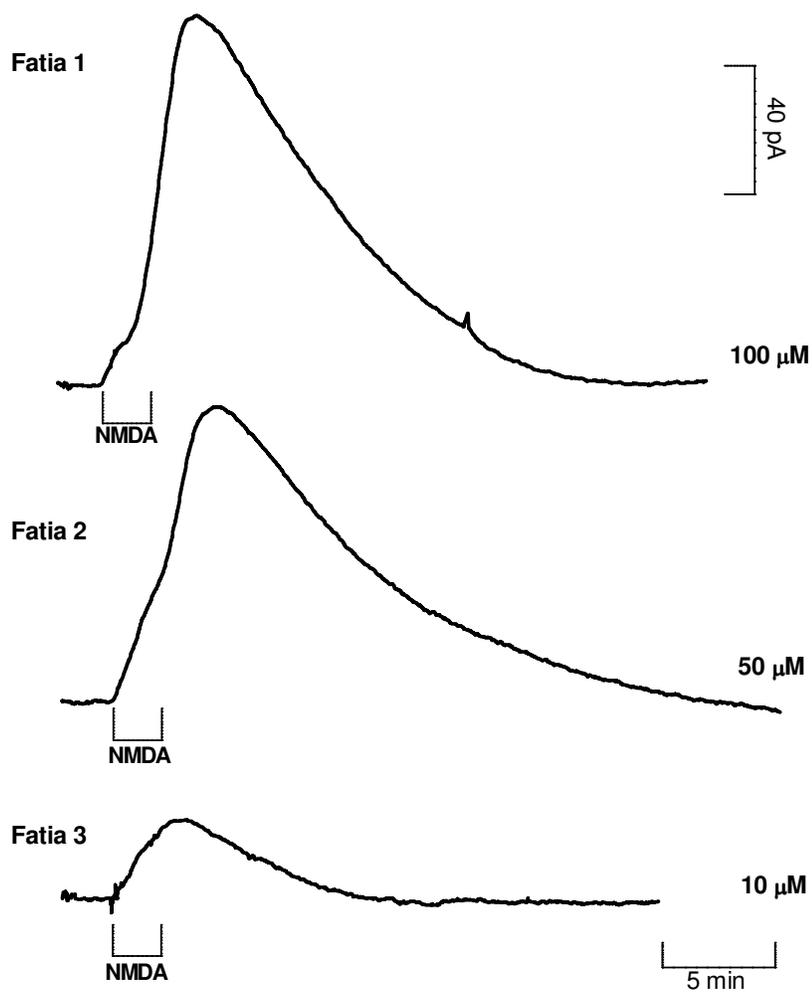


Figura 4.4 – Registos amperométricos típicos obtidos por estimulação por perfusão da fatia de hipocampo com NMDA a diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM) perfundido por um período de 2 minutos, com o MFC-⁺NO inserido em CA1 (St. Pyr.).

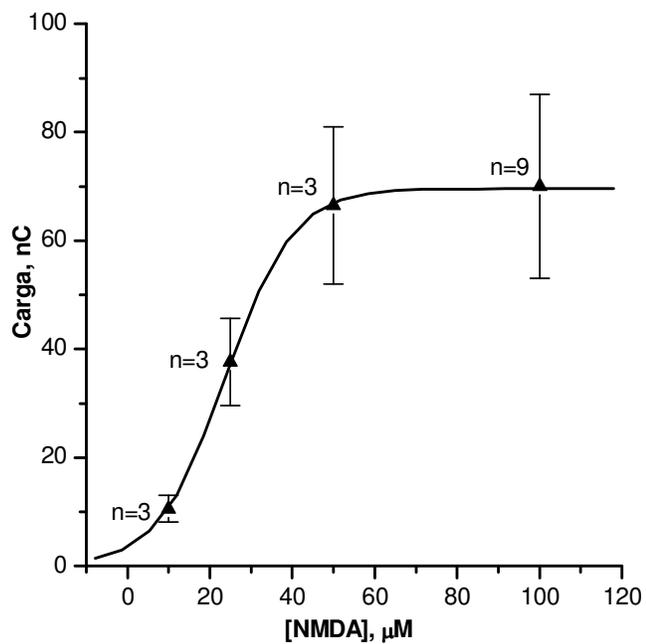


Figura 4.5 – Variação da resposta do tecido em CA1 (st. Pyr.) em termos de carga total do sinal em função da concentração de NMDA aplicada. Os valores representam a média \pm S.E.M. $EC_{50} = 23,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$

Para 100 μM de NMDA de, concentração para a qual se observou uma resposta máxima, realizaram-se duas estimulações repetidas num intervalo de 20 min (Fig. 4.6). Tal como para a estimulação com L-glu, observou-se um decaimento da resposta para estímulos repetidos, sendo o segundo sinal significativamente menor que o primeiro (painel interior da Fig. 4.6). A razão $Q2/Q1$ foi de $0,17 \pm 0,06$ ($n=4$).

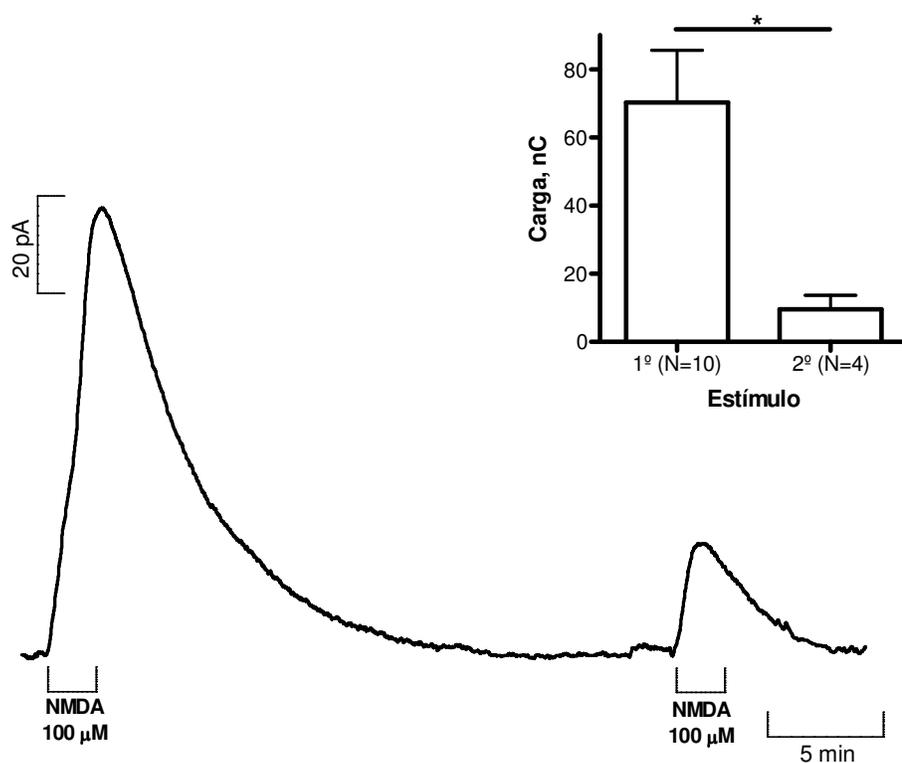


Figura 4.6 – Registo típico obtido em CA1 (st. Pyr.) para estimulação repetida da fatia de hipocampo com NMDA 100 μM . No painel interior encontra-se o gráfico de barras que mostra o valor médio \pm S.E.M. de carga total para o primeiro e segundo estímulos. * $P < 0,05$.

Comparando as estimulações com L-glu e NMDA (Fig. 4.7A) pode afirmar-se que, para todas as concentrações, o NMDA revelou ser mais potente que o agonista endógeno L-glu no que respeita a activação da via de síntese de *NO na subregião CA1 da fatia de hipocampo. Por outro lado, e como se pode observar na Fig. 4.7B, o decaimento da resposta para estímulos sucessivos foi maior ($P < 0,05$) quando a primeira resposta da fatia em termos de produção de *NO foi também ela maior.

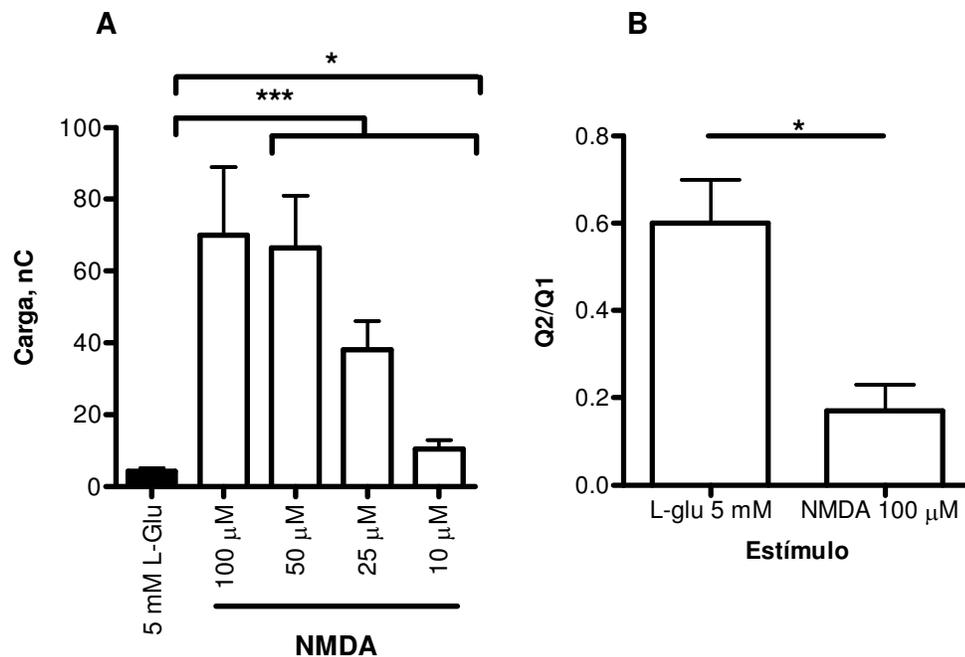


Figura 4.7 – A) Comparação dos valores de carga total determinados para a estimulação com L-glu (5 mM) e NMDA (10, 25, 50 e 100 μM). B) Diferença entre a razão Q2/Q1 para estimulações com NMDA (100 μM) e L-glu (5 mM). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

4. Dinâmica de Concentração do Óxido Nítrico em Fatias de Hipocampo de Rato

No que se refere à cinética de produção e decaimento do sinal de NO calcularam-se os valores de $T_{80\%}$ e a constante de tempo de decaimento para cada registo (tabela 4.3). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de cada parâmetro quer para as diferentes concentrações de NMDA. Por outro lado, os valores de $T_{80\%}$ e constante de tempo foram semelhantes para as estimulações com NMDA e L-glu indicando que independentemente do estímulo e da intensidade da resposta, a cinética de produção e remoção de NO é semelhante.

Tabela 4.3 – Valores de $T_{80\%}$ e constante de tempo de decaimento calculados para os registos amperométricos obtidos para estimulação da fatia de hipocampo com NMDA a diferentes concentrações.

[NMDA], μM	$T_{80\%}$, s (n)	Constante de Tempo, s (n)
10	128 ± 7 (3)	276 ± 12 (3)
25	171 ± 11 (3)	270 ± 21 (3)
50	193 ± 9 (4)	278 ± 54 (4)
100 (1 ^o sinal)	182 ± 16 (9)	384 ± 49 (9)
100 (2 ^o sinal)	127 ± 30 (4)	270 ± 70 (4)

4.2.1.3. Estimulação Contínua

Os resultados acima apresentados demonstraram que, para uma estimulação transitória com NMDA a produção de $\cdot\text{NO}$ na subregião CA1 da fatia de hipocampo é também transitória. De seguida, realizaram-se ensaios por estimulação contínua do receptor NMDA. Na Fig. 4.8 mostram-se registos amperométricos obtidos em CA1 para a estimulação contínua da fatia de hipocampo com NMDA 10 μM . Observou-se que, embora o sinal apresente uma cinética de decaimento mais lenta, o sinal de $\cdot\text{NO}$ continuou a ser transitório, sugerindo a existência de um mecanismo eficiente de inativação da via e/ou remoção do radical. A constante de tempo de decaimento calculada para a situação de estimulação contínua com NMDA 10 μM foi de 762 ± 175 s ($n=3$), um valor superior ao observado para estimulação transitória ($P<0,05$ para qualquer valor de concentração de NMDA utilizada).

No sentido de averiguar se o receptor NMDA estava activo ou inactivo durante a fase de decaimento do sinal, aplicou-se o inibidor competitivo do receptor (D-AP5) em diferentes momentos da fase de decaimento do sinal de $\cdot\text{NO}$. Como se mostra nos registos em linhas tracejada e pontuada da Fig. 4.8, a aplicação do inibidor provocou um aumento da velocidade de decaimento da resposta, indicando que o receptor ainda estava activo, bem como toda a maquinaria de síntese de $\cdot\text{NO}$.

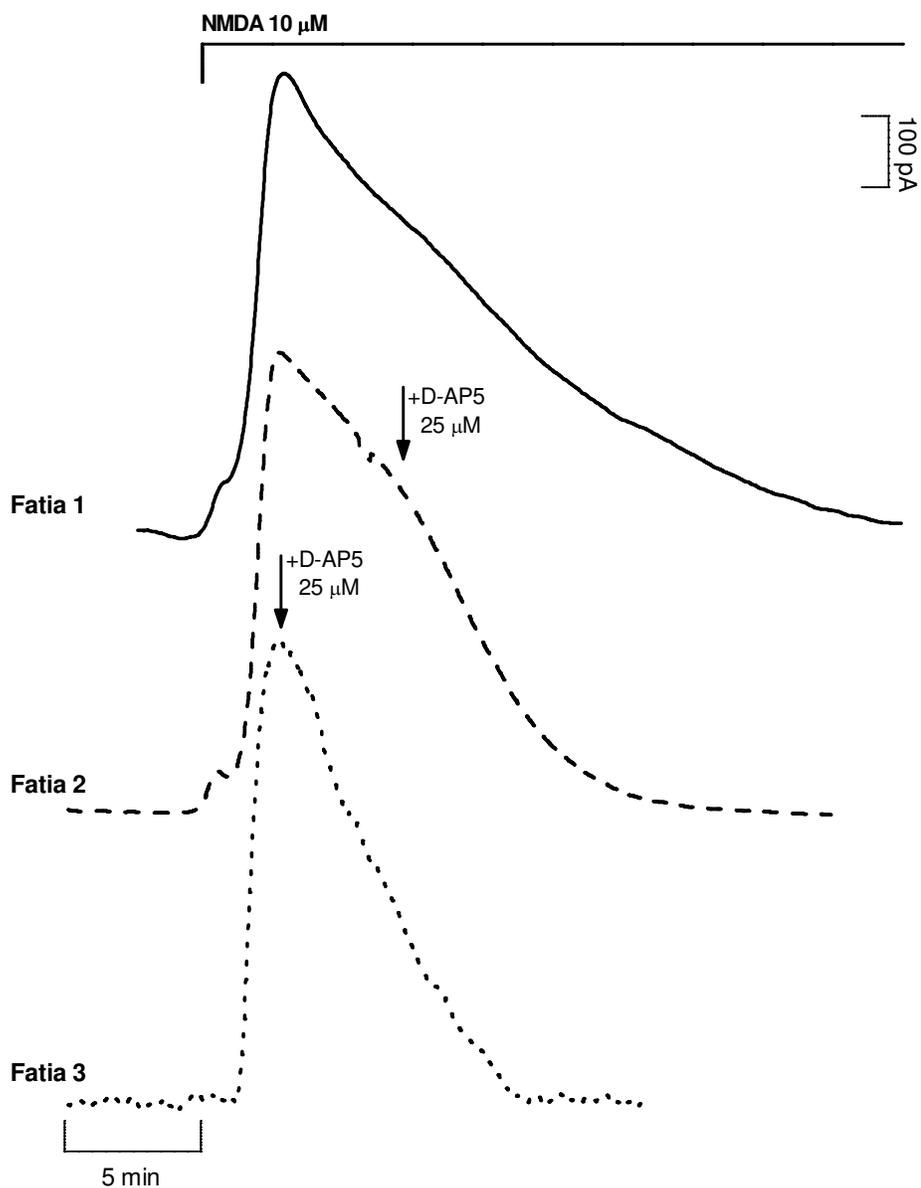


Fig. 4.8 – Registos típicos obtidos para a estimulação contínua da fatia de hipocampo com NMDA ($10 \mu\text{M}$), com o MFC-NO colocado em CA1. A linha contínua representa a aplicação de NMDA continuamente e para os casos das linhas tracejada e picotada foi adicionado D-AP5 ($25 \mu\text{M}$) na fase de decaimento do sinal e no início da fase de decaimento, respectivamente.

4.2.2. Estimulação Localizada

Com o intuito de estudar a dinâmica de concentração de NO nas diferentes subregiões do hipocampo e determinar o raio da sua esfera de difusão em CA1 recorreu-se a um protocolo de estimulação localizada em substituição do protocolo de perfusão da fatia. Este modo de estimulação ofereceu uma resolução espacial da estimulação vantajosa quando se considera a natureza difusível do NO . Como o estímulo foi ejetado sobre pressão à superfície da fatia de hipocampo por um curto período de tempo (3s, 10 Psi), aumentou-se a concentração do NMDA para 5 mM.

4.2.2.1. Dinâmica de Concentração de Óxido Nítrico nas Subregiões do Hipocampo de Rato

Na Fig. 4.9 apresentam-se registos típicos obtidos para as subregiões CA1, CA3 e DG da fatia de hipocampo de rato utilizando um protocolo de estimulação localizada. É notório que as subregiões tiveram respostas com magnitude distinta para a mesma condição de estimulação, sendo a produção de NO maior em CA1 relativamente a CA3 e DG. Para cada subregião aplicaram-se dois estímulos sucessivos de NMDA com intervalo de vinte minutos de modo a avaliar a extensão de decaimento da segunda resposta relativamente à primeira.

Para cada registo calculou-se a carga total do sinal e concentração máxima de NO , bem como a razão Q2/Q1 (Fig. 4.10). A subregião CA1 foi aquela onde a produção de NO em resposta à estimulação localizada com NMDA foi mais acentuada e a concentração máxima de gás atingida foi uma ordem de grandeza superior à observada em qualquer uma das outras subregiões. No que respeita a razão Q2/Q1, que exprime o decaimento do segundo sinal relativamente ao primeiro, não se observaram diferenças entre as subregiões

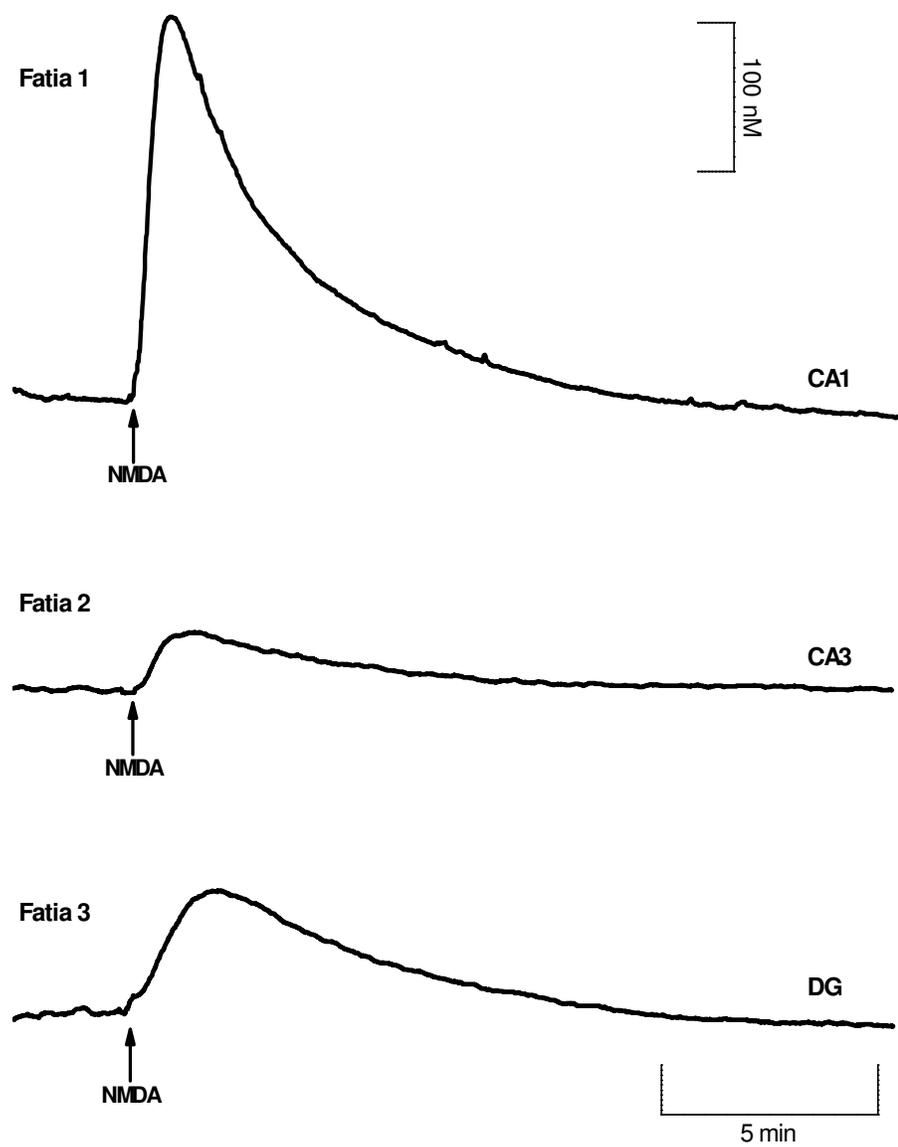


Figura 4.9 – Registos amperométricos obtidos nas diferentes subregiões do hipocampo em resposta à estimulação de receptores NMDA Para as subregiões CA1 e CA3 o MFC-NO foi colocado em st. Pyr, enquanto que em DG foi colocado em st. Gran.

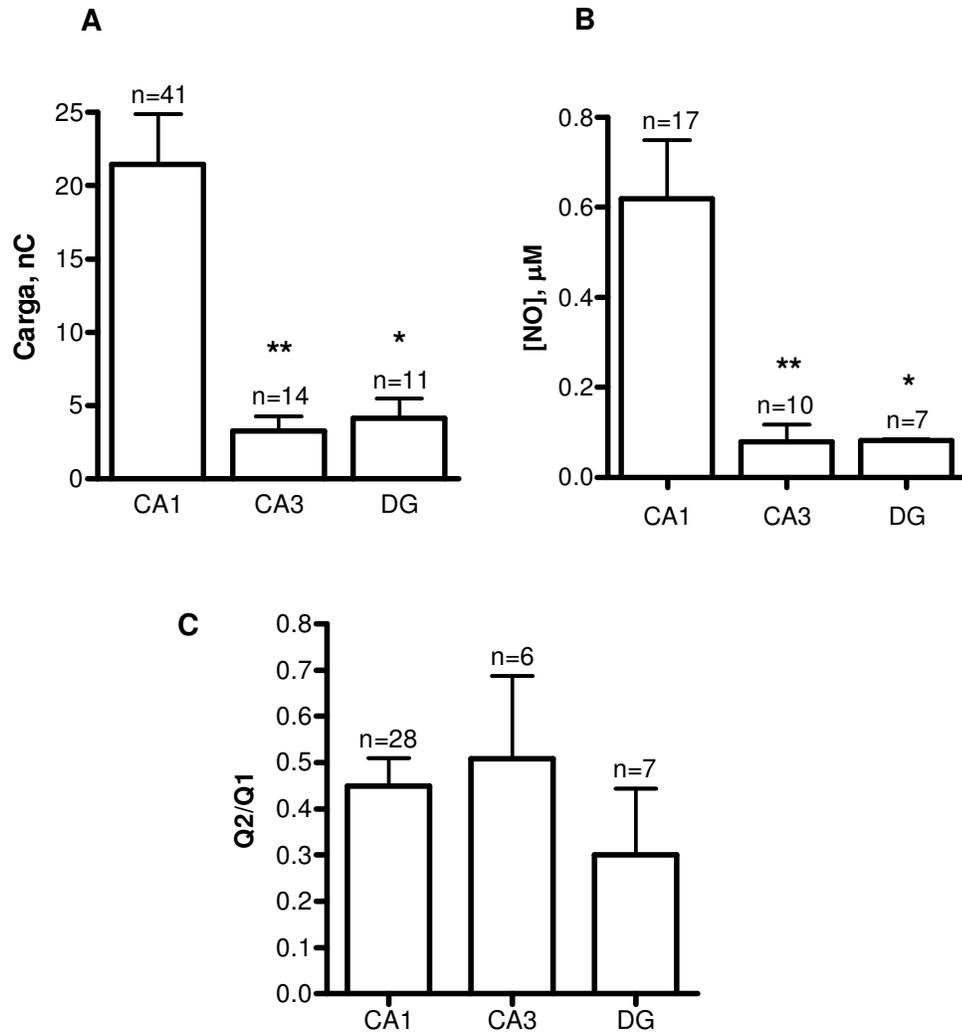


Figura 4.10 – Valores médios \pm S.E.M. de carga total dos sinais (A), concentração máxima de NO atingida (B) e razão de carga 2^o/1^o sinais (C) para as subregiões CA1, CA3 e DG. * P<0,05, ** P<0,001 relativamente a CA1.

Para cada subregião calcularam-se os valores de $T_{80\%}$ e da constante de tempo de decaimento dos sinais de cada registo. Como se pode observar na Tabela 4.4 a cinética de produção de *NO na subregião DG foi mais lenta que em CA1 e CA3, enquanto que não se observaram quaisquer diferenças no valor de $T_{80\%}$.

Tabela 4.4 – Valores $T_{80\%}$ e constante de tempo do decaimento para cada subregião. Os valores representam a média \pm S.E.M. *** $P < 0,001$.

Subregião	$T_{80\%}$, s (n)	Constante de Tempo, s (n)
CA1	39 ± 6 (24)	247 ± 17 (28)
CA3	43 ± 10 (10)	175 ± 26 (8)
DG	166 ± 30 (4) ***	212 ± 30 (4)

4.2.2.2. Esfera de Difusão de Óxido Nítrico Produzido Endogenamente em CA1

Para determinar a esfera de difusão do *NO produzido endogenamente em resposta à activação do receptor NMDA utilizou-se um protocolo de estimulação local específico, com o objectivo de diminuir o raio de difusão do agonista. Aplicou-se o estímulo por um período de 500 ms, à mesma pressão de 10 Psi e à mesma concentração de NMDA (5mM). Determinou-se, anteriormente, que para este tempo de estimulação o agonista tem uma esfera de difusão menor que 100 μ m (ver Fig. 2.13).

A Fig. 4.11 ilustra as experiências realizadas para a determinação da esfera de difusão de *NO em resposta à activação do receptor NMDA na subregião CA1 (st. Pyr.).

Colocou-se o MFC-NO a distâncias crescentes do local de estimulação: 0, 100, 200, 300 e 400 μm . Como se observa na Fig. 4.11 à medida que aumentou a distância entre o local de estimulação e o local de determinação de $\cdot\text{NO}$, a amplitude da resposta diminuiu, tornando-se diminuta para distâncias superiores a 400 μm .

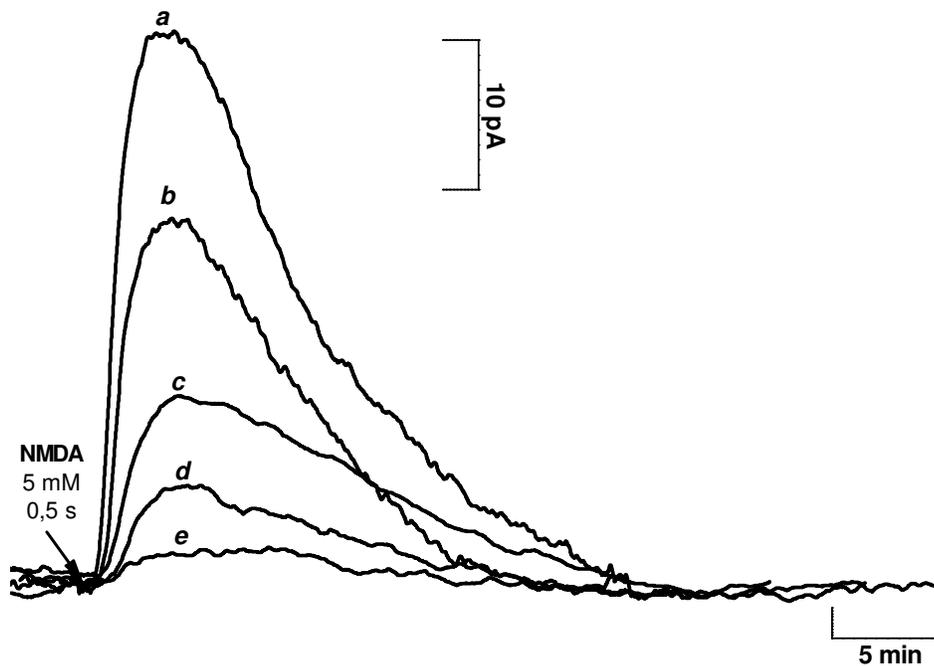


Figura 4.11 – Registos amperométricos do $\cdot\text{NO}$ produzido endogenamente na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo por activação de receptores NMDA. A medição foi realizada a diferentes distâncias do local de estimulação localizada: 0 μm (a), 100 μm (b), 200 μm (c), 300 μm (d) e 400 μm (e).

4.2.3. Verificação do Sinal Bioanalítico

Conforme referido no Capítulo 3, uma limitação associada à utilização de microelctrodos de fibra carbono para medir NO é a selectividade. Apesar da avaliação das propriedades analíticas dos MFC-NO indicar que estes podem ser utilizados para tal fim, o elevado potencial de oxidação do NO e a natureza química da preparação biológica utilizada requereu uma verificação da natureza química do sinal medido, isto é, foi necessário verificar se o sinal medido reflectiu apenas alterações na concentração do analito de interesse (Phillips e Wightman, 2003).

4.2.3.1. Electroquímica

A corrente eléctrica medida pode ter origem na electrólise, na carga da dupla camada e em artefactos, sendo por isso fundamental demonstrar a natureza do sinal detectado. De entre as técnicas electroanalíticas a amperometria é aquela com menor capacidade de identificação química do analito. Utilizaram-se duas estratégias de verificação electroquímica: variação do potencial aplicado para um valor insuficiente para promover a oxidação de NO e realização de experiências em amperometria de impulso diferencial onde foi possível minimizar a possível contribuição da oxidação de espécies electroactivas com potencial de oxidação abaixo de + 0,7 V.

Potencial de Oxidação

O potencial de oxidação do NO em MFC-NO de aproximadamente +0,75 V é superior aos valores de espécies potencialmente interferentes, nomeadamente ascorbato, DA, 5-HT, entre outros. De forma a confirmar que estas espécies com potencial de oxidação inferior ao do NO não foram responsáveis pela corrente de oxidação observada realizaram-se experiências a um potencial de +0,5 V, onde não há oxidação de NO , na subregião CA1.

Para cada registo obtido para um potencial de oxidação de +0,5 V vs Ag/AgCl calculou-se a carga total do sinal obtido. Na fig. 4.12 comparam-se os valores de carga total obtidos para potenciais de oxidação de +0,9 e +0,5 V vs

Ag/AgCl, respectivamente. De notar que de 7 determinações realizadas ao potencial de oxidação de +0,5 V, em 4 não se observou variação de corrente. Estes resultados suportam que no sinal registado a +0,9 V não há contribuição de interferentes oxidados a potenciais inferiores a +0,5 V.

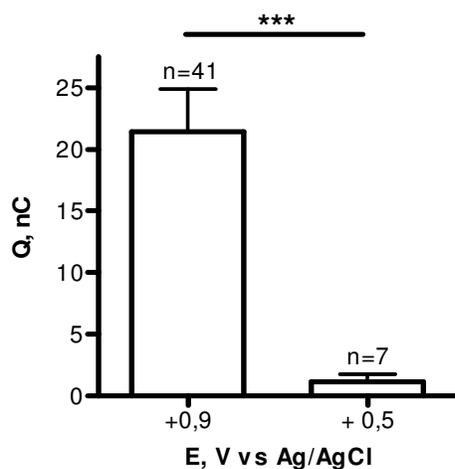


Figura 4.12 – Comparação entre os valores de carga total calculados para registos efectuados a um potencial de oxidação de +0,9 V (n=41) e +0,5 V (n=7) em CA1 (st. Pyr.). *** P<0,001.

Amperometria de Impulso Diferencial

Um controlo instrumental alternativo utilizado com vista à identificação do NO como responsável pela resposta registada em consequência da activação do receptor NMDA foi a amperometria de impulso diferencial. Esta técnica electroanalítica, por ser uma técnica de impulso onde o sinal registado resulta de uma diferença entre dois valores de corrente medidos, permite aumentar a selectividade do registo. Na Fig. 4.13 mostram-se dois registos típicos obtidos por amperometria de impulso diferencial na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo. Inicialmente, estimulou-se o tecido com NMDA de modo a comparar o perfil da resposta com as observadas em amperometria. Utilizando esta técnica, os valores de $T_{80\%}$ e constante de tempo do decaimento calculados para os sinais obtidos em CA1 em resposta à estimulação local com NMDA foram 48 ± 5 s ($n=6$) e 249 ± 43 s ($n=5$) respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa comparativamente aos obtidos por amperometria.

Para confirmar a selectividade desta técnica, adicionou-se ao meio de perfusão DA, 5-HT e ascorbato $10 \mu\text{M}$ (Fig. 4.13A) e não se observou qualquer alteração do sinal registado. Na Fig. 4.13B mostra-se a relação entre a amplitude de resposta a uma estimulação com NMDA e a adição ao meio de perfusão de NO_2^- $20 \mu\text{M}$ e NO 200 nM . A concentração máxima de NO atingida em resposta à estimulação com NMDA foi de aproximadamente 750 nM , semelhante ao obtido nos registos amperométricos ($[\text{NO}] \approx 620 \text{ nM}$)

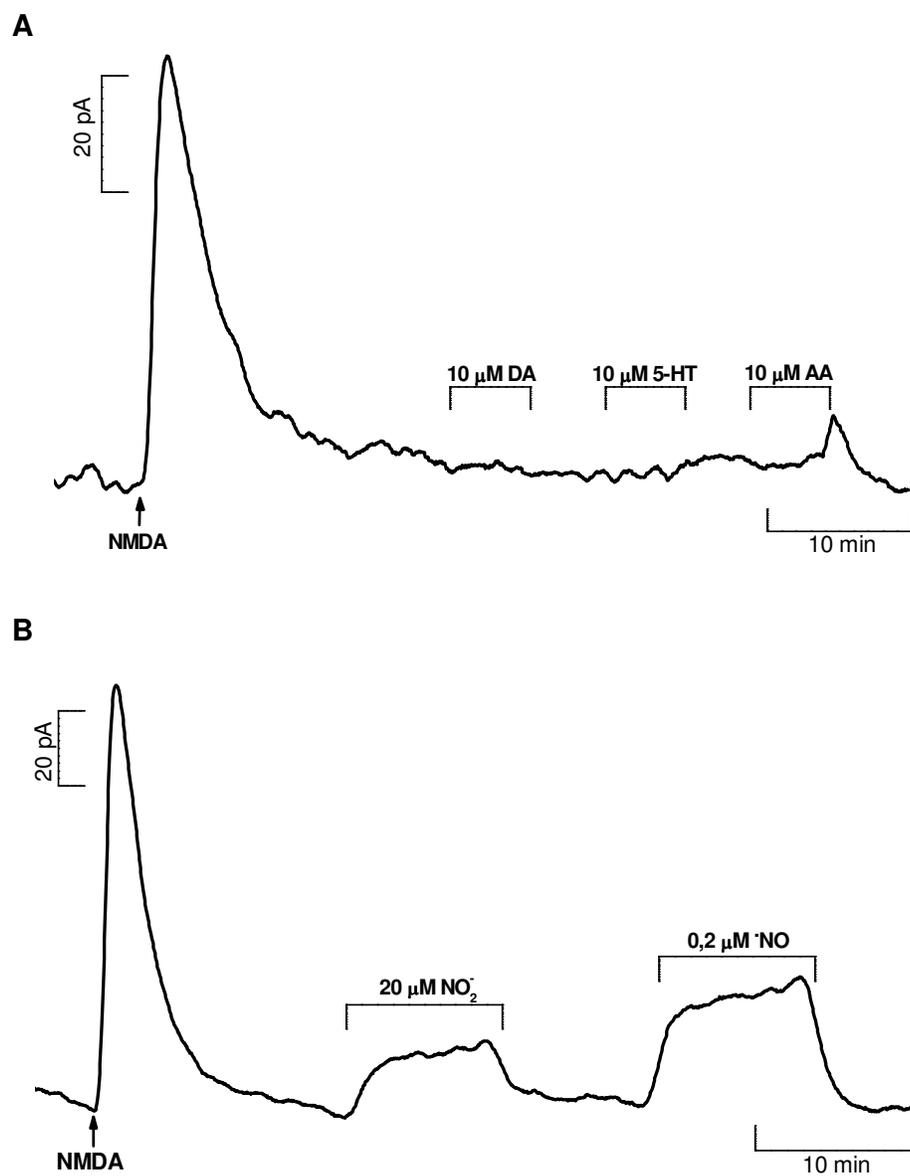


Figura 4.13 – Registos de amperometria de impulso diferencial obtidos em CA1 (st. Pyr.). A) Após estimulação do tecido com NMDA, adicionou-se ao meio de perfusão DA, 5-HT e ascorbato à concentração de 10 μM. B) Após aplicação de NMDA, adicionou-se ao meio de perfusão NO₂⁻ 20 μM e NO 200 nM.

4.2.3.2. Fisiológica

Outra forma de verificação da natureza química do sinal amperométrico registado é a verificação fisiológica, que consiste em induzir uma variação na concentração do analito em resposta a um estímulo fisiológico conhecido (Phillips e Wightman, 2003). O substrato endógeno da NOS é a L-arg. Assim, desenharam-se experiências de verificação fisiológica onde o meio de perfusão foi suplementado com L-arg de modo a comprovar a potenciação da resposta. Como se pode observar na Fig. 4.14, a aplicação L-arg 0,5 mM induziu um aumento da concentração de NO na subregião CA1 da fatia de hipocampo (n=4)..

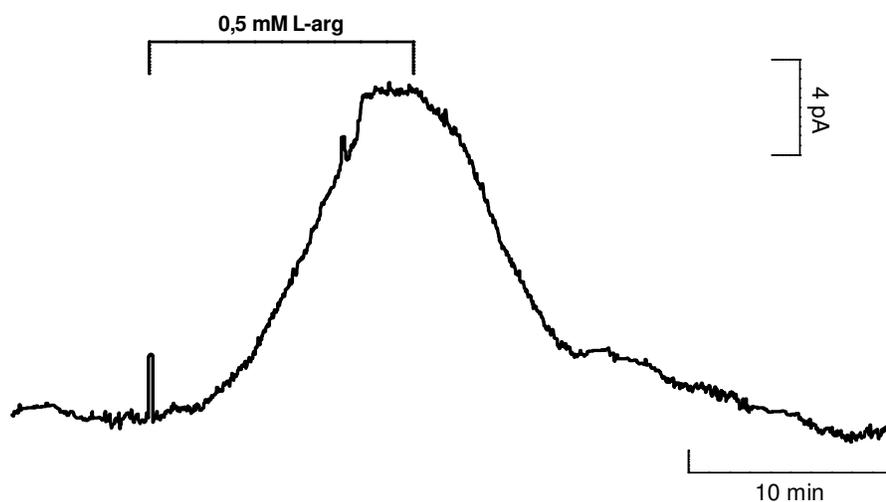


Figura 4.14 – Registo amperométrico típico obtido em CA1 (st. Pyr) da fatia de hipocampo de rato estimulada com L-arg (0,5 mM) em perfusão.

Sendo a L-arg o substrato da enzima NOS, a sua adição ao meio de perfusão deve resultar na potenciação do sinal amperométrico de oxidação de NO , servindo tal para validar a natureza do sinal. Na fig. 4.15 mostra-se um registo típico onde se adicionou L-arg 100 μM ao meio de perfusão após uma primeira resposta à estimulação local do tecido com NMDA. Na presença de L-arg estimulou-se o tecido duas vezes sucessivas com intervalo de 20 minutos.

A adição de L-arg resultou numa potenciação do segundo sinal relativamente ao primeiro (na ausência de substrato) de $211 \pm 19\%$ ($n=3$) (analisado em termos de carga total do sinal). Para dois estímulos sucessivos na presença do substrato observou-se um decaimento da carga total do sinal. A razão Q2/Q1 na presença de L-arg foi $0,29 \pm 0,04$ ($n=3$), valor semelhante ao calculado para a subregião CA1 na ausência de L-arg ($0,44 \pm 0,06$, $n=28$), indicando que a depleção do substrato não explica o decaimento na produção de NO observada para estimulações sucessivas do tecido com NMDA.

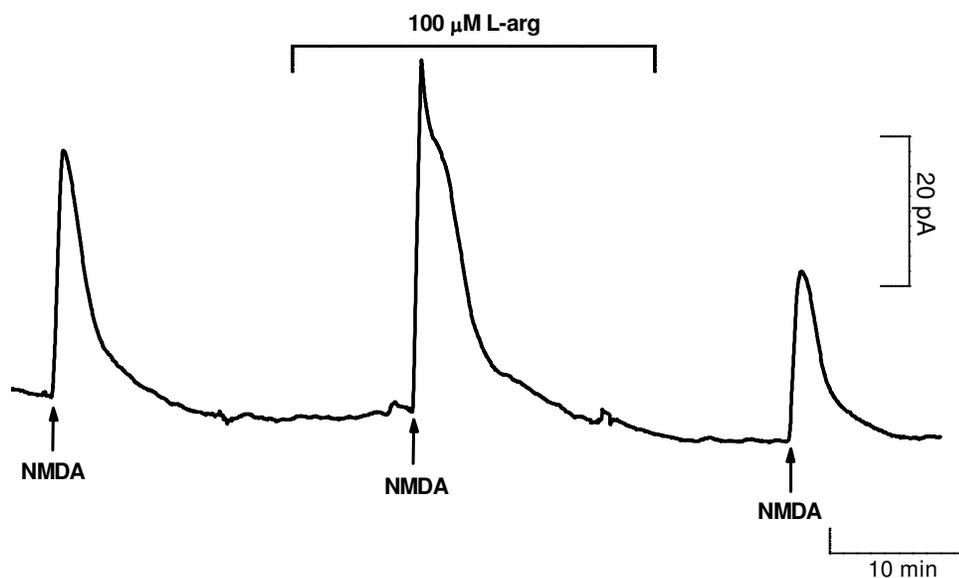


Figura 4.15 – Registo amperométrico obtido em CA1 ilustrativo do efeito da suplementação do meio de perfusão com o substrato da NOS, L-arg (0,1 mM).

4.2.3.3. Farmacológica

Por fim, o sinal deve variar de modo previsível a uma acção farmacológica conhecida, como a perda ou diminuição de resposta por aplicação de inibidores (Phillips e Wightman, 2003). Realizaram-se duas verificações farmacológicas: inibição da NOS e do receptor NMDA. Em ambos os casos realizaram-se estimulações localizadas sucessivas na subregião CA1, sendo o inibidor aplicado antes do segundo sinal. Analisou-se a razão Q2/Q1, sendo o mesmo comparado com o valor calculado a partir das experiências realizadas na ausência de inibidor em CA1. A obtenção de uma primeira resposta na ausência de inibidor permitiu obter um controlo interno positivo da experiência.

Inibição da Enzima NOS

A inibição da NOS permitiu comprovar a dependência da síntese de NO sobre a actividade da enzima, pondo de parte a hipótese de ocorrer síntese por via não enzimática e confirmando a dependência do sinal relativamente à actividade da NOS. Utilizou-se o inibidor competitivo L-NNA, que apresenta maior afinidade pela isoforma NOS I. A Fig. 4.16 mostra um registo típico obtida na subregião CA1 em resposta à estimulação localizada com NMDA documentando o efeito de L-NNA adicionado ao meio de perfusão após se observar uma primeira resposta. A adição de L-NNA resultou numa inibição da resposta à segunda estimulação. Na presença do inibidor a razão Q2/Q1 foi $0,09 \pm 0,04$ (n=3), significativamente menor que o valor calculado para CA1 na ausência de inibição ($P < 0,05$).

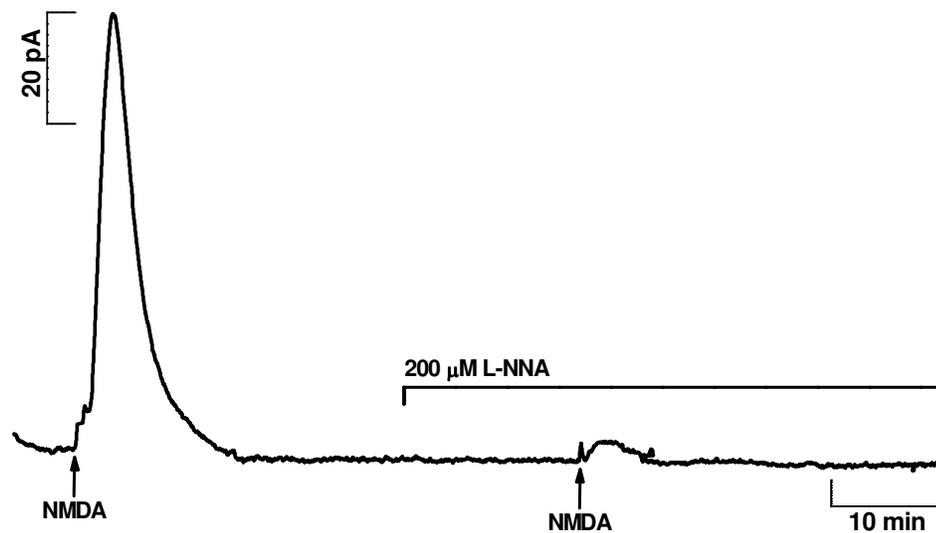


Figura 4.16 – Registro ilustrativo do efeito do inibidor competitivo da NOS L-NNA (200 μ M) numa fatia estimulada com NMDA.

Inibição do Receptor NMDA

Para confirmar a especificidade do estímulo NMDA, realizaram-se ensaios com um inibidor competitivo do receptor NMDA, D-AP5. Utilizou-se um protocolo sanduíche: após resposta positiva a uma primeira estimulação com NMDA, aplicou-se D-AP5 e uma nova estimulação e, após lavagem do inibidor, uma última estimulação. Na Fig. 4.17 mostra-se um registro típico de inibição do receptor NMDA, realizado na subregião CA1. Observou-se uma marcada inibição do sinal na presença do inibidor D-AP5: a razão $Q2/Q1$ foi de $0,04 \pm 0,02$ ($n=3$), significativamente menor que na ausência de inibidor ($P<0,001$). Por outro lado e de acordo com o descrito para este inibidor, após lavagem do mesmo observou-se uma recuperação da resposta.

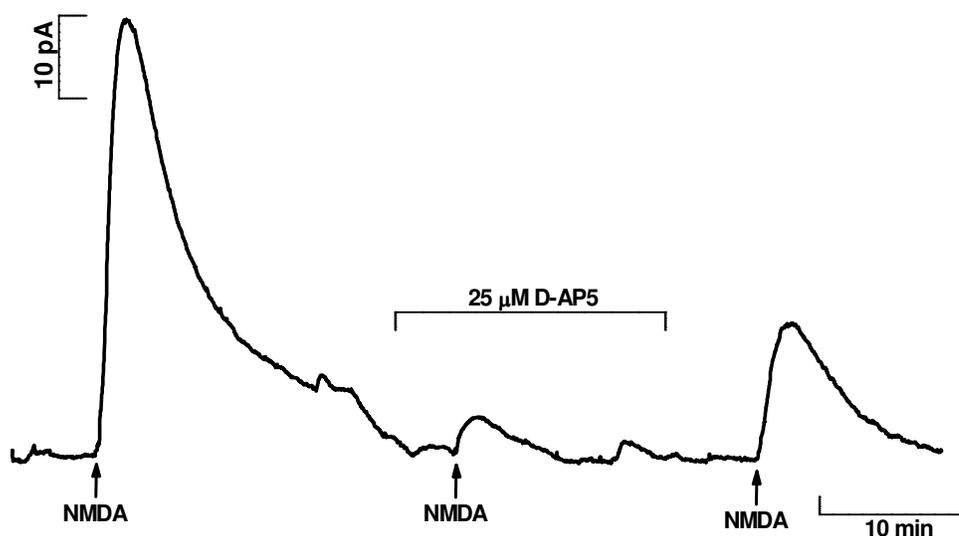


Figura 4.17 – Registro típico da corrente de oxidação na região CA1 (st. Pyr.) numa fatia tratada com D-AP5, um inibidor competitivo dos receptores NMDA.

Em resumo, o conjunto de resultados apresentados permite afirmar que a estimulação da fatia de hipocampo com NMDA resultou na síntese de NO . Os ensaios de verificação electroquímica demonstraram que a dopamina, o ascorbato ou o 5-HT não contribuíram para a corrente amperométrica registada a um potencial de oxidação de + 0,9 V vs Ag/AgCl utilizando os MFC-NO. Os ensaios de verificação fisiológica e farmacológica reforçaram esta constatação dado que se observou potenciação do sinal registado por aplicação do substrato natural da enzima responsável pela síntese do radical e inibição da resposta na presença de inibidores da NOS e do receptor NMDA. Assim pode afirmar-se que a estimulação da fatia de hipocampo de rato com NMDA resulta na síntese neuronal de NO por activação da via específica receptor NMDA-NOS I.

4.3. Discussão

Neste capítulo apresentou-se uma análise quantitativa da dinâmica de concentração de ^1NO resultante da activação do receptor NMDA em fatias de hipocampo, ou seja, num modelo biológico que preserva não só a citoarquitectura como o circuito neuronal tri-sináptico intactos, e para uma pressão parcial de O_2 fisiológica.

Os resultados mais relevantes deste capítulo resumem-se da seguinte forma: i) no centro do tecido, a 200 μm de profundidade onde se realizaram as medidas da dinâmica de concentração de ^1NO , pO_2 está dentro de um intervalo considerado fisiológico para o SNC de roedores; ii) para as mesmas condições de estimulação localizada, a produção de ^1NO é heterogénea nas subregiões do hipocampo (CA1, CA3 e DG); iii) o raio de difusão do ^1NO produzido endogenamente em resposta a um estímulo localizado de NMDA (sendo o raio de difusão do estímulo inferior a 100 μm) é de pelo menos 400 μm ; iv) independentemente do modo como é feita a estimulação com NMDA – transitória (localizada ou em perfusão) ou contínua (em perfusão) – a produção de ^1NO é sempre transitória e não é atingida a concentração micromolar supostamente associada a fenómenos patológicos; v) o decaimento do sinal não parece ser causado, pelo menos na totalidade, por inibição retroactiva do receptor NMDA ou da NOS, contrariando assim uma noção frequentemente referida na literatura.

4.3.1. Perfil de Oxigénio ao Longo da Profundidade da Fatia de Hipocampo

Uma questão pertinente abordada neste capítulo prendeu-se com a determinação de pO_2 no interior da fatia de hipocampo, mais propriamente, à profundidade a que se efectuaram as medidas da dinâmica de concentração de ^1NO utilizando MFC-NO (200-300 μm). O facto de as fatias serem perfundidas com soluções com pO_2 a 750 torr, um valor pelo menos uma ordem de grandeza superior ao encontrado fisiologicamente, poderia levar a

que no tecido a concentração de O_2 fosse também muito elevada. Considerando a reactividade do *NO com O_2 , uma pressão parcial anormalmente elevada do último poderia modular a dinâmica de concentração do *NO e comprometer a previsão dos resultados para o *in vivo*.

A determinação do perfil de pO_2 ao longo da profundidade da fatia, nas diferentes subregiões revelou dois factos importantes: em primeiro lugar, o valor de pO_2 no centro do tecido está dentro (no caso da subregião CA1) ou próximo (para CA3 e DG) dos valores reportados como sendo fisiológicos para o SNC de roedores (Erecinska e Silver, 2001, Liu *et al.*, 1995, Mulkey *et al.*, 2001, Nair *et al.*, 1987); em segundo, as subregiões do hipocampo parecem ter taxas de consumo de O_2 ligeiramente distintas, o que se reflectiu num valor de pO_2 superior em CA3 e DG relativamente a CA1.

Embora corresponda a 1/50 da massa corporal total, o SNC consome 1/5 do total de O_2 inspirado em humanos e apesar de não haver diferenças significativas entre as taxas de consumo de O_2 quando se comparam células diferentes, na mesma célula podem observar-se grandes variações dependendo do seu estado de actividade. Este exigente requisito de O_2 deve-se à elevada necessidade energética dos processos básicos ou metabolismo vegetativos (e.g., síntese proteica) e específicos do tecido nervoso (manutenção do potencial de membrana, excitose, etc.). Dos processos específicos relacionados com a função do neurónio, destaca-se o funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase, responsável pela manutenção do potencial de membrana, que consome aproximadamente 50 % da energia do SNC (Whittam, 1962, Astrup *et al.*, 1981, Ames *et al.*, 1992). Da energia que não é utilizada no metabolismo vegetativo e funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase, 40 % é gasta em processos de transporte activo (Erecinska e Silver, 1989), na síntese, armazenamento, libertação e remoção de neurotransmissores e ainda na manutenção de vias de sinalização secundárias, nomeadamente proteína cinases.

É esta exigência energética do tecido nervoso que permite explicar que a fatia de hipocampo de rato, embora perfundida em meio com pO_2 de 750 torr,

apresente um valor próximo do fisiológico na camada central de células. É necessário ter presente que a distância média entre dois capilares é de aproximadamente 50 μm e que numa fatia com 400 μm de espessura não existe circulação sanguínea.

O perfil heterogénio encontrado ao longo do eixo trisináptico do hipocampo aponta para uma velocidade de consumo diferencial nas subregiões e, embora existam cerca de cem enzimas consumidoras de O_2 identificadas no tecido de mamíferos (Vanderkooi *et al.*, 1991), a hipótese que salta à vista é a possibilidade de haver uma taxa de consumo de O_2 ao nível da cadeira respiratória diferente, reflectindo velocidades metabólicas distintas em cada subregião.

4.3.2. Estimulação por Perfusão: Glutamato vs N-Metil-D-Aspartato

Os receptores NMDA desempenham um papel importante na regulação de transmissão sináptica rápida e fenómenos de plasticidade sináptica (Dingledine *et al.*, 1999). A activação destes receptores provoca uma elevação significativa da concentração intracelular de Ca^{2+} , que, uma vez ligado à CaM, activa a síntese de NO pela NOS I (Garthwaite *et al.*, 1989). Enzima e receptor encontram-se física e funcionalmente acoplados na densidade pós-sináptica por intermédio de interacções proteína-proteína que ambos estabelecem com a PSD-95 (Christopherson *et al.*, 1999). Deste modo, e embora se tenha observado síntese neuronal de NO associada a outros receptores, a activação do receptor NMDA constitui a principal via de produção de NO no SNC.

Assim, o principal objectivo deste capítulo foi medir a dinâmica de concentração de NO na fatia de hipocampo de rato em resposta à activação do receptor NMDA. Numa primeira aproximação, as fatias foram estimuladas com o agonista endógeno do receptor, o L-glu. Contudo, este revelou ser um estímulo pouco potente quando comparado com o agonista artificial e específico, o NMDA. Muito embora a concentração de L-glu que se estime ser

atingida na fenda sináptica seja de 1 mM (Clements, 1996, Clements *et al.*, 1992, Nicholls e Attwell, 1990), para essa mesma concentração de estímulo a relação sinal/ruído dos registos foi má, com um melhoramento significativo observado para uma concentração de 5 mM.

O tempo de vida do L-glu no espaço extracelular é limitado pela actividade de transportadores activos que o removem rapidamente do espaço extracelular, evitando assim a estimulação excessiva de receptores do glutamato e a degeneração excitotóxica. Como estas proteínas abundam junto das sinapses, competem efectivamente pela ligação ao neurotransmissor, modulando assim a concentração a que os receptores são expostos (Revisto em Huang e Bergles, 2004). A remoção de L-glu do espaço extracelular é realizada principalmente por astrócitos, que expressam os transportadores EAAT1 e EAAT2, mas também por neurónios, que expressam transportadores do tipo EAAT3, EAAT4 e EAAT5 (revisto em Beart e O'Shea, 2007). A actividade destes transportadores aliado ao facto de não reconhecerem NMDA (Garthwaite, 1985) explica a maior potência deste último na estimulação da produção de NO da fatia de hipocampo.

Por outro lado, a utilização de NMDA permitiu isolar, tornando selectiva, a via de produção de NO , uma vez que gás pode também ser produzido em resposta à activação de receptores do glutamato não-NMDA e metabotrópicos (Bhardwaj *et al.*, 1997, Okada, 1992, Radenovic e Selakovic, 2005).

Tal como para o L-glu, observou-se que uma estimulação transitória (perfusão durante 2 minutos) da fatia de hipocampo com NMDA a diferentes concentrações produziu um aumento transitório da concentração de NO no espaço extracelular da subregião CA1 (st. Pyr.). A análise dos vários registos obtidos permitiram construir uma curva dose-resposta a partir da qual se calculou o valor de EC_{50} de 23,8 μM . Este valor está em concordância com outros reportados na literatura onde se estudou esta mesma via quantificando cGMP em fatias de cerebelo e de hipocampo (East e Garthwaite, 1990, Garthwaite, 1985).

Enquanto que para uma estimulação transitória seria de esperar uma resposta também transitória, observou-se que a produção de NO foi igualmente transitória para uma estimulação contínua com NMDA.

A dinâmica de concentração de NO resulta sempre do balanço entre as velocidades de síntese e de remoção. A síntese de NO está dependente da concentração de Ca^{2+} no interior da célula (por sua vez dependente não só da abertura do receptor NMDA como também de mecanismos de remoção) bem como da actividade da NOS. A diminuição da concentração de NO para valores basais será o resultado combinado da lavagem do estímulo (L-glu ou NMDA) e do NO , diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e a inactivação da NOS por reversão da ligação do complexo Ca^{2+} -CaM, reacção do radical com vários alvos, para além de possíveis mecanismos de inibição.

A aceleração do decaimento do sinal na presença do inibidor competitivo do receptor de certa forma não corrobora anteriores observações que apontaram para mecanismos de retroacção negativa tanto do receptor NMDA (Lei *et al.*, 1992, Manzoni e Bockaert, 1993, Choi *et al.*, 2000) como da própria NOS (Griscavage *et al.*, 1995). É possível que a concentração de NO não seja suficiente para se observarem estes mecanismos de inibição ou que apenas uma fracção da população de receptores e/ou enzimas seja inibida nestas condições particulares.

A síntese de NO é um processo altamente regulado, mas a sua remoção é, talvez erradamente, considerado um fenómeno não finamente regulado, dependente principalmente da disponibilidade local de alvos moleculares com os quais o radical reaja. Contudo, os resultados aqui apresentados parecem apontar para a existência de um mecanismo específico que impede que a concentração de NO atinja valores em estado estacionário elevados durante longos períodos de tempo.

Os resultados anteriores adquirem grande relevância se considerarmos uma pergunta recorrente entre a comunidade científica sobre a bioactividade do NO . Existirá um dreno molecular para o NO (*NO sink*)? É relativamente consensual que a reacção do radical com a oxi-hemogloblina participa na

remoção do $\cdot\text{NO}$ (Lancaster, 1994). Por outro lado, também é necessário considerar a auto-oxidação do $\cdot\text{NO}$. Embora esta reacção ocorra a uma velocidade lenta para as concentrações baixas de ambos os reagentes em solução aquosa, o facto de tanto o $\cdot\text{NO}$ como o O_2 serem hidrofóbicos e se acumulam em membranas biológicas contribui para acelerar esta reacção no microambiente lipídico (Liu *et al.*, 1998). Outros candidatos à reacção e remoção do $\cdot\text{NO}$ incluem, e conforme descrito na introdução, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e outros radicais.

Num trabalho recente, determinou-se a velocidade de inactivação de $\cdot\text{NO}$ em fatias de cerebelo de rato. Aplicando $\cdot\text{NO}$ exogenamente por adição de um dador de $\cdot\text{NO}$, ou autores determinaram que o tecido consome o radical num mecanismo independente de hemoglobina, radicais peróxido lipídicos, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou prostaglandina H sintase, lipoxigenases ou flavohemoproteínas. Recorrendo a modelos matemáticos estimaram a velocidade máxima de inactivação de $\cdot\text{NO}$ no tecido em $2 \mu\text{M/s}$, com um K_m de 1-10 nM. Note-se, porém, que os autores não mediram directamente o radical no tecido, mas antes os níveis de cGMP. (Hall e Garthwaite, 2006).

4.3.3. Estimulação Localizada

A estimulação localizada restringe o raio de acção do estímulo, limitando assim a difusão de $\cdot\text{NO}$ de outros pontos da fatia até ao local de inserção do MFC- $\cdot\text{NO}$. O protocolo de estimulação localizada permitiu abordar duas questões importantes no que respeita à dinâmica de concentração de $\cdot\text{NO}$ no hipocampo:

- 1) Haverá heterogeneidade na produção de $\cdot\text{NO}$ por activação do receptor NMDA entre as subregiões do hipocampo?;
- 2) Qual o padrão de difusão de $\cdot\text{NO}$ produzido endogenamente por activação do receptor NMDA?

4.3.3.1. Dinâmica de concentração de Óxido Nítrico nas Subregiões do Hipocampo de Rato

Apresentou-se neste trabalho, pela primeira vez, o perfil de síntese e remoção de NO ao longo do eixo trisináptico do hipocampo para a activação do receptor NMDA. Observou-se uma marcada diferença na produção de NO entre as subregiões da fatia de hipocampo para a mesma condição de estimulação. A subregião CA1 foi aquela onde se observou uma produção mais significativa do radical.

Em 2005, Takata *et al.*, utilizando uma tecnologia diferente da utilizada aqui, observaram uma heterogeneidade semelhante. Utilizando uma sonda fluorescente considerada específica para NO (DAR-4M) seguiram o aumento da intensidade de fluorescência nas diferentes subregiões em resposta à aplicação de NMDA (1mM) ao meio de perfusão e observaram que em CA1 (st. Pyr.) a resposta era cerca de duas vezes superior à observada em CA3 (st. Pyr.) ou DG (st. Gran.). Mediram também a variação da concentração intracelular de Ca^{2+} para condições idênticas e constataram que, embora em CA3 a variação fosse menor, em CA1 e DG os aumentos de Ca^{2+} eram similares, não podendo um menor influxo deste catião explicar a heterogeneidade observada (Takata *et al.*, 2005). Contudo, este trabalho não permitiu, avaliar a cinética de decaimento da concentração de NO e a resposta do tecido para estimulações sucessivas.

Na sequência da dinâmica de concentração observada, é importante discutir como é que estas observações se integram com o que se conhece sobre diferenças na fisiologia e patologia das subregiões do hipocampo.

No hipocampo encontram-se as três isoformas de NOS: NOS I principalmente nos neurónios (principais e interneurónios), embora também já tenha sido documentado em células da glia; NOS III nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e NOS II em células da microglia activadas. Não existem diferenças relativamente à actividade total de NOS entre as subregiões, mas a isoforma NOS I tem maior expressão superior em CA1 (Liu *et al.*, 2003). No

que respeita ao receptor NMDA é também em CA1 que se encontra maior nível de expressão, em particular ao nível da camada piramidal (Monaghan e Cotman, 1985, Meoni *et al.*, 1998). Portanto, os padrões de expressão do receptor e da enzima envolvidos na síntese neuronal de $\cdot\text{NO}$ suportam a observação de uma maior produção de $\cdot\text{NO}$ na subregião CA1 do hipocampo.

Por outro lado, também o conhecimento sobre a fisiologia e a patologia desta estrutura do SNC suportam a heterogeneidade observada. De facto, a subregião CA1, em conjunto com o DG, e contrariamente à subregião CA3, apresentam uma forma de LTP dependente do receptor NMDA (Bliss e Collingridge, 1993, Nicoll e Malenka, 1995) tendo outros estudos revelado que em CA1 o $\cdot\text{NO}$ produzido em resposta à activação do receptor é um elemento chave enquanto mensageiro retrógrado neste fenómeno neuromolecular (Arancio *et al.*, 1996, O'Dell *et al.*, 1991, Schuman e Madison, 1991). Por outro lado, é na subregião CA1 do hipocampo que se observa maior perda neuronal tanto nos processos associados a stresse oxidativo como no envelhecimento (Driscoll *et al.*, 2003), na Doença de Alzheimer (West *et al.* 2004) e em episódios de isquémia/reperfusão (Pulsinelli *et al.* 1982).

Neste trabalho também se determinou a concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ alcançada em cada subregião, um parâmetro raramente abordado na literatura, em consequência das já mencionadas dificuldades em medir a concentração efectiva do radical. Os resultados mostram que para a subregião CA1 a concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ alcançada em resposta à estimulação localizada do tecido com NMDA é de cerca de 650 nM, enquanto que para as restantes subregiões se encontra abaixo de 100 nM. Num outro trabalho onde a produção de $\cdot\text{NO}$ dependente do receptor NMDA foi estudada em fatias de hipocampo de rato utilizando a sonda fluorescente DAR-4M, os autores reportam uma concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ de 4,2 nM na subregião CA1. Contudo, os autores partiram de algumas assunções no cálculo da concentração de $\cdot\text{NO}$ apartir das variações de intensidade de fluorescência observadas, nomeadamente que a velocidade de reacção da sonda com $\cdot\text{NO}$ é de ~20 % (com base em determinações realizadas em solução aquosa), que a

sonda tem uma distribuição uniforme em toda a fatia (o que é pouco provável considerando a heterogeneidade da população celular) e que se pode negligenciar a fluorescência de fundo. Assim, é possível que a concentração do $\cdot\text{NO}$ tenha sido subavaliada, aliás como os próprios autores admitem (Takata *et al.*, 2005).

Finalmente, e em relação com o exíguo número de trabalhos onde a concentração real de $\cdot\text{NO}$ produzido endogenamente foi medido, a concentração mais elevada observada neste trabalho para a produção de $\cdot\text{NO}$ dependente do receptor NMDA aponta para uma bioactividade directa do radical no sistema biológico.

4.3.3.2. Difusão do Óxido Nítrico Produzido Endogenamente em CA1

A difusão intercelular associado ao facto de o $\cdot\text{NO}$ interagir com os seus alvos por reacções químicas (ligações covantes) determinam, em grande medida, a natureza peculiar do $\cdot\text{NO}$ enquanto mensageiro no cérebro (Lancaster, 1997).

O $\cdot\text{NO}$ é uma molécula sem carga e a sua solubilidade em fases hidrofóbicas biológicas é cerca de 3-4 superior à observada em água (Moller *et al.*, 2005). Deste modo, este mensageiro não requer mecanismos de transporte através da membrana celular e difunde isotropicamente no tecido. O seu tempo de vida finito em meios biológicos (provavelmente entre 5 e 15 segundos) reflecte a sua reactividade com espécies de oxigénio (O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, radicais de oxigénio lipídicos) e metais de transição. O seu coeficiente de difusão é elevado – $3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Malinski *et al.*, 1993) – o que significa que para um período de tempo de 4 a 15 segundos o raio de difusão do $\cdot\text{NO}$ varia entre 150 e 300 μm . Analisando a questão do ponto de vista inverso, para um raio celular médio (aproximadamente 10 μm), o tempo que o $\cdot\text{NO}$ demora a sair para o espaço extracelular é de 0,002 – 0,003 s (Lancaster, 1997).

Para a activação de múltiplas fontes de NO num dado volume, prevê-se uma sobreposição entre as esferas de difusão individuais, aumentando a concentração global de NO em cada ponto (Lancaster, 1997). É então possível afirmar que o NO actua maioritariamente como mensageiro parácrino, tanto do ponto de vista das células que não sintetizam NO , como das próprias células produtoras do radical.

Os trabalhos onde se determinou experimentalmente o raio de difusão do NO são poucos. Em 1993, Malinski *et al.* utilizaram microelctrodos de carbono para estudar a difusão de NO desde uma célula endotelial estimulada com bradiquinina até uma célula muscular situada a 100 μm de distância e determinaram que, após 10 a 15 segundos, em ambos os pontos a concentração do radical tinha atingido um estado estacionário, embora a sua concentração fosse um pouco inferior junto da célula muscular. Outros autores demonstraram a difusão de NO entre pares de neurónios distanciados entre si 100 μm em fatias de hipocampo (Schuman e Madison, 1994) e uma difusão de NO a partir de um macrófago activado isolado a uma distância de aproximadamente 175 μm (Leone *et al.*, 1996).

Por outro lado, cálculos efectuados a partir de modelos matemáticos situam o raio de difusão do NO no tecido do SNC em 100 μm , para um ponto isolado de produção por um período de 1 a 10 segundos, o que corresponderia a um volume com aproximadamente dois milhões de sinapses. (Wood e Garthwaite, 1994).

Nas condições utilizadas neste trabalho, determinou-se que o raio de difusão do NO é de pelo menos 400 μm desde o ponto de ejeção do NMDA, o que está próximo dos valores reportados na literatura obtidos experimentalmente e por cálculos. Note-se que, para o caso de determinações experimentais, estes valores estão afectados pelas condições específicas do ensaio, pois o volume de tecido estimulado e consequentemente o número de fontes de NO activadas influenciarão, inevitavelmente, o raio de difusão.

É possível que o raio de bioactividade do NO seja ainda superior, uma vez que para o seu principal alvo molecular, a sGC, são reportados valores de,

EC₅₀ entre 1 e 10 nM (Griffiths *et al.*, 2003, Mo *et al.*, 2004), valores abaixo do limite de detecção dos MFC-NO utilizados para avaliar a concentração de [•]NO.

Para além da sua difusão, o perfil de concentração do [•]NO ao longo do tempo é determinado pela quantidade e pela velocidade da sua produção, o tipo, número e distribuição espacial dos seus alvos moleculares, bem como a velocidade e compartimentalização de algumas reacções químicas.

4.3.3.3. Decaimento da Resposta para Estímulos Sucessivos

Em todas as condições de estimulação observou-se um decaimento da intensidade da resposta para estimulações sucessivas. Como explicar esta diminuição da resposta em termos de produção de [•]NO quando a fatia de hipocampo é estimulada sucessivas vezes com NMDA?

Estudos realizados em neurónios corticais de rato revelaram haver uma perda de intensidade de resposta em termos de aumento intracelular de Ca²⁺ para estímulos repetidos com NMDA (Nakamichi e Yoneda, 2005). Sendo a NOS I dependente da elevação da concentração intracelular de Ca²⁺ esta observação poderá explicar o decaimento da resposta para estimulações sucessivas observadas neste trabalho. Por outro lado, um mecanismo de retroacção negativo dependente de Ca²⁺ também já foi proposto para explicar a perda de actividade do receptor NMDA (Kyrozis *et al.*, 1996). Outros factores a considerar incluem a depleção do substrato, L-arg, inibição ou internalização do receptor e inibição ou deslocalização da NOS.

Na ausência do seu substrato, a NOS fica desacoplada e o O₂ transforma-se no aceitador final de electrões, havendo produção de O₂^{•-}. Então, para baixas concentrações de L-arg ocorre síntese simultânea de [•]NO e O₂^{•-} (Pou *et al.*, 1992) que reagem formando ONOO⁻, o que explicaria a diminuição da intensidade do sinal.

Por outro lado, os neurónios não acumulam nem sintetizam L-arg (Braissant *et al.*, 1999), estando dependentes do transporte a partir de astrócitos onde o aminoácido se acumula (Kharazia *et al.*, 1997). Este

transporte é estimulado, por exemplo, por activação de receptores do glutamato não-NMDA (Watts *et al.*, 2005, Grima *et al.*, 1997).

No sentido de validar a natureza do sinal e compreender se a depleção de substrato estaria na origem do decaimento observado, realizaram-se ensaios onde o meio de perfusão foi suplementado com L-arg. Embora se observasse uma potenciação da resposta relativamente à situação de ausência de substrato adicionado, para estimulações sucessivas na presença de L-arg manteve-se o decaimento observado anteriormente. Portanto, a depleção de L-arg não poderá ser o factor responsável pelo decaimento de sinal.

Assim, outro mecanismo deverá ser responsável por esta regulação. Os resultados da estimulação contínua com NMDA sugerem que durante a fase de decréscimo do sinal, tanto o receptor NMDA como a NOS se encontram activos. No entanto, não se pode pôr de lado a inibição de uma população de receptores ou enzimas. Note-se que a inibição do receptor por S-nitrosilação foi observada para concentrações relativamente elevadas do radical, entre 1 a 5 μM não observadas neste trabalho (Murphy e Bliss, 1999, Murphy *et al.*, 1994).

Pode ainda ocorrer internalização do receptor NMDA, que parece ser inibido pela interacção do receptor com a PSD-95 (Roche *et al.*, 2001). Este fenómeno pode ocorrer num espaço temporal de 10 minutos (Tovar e Westbrook, 2002), mas até à data nenhum estudo determinou a existência de uma relação entre a síntese de NO dependente do receptor NMDA e a internalização do receptor.

A NOS é uma enzima altamente regulada. A NOS I é inibida, por exemplo, por fosforilação pela proteína cinase dependente da Ca^{2+} -CaM II que impede a ligação da Ca^{2+} -CaM à enzima (Komeima *et al.*, 2000). Em neurónios isolados, a activação desta cinase foi observada 15 minutos após a estimulação com L-glu (Rameau *et al.*, 2004). Por outro lado, a NOS pode também sofrer inibição por ligação do NO ao grupo hémico (Griscavage *et al.*, 1995) ou nitrosação de um grupo tiólico (Kurjak *et al.*, 1999).

No seu conjunto, os resultados apontam para a existência de uma regulação fina da produção de $\cdot\text{NO}$. Isto é, a remoção do radical não é um processo ao acaso, resultado apenas ou maioritariamente da sua reacção com hemoglobina; pelo contrário, o tecido nervoso regula a sua resposta de forma a prevenir que a concentração de $\cdot\text{NO}$ atinja valores elevadas por longos períodos de tempo.

4.3.4. Verificação do Sinal Bioanalítico

Tendo por objectivo a verificação do sinal bioanalítico, realizaram-se experiências de verificação electroquímica, fisiológica e farmacológica. Os resultados obtidos convergem para a identificação do $\cdot\text{NO}$ como a espécie electroactiva medida. Os ensaios de verificação electroquímica demonstraram não haver detecção de espécies electroactivas como ascorbato, DA ou 5-HT. Para além da preocupação com a possível detecção de outros neurotransmissores, a interferência pelo ascorbato foi avaliada não só porque este pode atingir concentrações muito elevadas no SNC e, em particular nos neurónios (Rice e Russo-Menna, 1998), mas também porque a sua concentração extracelular pode aumentar transitoriamente, por exemplo, por actividade do trocador ascorbato/glutamato que participa na remoção do neurotransmissor do espaço extracelular durante transmissão sináptica (Rebec e Pierce, 1994).

Os ensaios de verificação farmacológica revelaram a existência de uma dependência directa do sinal não só da activação do receptor NMDA como da NOS, indicando a especificidade do estímulo e da via activada. A potenciação da resposta observada por adição do substrato da enzima NOS, L-arg, ao meio de perfusão, corroborou os resultados anteriores que indicava o $\cdot\text{NO}$ como o bioanalito medido.

Em resumo, estes resultados, em conjunto com os apresentados no Capítulo 3 relativamente à selectividade dos MFC-NO, permitem afirmar que a espécie química responsável pela corrente de oxidação medida em resposta à estimulação da fatia de hipocampo com NMDA foi $\cdot\text{NO}$.

4.4. Conclusões

Apresentou-se, pela primeira vez, uma análise quantitativa e em tempo real da variação da concentração de NO em resposta à estimulação do receptor NMDA num modelo biológico que preserva a neuroarquitettura e para pressões parciais de O_2 fisiológicas.

Os resultados apresentados neste capítulo evidenciam uma heterogeneidade do hipocampo em resposta à estimulação com NMDA analisada em termos de dinâmica de concentração de NO . Na subregião CA1 observou-se uma produção mais acentuada de NO coincidente com um maior consumo de O_2 , o que sugere uma maior velocidade metabólica.

As concentrações de NO observadas nas diferentes subregiões (aproximadamente 650 nM em CA1 e menos de 100 nM em CA3 e DG) sugerem que, para a activação de uma via fisiológica de síntese do radical, o receptor NMDA, a bioactividade do NO se situará na gama de efeitos directos

Para a subregião CA1, determinou-se que esfera de difusão do NO é de 400 μm , o que corrobora valores estimados a partir de modelos matemáticos.

Deve no entanto ressaltar-se que, no sistema nervoso intacto, onde a presença de hemoglobina circulante permite uma remoção mais acelerada do radical, é possível que a esfera de difusão, bem como as concentrações de NO sejam menores.

Por fim, os sinais transitórios observados para uma estimulação contínua, conjuntamente com a diminuição de intensidade das repostas para estimulações sucessivas, apontam para um mecanismo de regulação no hipocampo (ainda desconhecido) que previne que a concentração do gás radical atinja valores elevados por longos períodos de tempo. A identificação de tal mecanismo de remoção de NO terá consequências relevantes do ponto de vista da sua regulação no SNC, com óbvias consequências fisiológicas e farmacológicas.

5.

Interacção entre Óxido Nítrico e Oxigénio no Hipocampo de Rato

5.1. Introdução

No capítulo anterior apresentou-se o estudo da dinâmica de concentração de NO nas diferentes subregiões do hipocampo, tendo-se determinado que a subregião CA1 é aquela onde a síntese de NO em resposta à activação do receptor NMDA é mais acentuada, e que nesta mesma subregião o raio de difusão do gás é de pelo menos 400 μm .

Tal como referido anteriormente, o NO e as RNS inibem a respiração mitocondrial em vários locais: o NO inibe rápida e reversivelmente a cyt c ox; as espécies dele derivadas (por exemplo, o ONOO^-) podem inactivar vários componentes da cadeia respiratória mitocondrial de uma forma mais lenta, não selectiva, mas irreversível (Brown, 2001, Cassina e Radi, 1996).

A inibição reversível da actividade da cyt c ox pelo NO ocorre para baixas concentrações do radical havendo competição com o O_2 pela ligação à enzima (Bayachou *et al.*, 1998, Fan *et al.*, 2000, Gorton *et al.*, 1999). Esta inibição é considerada um mecanismo fisiológico de regulação da respiração mitocondrial (Brown, 2001, Clementi *et al.*, 1998). O ONOO^- , uma molécula com elevada capacidade de oxidação e nitração, inibe os complexos I, II e IV da cadeia transportadora de electrões, a ATPase, a aconitase, a Mn-SOD, a cinase de creatinina, entre outras (Brown, 1999, Cassina e Radi, 1996, Gadelha *et al.*, 1997).

Os estudos que evidenciaram a inibição da cyt c ox por NO foram realizados em sistemas *in vitro* onde a probabilidade de reacção entre NO e O_2 é elevada devido à elevada pressão parcial de O_2 , e que não preservam a citoarquitettura, nomeadamente em mitocôndrias de coração e cérebro, em sinaptossomas e em astrócitos (Bolanos *et al.*, 1994, Brown, 1995, Brown e Cooper, 1994, Cleeter *et al.*, 1994, Schweizer e Richter, 1994). Outros autores revelaram que o NO sintetizado endogenamente por activação de receptores do glutamato pode inibir reversivelmente a síntese de ATP (Almeida e Bolanos, 2001).

Considerando este papel do NO enquanto regulador do consumo celular de O_2 , quer por inibição reversível da cyt c ox quer por inibição irreversível de outros elementos da cadeia transportadora de electrões por RNS (em que a predominância de um ou outro efeito é criticamente determinado pela concentração e duração de exposição a NO), colocou-se a seguinte questão: Será que o NO produzido endogenamente por activação do receptor NMDA pode regular o consumo de O_2 em fatias de hipocampo para pressões parciais de O_2 basais fisiológicas?

Assim, para a subregião CA1 (aquela onde a síntese de NO estimulada por activação do receptor NMDA foi mais intensa), mediu-se a dinâmica de concentração de NO em simultâneo com a variação de pO_2 em resposta a estímulos com NMDA.

5.2. Resultados

5.2.1. *Registo Simultâneo de Óxido Nítrico e Oxigénio na Subregião CA1*

Na subregião CA1 de fatias de hipocampo estimuladas por perfusão com NMDA mediram-se em simultâneo as dinâmicas de concentração de $\cdot\text{NO}$ e de $p\text{O}_2$. Seleccionou-se esta subregião para realizar este estudo por ser aquela onde a produção de $\cdot\text{NO}$ induzida por activação do receptor NMDA é mais elevada e onde o valor basal de $p\text{O}_2$ se encontra mais próximo de valores fisiológicos.

Na Fig. 5.1 mostram-se três registos de $\cdot\text{NO}$ e O_2 obtidos para estimulações com NMDA 10, 50 e 100 μM . Observou-se um aumento da concentração de $\cdot\text{NO}$ a que se seguiu um aumento de $p\text{O}_2$ resultante de uma inibição do consumo de O_2 pelas células da fatia de hipocampo. Apesar do sinal de $\cdot\text{NO}$ ser transitório, o mesmo não se observou em relação a $p\text{O}_2$, que aumentou até atingir valor estacionário mais elevado.

Os registos apresentados sugerem a existência de uma relação directa entre a variação máxima de $p\text{O}_2$ ($\Delta p\text{O}_2$) e a concentração de NMDA. Porém, como é notório no gráfico de barras apresentado na Fig. 5.2A, não há diferença entre os valores médios de ($\Delta p\text{O}_2$) calculados para as diferentes concentrações NMDA.

A estimulação com diferentes concentrações de NMDA teve por objectivo a obtenção de diferentes concentrações de $\cdot\text{NO}$. Como se mostra na Fig. 5.2B, observou-se uma correlação linear positiva entre a concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ e $\Delta p\text{O}_2$, com coeficiente de correlação 0,78, o que suporta a existência de uma relação directa entre os dois parâmetros.

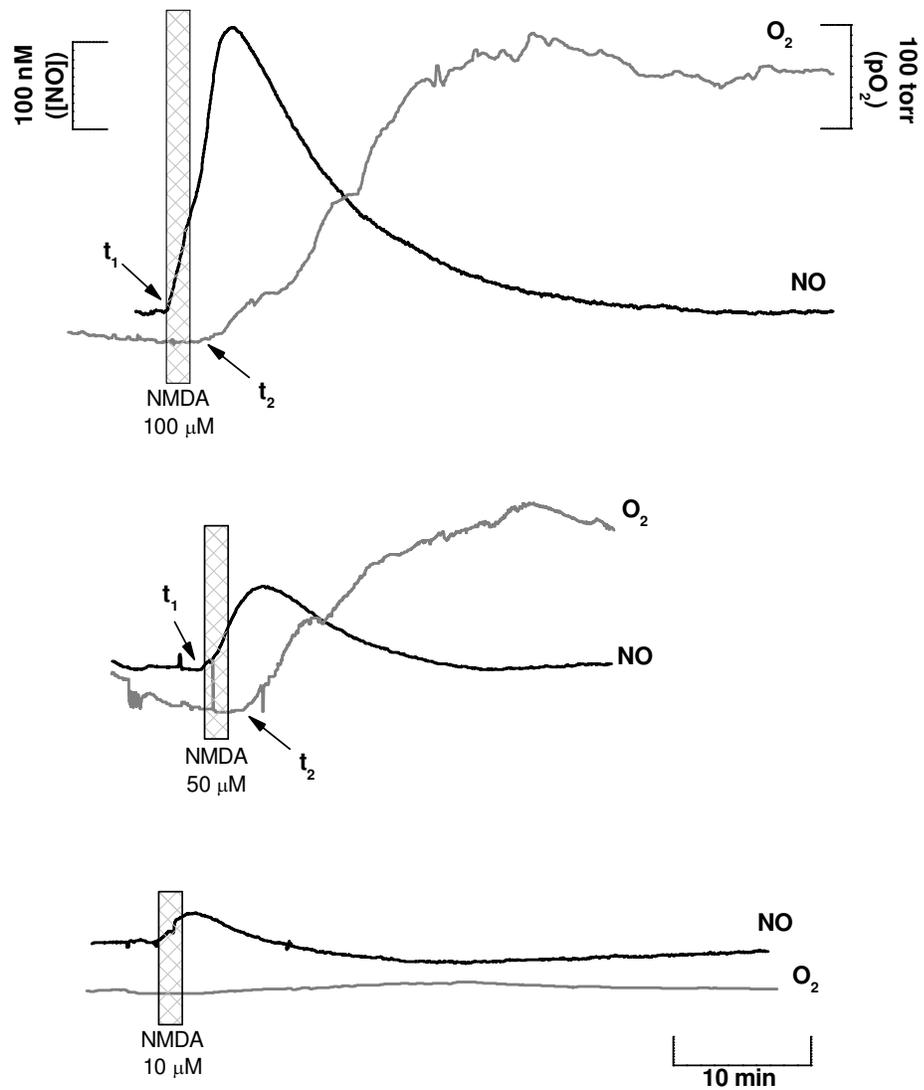


Figura 5.1 – Registos ilustrativos da interacção entre os perfis de NO e O_2 na subregião CA1 do hipocampo em resposta à estimulação com NMDA a diferentes concentrações. A linha preta representa o registo amperométrico para NO e a linha cinzenta o registo amperométrico para pO_2 . Em cada registo, o rectângulo indica a estimulação com NMDA em perfusão (2 min). Nos registos, t_1 aponta o momento de início da resposta de NO e t_2 o início da resposta de O_2 .

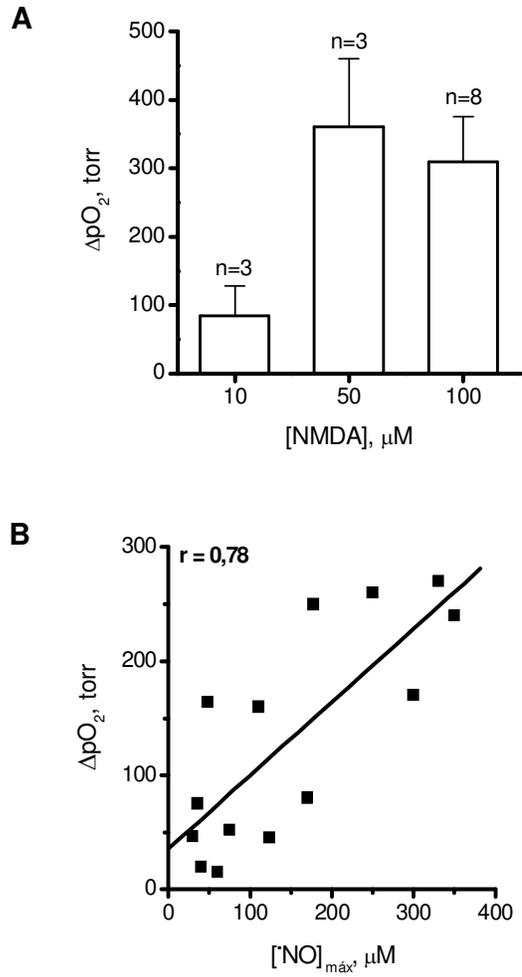


Figura 5.2 – A) Valores médios de $\Delta p\text{O}_2$ para as diferentes concentrações de NMDA (10, 50 e 100 μM) utilizadas para estimular a fatia de hipocampo. B) Gráfico de $\Delta p\text{O}_2$ em função da concentração máxima de NO atingida em cada registo (n=14).

Nos registos simultâneos observou-se também que o aumento da concentração de NO e a elevação de $p\text{O}_2$ não se iniciaram simultaneamente, isto é, observou-se um atraso da resposta de O_2 (t_2) em relação ao início do sinal de NO (t_1). Para cada conjunto de registos simultâneos calculou-se este tempo de atraso (Δt , que corresponde a $t_2 - t_1$, indicados nos registos da Fig. 5.1). Na Fig. 5.3 mostra-se a relação entre este tempo de atraso, Δt , e a velocidade de síntese de NO (traduzida em termos de $T_{80\%}$). Observou-se existir uma correlação positiva entre os dois parâmetros, com coeficiente de correlação $r=0,66$. Este resultado sugere a existência de um limiar de NO que necessário ser alcançado para que se observe aumento de $p\text{O}_2$.

Observou-se que, para sinais de NO menores, o tempo de atraso na resposta de $p\text{O}_2$ era maior. Calculou-se a carga do sinal de NO para o intervalo de tempo entre t_1 e t_2 . O valor médio foi de $4,7 \pm 0,5 \text{ nC}$ ($n=12$).

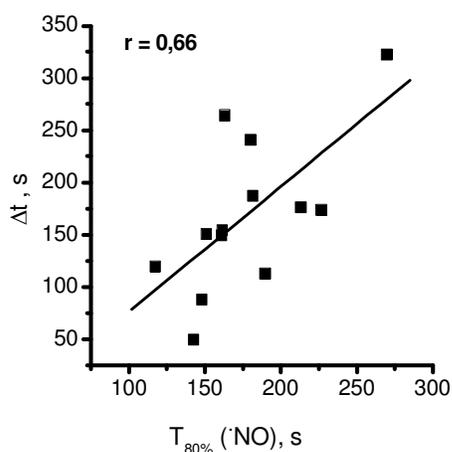


Figura 5.3 – Relação entre o tempo de atraso da resposta de O_2 (Δt) e a velocidade de síntese de NO ($T_{80\%}$).

Para além dos registos simultâneos de $\cdot\text{NO}$ e O_2 típicos apresentados na Fig. 5.1, observaram-se outros efeitos que revelaram pormenores interessantes que justificam a sua apresentação.

Inibição Reversível do Consumo de O_2

Enquanto que na maior parte dos registos se observou um aumento irreversível de $p\text{O}_2$ na subregião CA1 do hipocampo, não havendo regresso ao valor basal no tempo que duraram os ensaios, em casos pontuais (3 em 15 experiências), para variações pequenas da concentração de $\cdot\text{NO}$ (inferiores a 30 nM) observou-se a existência de reversibilidade no perfil de $p\text{O}_2$ (Fig. 5.4). No caso particular do registo aqui apresentado, o sinal de $\cdot\text{NO}$ foi bifásico, com um segundo sinal de menor amplitude que o primeiro e coincidente com a diminuição de $p\text{O}_2$ para um valor basal.

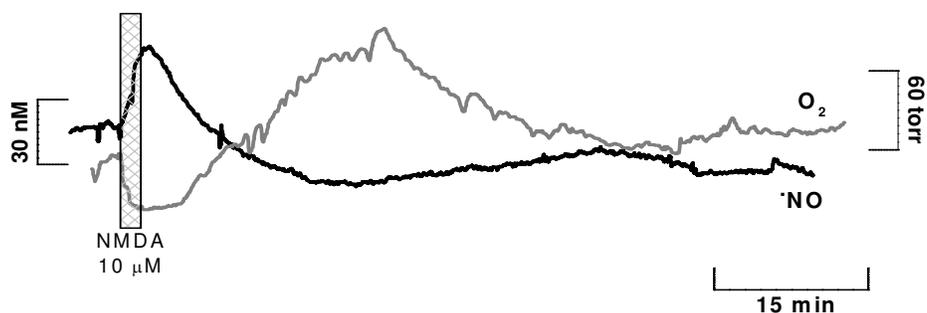


Figura 5.4 – Inibição reversível do consumo de O_2 na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo estimulada com NMDA (10 μM , 2 min).

Consumo de O₂ Induzido por Estimulação do Receptor NMDA

Embora a tendência generalizada observada nos registos simultâneos de $\cdot\text{NO}$ e O₂ em resposta à estimulação do receptor NMDA foi de uma inibição do consumo de O₂, em alguns casos observou-se um aumento do consumo de O₂ logo após a estimulação do tecido a que se seguiu uma inibição (Fig. 5.4 e Fig. 5.5). Observou-se este tipo de comportamento em 5 de um total de 16 registos. Este consumo de O₂ deve-se possivelmente a uma maior exigência energética induzida pela estimulação do receptor NMDA, nomeadamente ao funcionamento de bombas iónicas dependentes de ATP.

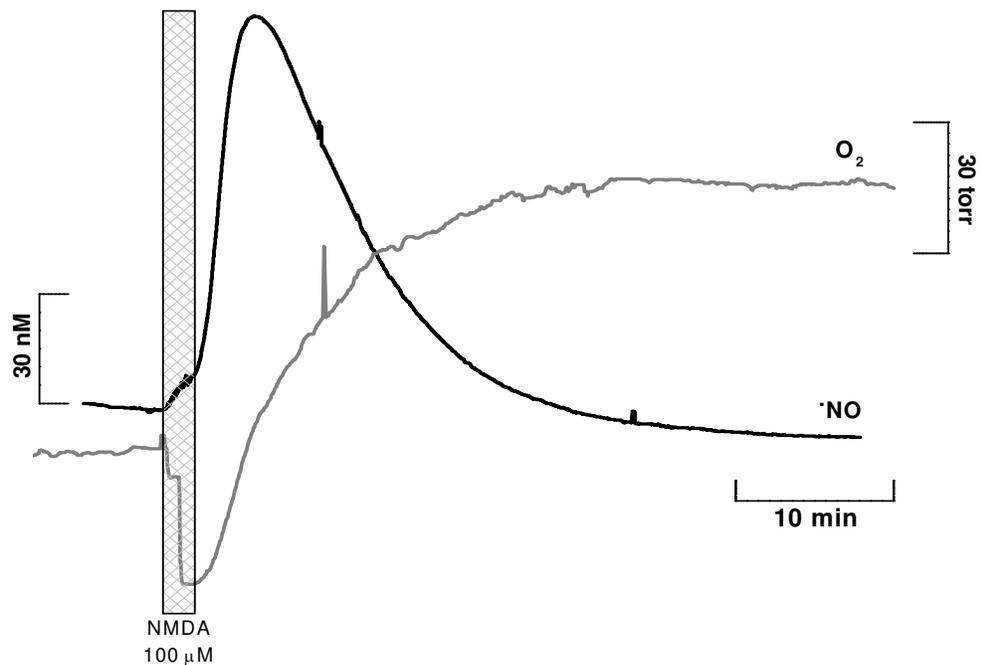


Figura 5.5 – Consumo de O₂ na subregião CA1 (st. Pyr.) induzido pela estimulação do tecido com NMDA (100 μM, 2 min) seguida de uma inibição.

No caso de terem sido aplicados 2 estímulos sucessivos de NMDA (100 μ M, 2 min), observou-se um marcado aumento do consumo de O_2 seguida de uma inibição significativa do seu consumo (Fig. 5.6) em resposta ao segundo estímulo. O aumento do consumo de O_2 ocorreu em simultâneo com a aplicação do estímulo e o desenvolvimento do sinal de *NO na ausência de qualquer tempo de atraso.

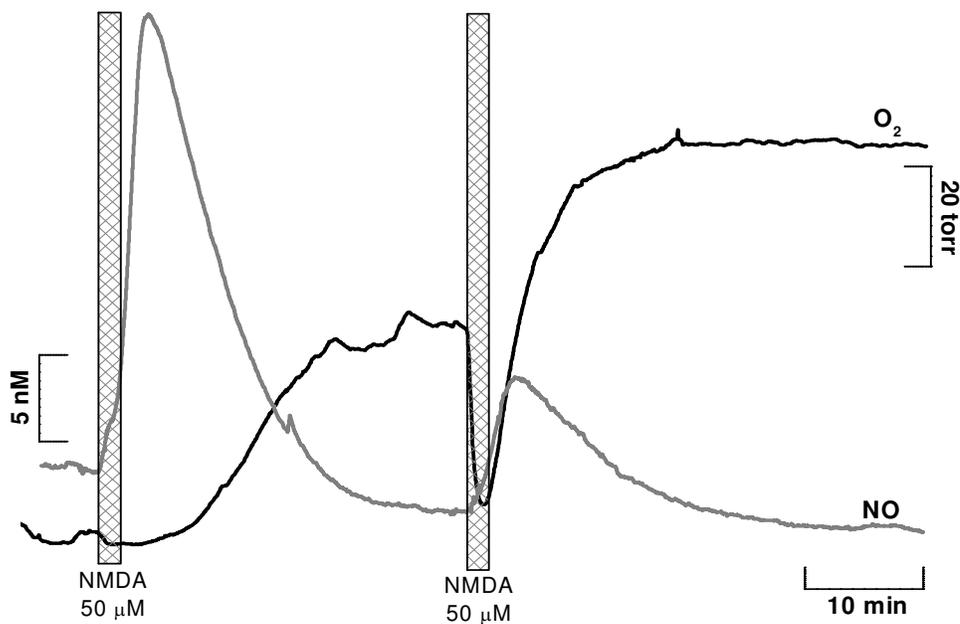


Figura 5.6 – Aplicação de 2 estímulos sucessivos com NMDA (50 μ M, 2 min) intervaladas 30 minutos, ilustrando um aumento do consumo de O_2 seguida de um aumento de pO_2 em ambas as estimulações.

5.2.2. Confirmação do Acoplamento Óxido Nítrico/Oxigênio

Para confirmar o acoplamento entre o aumento de pO_2 e a produção de $\cdot NO$ dependente do receptor NMDA na subregião CA1, realizaram-se experiências onde o Ca^{2+} foi retirado do meio (Fig. 5.7A) ou substituído por bário (Fig. 5.7B). Para ambas as condições experimentais não se registaram correntes de oxidação de $\cdot NO$ nem de redução de O_2 para a estimulação com NMDA. No caso da substituição de Ca^{2+} por Ba^{2+} , para além de não haver nem produção de $\cdot NO$ nem aumento de pO_2 em resposta à estimulação do tecido com NMDA, quando o Ca^{2+} foi reintroduzido no meio de perfusão observou-se um aumento transitório e significativo da concentração de $\cdot NO$ acompanhado pelo aumento de pO_2 sem estimulação do receptor NMDA.

Estes ensaios revelaram que a inibição do consumo de O_2 observada na subregião CA1 da fatia de hipocampo após estimulação com NMDA é dependente de Ca^{2+} extracelular, tal como a síntese de $\cdot NO$.

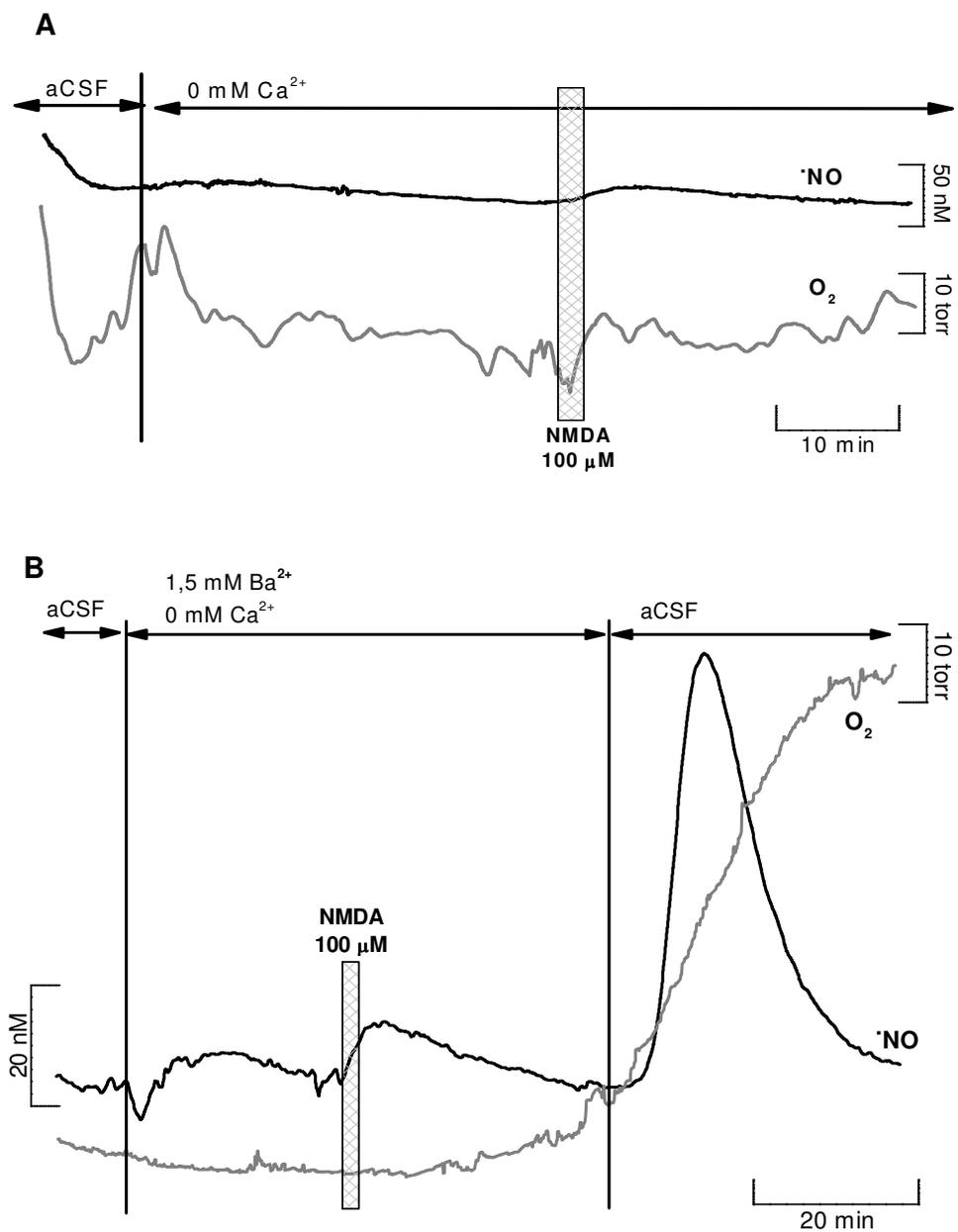


Figura 5.7 – A) Registo simultâneo [•]NO e pO₂ na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo, com estimulação do tecido em perfusão com NMDA (2 min) na ausência de Ca²⁺ no meio de perfusão. B) Substituição da Ca²⁺ por Ba²⁺ no registo simultâneo de [•]NO e pO₂ (em CA1, st. Pyr.) com estimulação do tecido com NMDA (2 min) e reposição de Ca²⁺ no após 20 min de substituição.

Na Fig. 5.8 encontra-se um registo simultâneo de $\cdot\text{NO}$ e pO_2 em CA1 (st. Pyr.) com aplicação de CN^- $50 \mu\text{M}$ ao meio de perfusão. O ensaio com cianeto demonstrou que na presença de um inibidor da cyt c ox, que o pO_2 apresenta um perfil semelhante ao observado para a produção de $\cdot\text{NO}$ dependente de NMDA. Este veneno liga-se à cyt c ox e inibe de forma irreversível a sua actividade, resultando num desacoplamento do fluxo de electrões na cadeia transportadora de electrões e, conseqüentemente, na inibição da respiração celular.

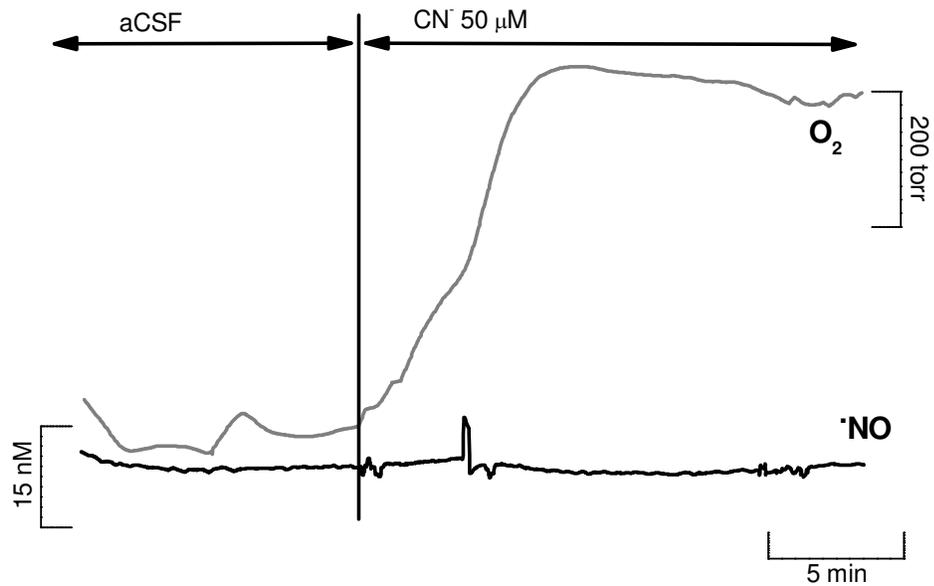


Figura 5.8 – Efeito da aplicação de CN^- ($50 \mu\text{M}$) ao meio de perfusão no perfil basal de $\cdot\text{NO}$ e pO_2 na subregião CA1 (st. Pyr.) da fatia de hipocampo.

5.3. Discussão

Neste capítulo mostrou-se a existência de uma relação entre o $\cdot\text{NO}$ produzido endogenamente por estimulação do receptor NMDA e o consumo de O_2 na subregião CA1 (st. Pyr.). É de salientar que esta observação é aqui apresentada pela primeira vez numa preparação biológica complexa onde não só a citoarquitetura como o circuito neuronal estão preservados, e para um valor de pO_2 basal considerado fisiológico.

Em primeiro lugar, demonstrou-se a existência de uma correlação directa entre a concentração de $\cdot\text{NO}$ produzida e a variação de pO_2 . Por outro lado, a velocidade de aumento de pO_2 mostrou ser dependente da velocidade de síntese do radical. O acoplamento entre os perfis de $\cdot\text{NO}$ e O_2 foi confirmada nos ensaios realizados na ausência de Ca^{2+} .

Deste modo, os resultados apresentados revelaram uma relação directa entre as dinâmicas de concentração dos dois gases, muito provavelmente consequência da inibição da cyt c ox pelo $\cdot\text{NO}$. Esta inibição, uma via de regulação da respiração mitocondrial recentemente proposta, resulta numa diminuição da taxa de consumo de O_2 pelas células, o que se traduz, naturalmente, no aumento de pO_2 na fatia de hipocampo.

É ainda de salientar que, para a janela temporal dos ensaios realizados, e embora esta inibição da cyt c ox pelo $\cdot\text{NO}$ seja caracterizada como reversível, não se recuperou o valor basal de pO_2 , a não ser em alguns registos pontuais onde a concentração de $\cdot\text{NO}$ atingida foi reduzida (cerca de 30 nM).

Nas experiências em que a fatia foi estimulada repetidamente com NMDA observou-se que a inibição do consumo de O_2 após o primeiro estímulo não foi total: após a segunda aplicação de NMDA, e embora o sinal de $\cdot\text{NO}$ produzido fosse menor que o primeiro, pO_2 aumentou novamente até atingir um novo valor estacionário.

As observações anteriores são pertinentes para a discussão do mecanismo responsável pela inibição do consumo de O_2 na subregião CA1 do

hipocampo em consequência da activação do receptor NMDA (que por sua vez resulta num aumento transitório da concentração de NO).

Em condições fisiológicas, cerca de 98 % do O_2 que chega às células é consumido pela mitocôndria ao nível da cyt c ox. Deste modo, o aumento de O_2 observado da subregião CA1 após estimulação do tecido com NMDA resulta muito provavelmente de uma inibição do consumo de O_2 ao nível da cadeia transportadora de electrões.

A cadeia transportadora de electrões da mitocôndria recebe equivalentes redutores fornecidos pelos substratos NADH e FADH_2 que são transferidos entre os complexos da cadeia até reduzir O_2 na cyt c ox. É simultaneamente gerado um potencial transmembranar utilizado pela ATPase na síntese ATP. Os principais reguladores da cadeia transportadora de electrões são o ADP, O_2 e o NO (Brown e Borutaite, 2002).

Como já foi anteriormente referido, para concentrações baixas, o NO é pouco reactivo e a maior parte das suas acções resultam da sua reacção com complexos metálicos. Para concentrações mais elevadas, a sua actividade biológica é mediada por RNS que são formadas por reacção do NO com O_2 e O_2^- . Também ao nível da cadeia transportadora de electrões, as acções do NO reflectem esta química biológica, com efeitos directos e indirectos a predominarem de modo dependente da concentração.

A ligação de NO à cyt c ox foi inicialmente descrita em 1963 (Gibson e Greenwood, 1963), mas a capacidade desta ligação resultar na inibição da respiração celular foi demonstrada apenas na década de 1990 em preparações diversas como mitocôndrias, sinaptossomas e culturas de células (Carr e Ferguson, 1990, Cleeter *et al.*, 1994, Brown e Cooper, 1994, Bolanos *et al.*, 1994, Schweizer e Richter, 1994, Clementi *et al.*, 1999, Sarti *et al.*, 1999). Um dos problemas óbvios destes trabalhos foi terem sido realizados a valores de pO_2 elevados. Outros trabalhos realizados em tecidos recorreram ao fornecimento de NO exógeno, isto é, a partir de dadores, tendo chegado à mesma conclusão (Shen *et al.*, 1995, Xie *et al.*, 1996, Zhao *et al.*, 1999).

De qualquer forma, indicaram que a inibição da respiração celular pode ocorrer para baixas concentrações de $\cdot\text{NO}$ ($<1 \mu\text{M}$), corroborando o que se conhece sobre a ligação do $\cdot\text{NO}$ à *cyt c ox*. As constantes de ligação de $\cdot\text{NO}$ e O_2 a esta enzima são similares ($\sim 2 \times 10^8$ e $0,4-1 \times 10^8$ respectivamente), mas, apesar de o O_2 existir numa concentração muito superior à do $\cdot\text{NO}$ (Brunori *et al.*, 2006), o carácter reversível da ligação do $\cdot\text{NO}$ (Sarti *et al.*, 2000) e a constante de inibição favorece a ligação do $\cdot\text{NO}$ em detrimento do O_2 por um factor de aproximadamente 100 (Brown e Cooper, 1994). De facto, em condições aeróbicas é possível observar-se inibição no espaço temporal de segundos (Giuffre *et al.*, 1996).

As concentrações de $\cdot\text{NO}$ observadas neste trabalho para a estimulação NMDA foram da gama das centenas de nanomolar, sendo por isso previsível a ocorrência desta inibição competitiva da *cyt c ox*.

Que impacto tem a regulação da actividade da *cyt c ox* pelo $\cdot\text{NO}$ na fisiologia da célula e do tecido? O resultado mais claro é o aumento da concentração de O_2 disponível, conforme evidenciado nos registos simultâneos de $\cdot\text{NO}$ e O_2 aqui apresentados, designado de hipóxia metabólica, onde o O_2 não utilizado na síntese de energia fica disponível para participar noutras reacções. No caso da microcirculação, a inibição da *cyt c ox* nas células endoteliais aumenta a difusão de O_2 nos tecidos (Thomas *et al.*, 2001, Poderoso *et al.*, 1996, Giulivi, 2003).

Conforme evidenciado na Fig. 1.2, a acumulação de equivalentes redutores na cadeia transportadora de electrões a montante da *cyt c ox* facilita a redução parcial de O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$ que é por sua vez transformado em H_2O_2 por actividade da SOD. Para inibições mais prolongadas ou mais acentuadas, o excesso de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o $\cdot\text{NO}$ reagem entre si para formar ONOO^- (Huie e Padmaja, 1993) e outras RNS que comprometem seriamente o funcionamento da cadeia transportadora de electrões. Esta condição patológica é normalmente designada de nitróxia (Shiva *et al.*, 2005) em que a bioenergética da célula fica comprometida, podendo resultar em morte celular (Brown e Borutaite, 2002, Moncada e Erusalimsky, 2002). Embora a inibição da cadeia transportadora de

electrões estimule a síntese glicolítica de ATP (Almeida e Bolanos, 2001, Almeida *et al.*, 2004), no caso dos neurónios, células dependentes da fosforilação oxidativa para obtenção de energia, a situação reveste-se de particular gravidade.

O facto de não se ter observado um retorno de pO_2 para valores basais poderá indicar que uma fracção das mitocôndrias se encontra inibida irreversivelmente em consequência da formação de ONOO⁻ ou outras RNS. Contudo, a aplicação de estímulos sucessivos refuta de certa forma esta hipótese: em resposta à segunda estimulação com NMDA observou-se um marcado aumento do consumo de O_2 , revelando que as células da fatia de hipocampo ainda se encontram funcionais; após este consumo marcado de O_2 , observou aumento de pO_2 para um novo valor estacionário, superior ao anterior. Por outro lado, as concentrações de [•]NO observadas para a estimulação com NMDA não suportam este tipo de bioactividade do [•]NO, pese embora a falta de comprovação experimental que suporte que a linha que separa efeitos directos de indirectos se situe em 1 μ M.

Para além dos efeitos na bioenergética mitocondrial, a inibição da cyt c ox pelo [•]NO pode representar uma via de sinalização, uma vez que concentrações baixas do gás resultam no aumento transitório da concentração de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (Borutaite e Brown, 2003, Poderoso *et al.*, 1996), moléculas sinalizadoras com alvos intra e extramitocondriais. Em condições fisiológicas, na ausência de inibição da cadeia transportadora de electrões, 1 a 2 % do O_2 é reduzido a $O_2^{\cdot-}$ (Boveris e Cadenas, 1975). Perante uma cadeia transportadora de electrões inibida, fisiológica ou patologicamente, a produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 aumenta várias ordens de grandeza (Turrens *et al.* 1982, Freeman e Crapo, 1981, Turrens *et al.*, 1982).

De facto, as ROS/RNS, embora associadas a processos patológicos e danos celulares, desempenham também um papel fundamental em vias de sinalização intracelular e regulação (Droge, 2002). A descoberta, na década de 1970, de que o $O_2^{\cdot-}$, através dos seus derivados OH[•] e H_2O_2 (Mittal e Murad, 1977, White *et al.*, 1976), activa a guanilato ciclase seguida da identificação do

*NO como um importante mensageiro intercelular em variados processos fisiológicos (Ignarro *et al.*, 1987) levou à mudança de paradigma dos Radicais Livres em Biologia: de metabolitos tóxicos a moléculas fisiológicas mensageiros celulares (Droge, 2002). Existe hoje um conjunto de resultados que suportam a teoria de que as ROS/RNS são mediadoras de vias de transdução de sinal em processos fisiológicos e patológicos.

5.4. Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo revelaram uma interação dinâmica entre o $\cdot\text{NO}$ produzido endogenamente por estimulação do receptor NMDA e o consumo de O_2 na subregião CA1 do hipocampo.

Mecanicamente, a influência recíproca parece requerer um valor de concentração de $\cdot\text{NO}$ mínima (*threshold*) para interferir no consumo de O_2 .

Embora não tenha sido demonstrada directamente a interação do $\cdot\text{NO}$ (ou derivados) com a cyt c ox ou outros componentes da cadeia transportadora de electrões, as relações quantitativas entre as variações de ambos os gases sugerem que o $\cdot\text{NO}$ regula a utilização de O_2 pelo tecido via competição com a cyt c ox.

Esta interação, frequentemente referida na literatura, é verificada pela primeira vez através de registo simultâneo de $\cdot\text{NO}$ e pO_2 num modelo biológico complexo (fatias de hipocampo de rato) em que se preserva a citoarquitura e se traduz mais fielmente a difusão de ambas as moléculas ($\cdot\text{NO}$ e O_2) observada *in vivo*.

6.

Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

As conclusões gerais do trabalho aqui apresentado podem resumir-se do seguinte modo:

1. Os microelctrodos de fibra de carbono revestidos com os polímeros de Nafion® e *orto*-fenilenodiamina permitem medir a dinâmica de concentração de $\cdot\text{NO}$ endógeno em fatias de hipocampo de rato;
2. A esfera de influência do $\cdot\text{NO}$ produzido por activação de múltiplos locais de síntese na subregião CA1 é de pelo menos 400 μm , embora se preveja que este raio seja diminuído *in vivo* pela presença de hemoglobina. Esta determinação experimental vem suportar a difusão intercelular do mensageiro no cérebro;
3. A produção de $\cdot\text{NO}$ por estimulação do receptor NMDA é transitória, sugerindo mecanismos eficientes de remoção do radical ainda por identificar. Por outro lado, a concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ produzida para activação de uma via fisiológica situa-se na gama nanomolar, colidindo com assumpções frequentemente encontradas na bibliografia que sugerem concentrações tóxicas de $\cdot\text{NO}$ nos tecidos na gama micromolar;
4. O hipocampo é heterogéneo no que se refere à síntese de $\cdot\text{NO}$ dependente da activação de receptores NMDA, com maior produção do gás na subregião CA1, o que coincide não só com diferenças funcionais conhecidas para essas subregiões no âmbito dos mecanismos da memória, como também com uma susceptibilidade diferencial associada a processos de envelhecimento e neuropatologias;
5. A subregião CA1 do hipocampo apresenta maior taxa de consumo de O_2 , sugerindo uma maior velocidade metabólica;
6. Existe uma interacção entre o $\cdot\text{NO}$ produzido endogenamente e o O_2 que aponta para uma modulação recíproca da bioactividade e biodisponibilidade de ambos os gases no tecido neuronal.

Relativamente ao futuro deste projecto, podem delinear-se pelo menos duas grandes questões: qual a dinâmica de concentração de NO no hipocampo para uma estimulação eléctrica de circuitos específicos em cada subregião, e como é que esta se altera num sistema ainda mais próximo do fisiológico, nomeadamente em condições onde existe hemoglobina circulante que, potencialmente, remove NO ?

Por outro lado, a revelação de uma interacção NO/O_2 no hipocampo sugere um estudo mais detalhado não só dos alvos moleculares que são efectivamente afectados pelo radical como da bioactividade: existirá de facto apenas uma regulação da taxa de respiração mitocondrial por inibição reversível da cyt c ox e consequente produção de espécies reactivas como o $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o H_2O_2 que participam em vias de sinalização fisiológicas, ou é aqui esboçado o momento inicial de situações patológicas?

Por último, a natureza transitória dos sinais de NO e a ausência de concentrações elevadas em estado de equilíbrio sugerem mecanismos de remoção do radical ainda por identificar. A sua identificação teria consequências relevantes na fisiologia e modulação farmacológica do NO

7.

Referências Bibliográficas

- Aarts, M.M. e Tymianski, M. (2003) Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochem Pharmacol.* 66:877-86.
- Acsady, L., Arabadzisz, D. e Freund, T.F. (1996) Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience.* 73:299-315.
- Adak, S., Ghosh, S., Abu-Soud, H.M. e Stuehr, D.J. (1999) Role of reductase domain cluster 1 acidic residues in neuronal nitric-oxide synthase. Characterization of the FMN-FREE enzyme. *J Biol Chem.* 274:22313-20.
- Agnati, L.F., Zoli, M., Stromberg, I. e Fuxe, K. (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience.* 69:711-26.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. e Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615.
- Allen, B.W., Coury, L.A., Jr. e Piantadosi, C.A. (2002) Electrochemical detection of physiological nitric oxide: materials and methods. *Methods Enzymol.* 359:125-34.
- Almeida, A. e Bolanos, J.P. (2001) A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem.* 77:676-90.
- Almeida, A., Moncada, S. e Bolanos, J.P. (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol.* 6:45-51.
- Amaral, D.G. e Witter, M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31:571-91.
- Ames, A., 3rd, Li, Y.Y., Heher, E.C. e Kimble, C.R. (1992) Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci.* 12:840-53.
- Andersen, P., Bliss, V.P. e Skrede, K.K. (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Expl Brain Res.* 13:222-38.
- Arancio, O., Kiebler, M., Lee, C.J., Lev-Ram, V., Tsien, R.Y., Kandel, E.R. e Hawkins, R.D. (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell.* 87:1025-35.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S. e Murad, F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:3203-7.
- Arundine, M. e Tymianski, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 34:325-37.
- Aslan, M., Ryan, T.M., Townes, T.M., Coward, L., Kirk, M.C., Barnes, S., Alexander, C.B., Rosenfeld, S.S. e Freeman, B.A. (2003) Nitric oxide-dependent generation of

reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem.* 278:4194-204.

Astrup, J., Sorensen, P.M. e Sorensen, H.R. (1981) Oxygen and glucose consumption related to Na⁺-K⁺ transport in canine brain. *Stroke.* 12:726-30.

Babcock, G.T. e Wikstrom, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature.* 356:301-9.

Barbosa, R.M., Silva, A.M., Tome, A.R., Stamford, J.A., Santos, R.M. e Rosario, L.M. (1998) Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol.* 510 (Pt 1):135-43.

Bashir, Z.I., Jane, D.E., Sunter, D.C., Watkins, J.C. e Collingridge, G.L. (1993) Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 239:265-6.

Bayachou, M., Lin, R.L., Cho, W. e Farmer, P.J. (1998) Electrochemical reduction of NO by myoglobin in surfactant film: characterization and reactivity of the nitroxyl (NO-) adduct. *J Am Chem Soc.* 120:9888-93.

Beart, P.M. e O'Shea, R.D. (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol.* 150:5-17.

Beckman, J.S. (1991) The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol.* 15:53-9.

Beckman, J.S. (1996) The physiological and psychological chemistry of nitric oxide. In *Nitric Oxide, Principles and Actions.* Eds J. L. Jr. AP 1-82.

Beckman, J.S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J.C. e Tsai, M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 298:438-45.

Beckman, J.S. e Koppenol, W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271:C1424-37.

Bedioui, F., Trevin, S., Devynck, J., Lantoine, F., Brunet, A. e Devynck, M.A. (1997) Elaboration and use of nickel planar macrocyclic complex-based sensors for the direct electrochemical measurement of nitric oxide in biological media. *Biosens Bioelectron.* 12:205-12.

Beltran, B., Orsi, A., Clementi, E. e Moncada, S. (2000) Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br J Pharmacol.* 129:953-60.

Bender, A.T., Silverstein, A.M., Demady, D.R., Kanelakis, K.C., Noguchi, S., Pratt, W.B. e Osawa, Y. (1999) Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 274:1472-8.

- Bhardwaj, A., Northington, F.J., Ichord, R.N., Hanley, D.F., Traystman, R.J. e Koehler, R.C. (1997) Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo in rats. *Stroke*. 28:850-6; discussion 56-7.
- Blackmore, R.S., Greenwood, C. e Gibson, Q.H. (1991) Studies of the primary oxygen intermediate in the reaction of fully reduced cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 266:19245-9.
- Blackshaw, S., Eliasson, M.J., Sawa, A., Watkins, C.C., Krug, D., Gupta, A., Arai, T., Ferrante, R.J. e Snyder, S.H. (2003) Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience*. 119:979-90.
- Bliss, T.V. e Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361:31-9.
- Bliss, T.V. e Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232:331-56.
- Bolanos, J.P., Peuchen, S., Heales, S.J., Land, J.M. e Clark, J.B. (1994) Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem*. 63:910-6.
- Bon, C.L. e Garthwaite, J. (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 23:1941-8.
- Bonner, F.T. e Stedman, G. (1996) The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In *Methods in Nitric Oxide Research*. Eds M. Feelisch e J. S. Stamler John Wiley & Sons Ltd. 3-18.
- Borutaite, V. e Brown, G.C. (2003) Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radic Biol Med*. 35:1457-68.
- Borutaite, V., Budriunaite, A. e Brown, G.C. (2000) Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta*. 1459:405-12.
- Boveris, A. e Cadenas, E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*. 54:311-4.
- Braissant, O., Gotoh, T., Loup, M., Mori, M. e Bachmann, C. (1999) L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*. 70:231-41.
- Brazell, M.P., Kasser, R.J., Renner, K.J., Feng, J., Moghaddam, B. e Adams, R.N. (1987) Electrocoating carbon fiber microelectrodes with Nafion improves selectivity for electroactive neurotransmitters. *J Neurosci Methods*. 22:167-72.

- Bredt, D.S., Ferris, C.D. e Snyder, S.H. (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem.* 267:10976-81.
- Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M. e Snyder, S.H. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 7:615-24.
- Bredt, D.S. e Snyder, S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:682-5.
- Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., Lusic, A.J., Lee, J.J., Lee, N.A., Abu-Soud, H.M., Ischiropoulos, H. e Hazen, S.L. (2002) A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 277:17415-27.
- Brett, A.M.O. e Brett, C.M.A. (1993a) 2. Células Electroquímicas: Propriedades Electroquímicas e Potenciais de Eléctrodo. In *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*. Eds Livraria Almedina 13-42.
- Brett, C.M.A. e Brett, A.M.O. (1993b) 7. Experiências Electroquímicas. In *Electroquímica. Princípios, Métodos and Aplicações*. Eds Almedina 143-66.
- Brookes, P. e Darley-Usmar, V.M. (2002) Hypothesis: the mitochondrial NO(*) signaling pathway, and the transduction of nitrosative to oxidative cell signals: an alternative function for cytochrome C oxidase. *Free Radic Biol Med.* 32:370-4.
- Brookes, P.S., Levenson, A.L., Shiva, S., Sarti, P. e Darley-Usmar, V.M. (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 33:755-64.
- Brown, G.C. (1995) Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 369:136-9.
- Brown, G.C. (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta.* 1411:351-69.
- Brown, G.C. (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1504:46-57.
- Brown, G.C. (2007) Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci.* 12:1024-33.
- Brown, G.C. e Borutaite, V. (2002) Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.* 33:1440-50.

- Brown, G.C. e Cooper, C.E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356:295-8.
- Brunelli, L., Yermilov, V. e Beckman, J.S. (2001) Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 30:709-14.
- Brunori, M., Forte, E., Arese, M., Mastronicola, D., Giuffre, A. e Sarti, P. (2006) Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1757:1144-54.
- Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R.J., Schmidt, H.H. e Valtchanoff, J.G. (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci.* 22:8961-70.
- Campbell, D.L., Stamler, J.S. e Strauss, H.C. (1996) Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol.* 108:277-93.
- Capogna, M. (1998) Presynaptic facilitation of synaptic transmission in the hippocampus. *Pharmacol Ther.* 77:203-23.
- Carr, G.J. e Ferguson, S.J. (1990) Nitric oxide formed by nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is reduced by its reductase under aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1017:57-62.
- Cassina, A. e Radi, R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 328:309-16.
- Castro, L., Rodriguez, M. e Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem.* 269:29409-15.
- Castro, L.A., Robalinho, R.L., Cayota, A., Meneghini, R. e Radi, R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 359:215-24.
- Chance, B., Sies, H. e Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59:527-605.
- Chelikani, P., Fita, I. e Loewen, P.C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61:192-208.
- Chiou, J.S. e Paul, D.R. (1988) Gas Permeation in a Dry Nafion Membrane. *Ind Eng Chem Res.* 27:2161-64.
- Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D. e Nathan, C. (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med.* 176:599-604.

- Choi, Y.B., Tenneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H.S. e Lipton, S.A. (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 3:15-21.
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A. e Bredt, D.S. (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 274:27467-73.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S. e Schapira, A.H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345:50-4.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M. e Moncada, S. (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7631-6.
- Clementi, E., Brown, G.C., Foxwell, N. e Moncada, S. (1999) On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1559-62.
- Clements, J.D. (1996) Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* 19:163-71.
- Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E. e Westbrook, G.L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science.* 258:1498-501.
- Commoner, B., Townsend, J. e Pake, G.E. (1954) Free radicals in biological materials. *Nature.* 174:689-91.
- Conn, P.J. e Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:205-37.
- Cooper, C.E. (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1411:290-309.
- Cooper, C.E. (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem Sci.* 27:33-9.
- Crow, J.P. e Ischiropoulos, H. (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 269:185-94.
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V. e Murad, F. (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:203-36.
- Denicola, A., Souza, J.M., Radi, R. e Lissi, E. (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch Biochem Biophys.* 328:208-12.

- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. e Traynelis, S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51:7-61.
- Drapier, J.C. e Hibbs, J.B., Jr. (1988) Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol.* 140:2829-38.
- Drapier, J.C., Pellat, C. e Henry, Y. (1991) Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *J Biol Chem.* 266:10162-7.
- Driscoll, I., Hamilton, D.A., Petropoulos, H., Yeo, R.A., Brooks, W.M., Baumgartner, R.N. e Sutherland, R.J. (2003) The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex.* 13:1344-51.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- Dudek, S.M. e Bear, M.F. (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4363-7.
- Duport, S. e Garthwaite, J. (2005) Pathological consequences of inducible nitric oxide synthase expression in hippocampal slice cultures. *Neuroscience.* 135:1155-66.
- East, S.J. e Garthwaite, J. (1990) Nanomolar N(G)-nitroarginine inhibits NMDA-induced cyclic GMP formation in rat cerebellum. *Eur J Pharmacol.* 184:311-3.
- Elfering, S.L., Sarkela, T.M. e Giulivi, C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 277:38079-86.
- Erecinska, M. e Silver, I.A. (1989) ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9:2-19.
- Erecinska, M. e Silver, I.A. (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol.* 128:263-76.
- Espey, M.G., Miranda, K.M., Thomas, D.D., Xavier, A., Citrin, D., Vitec, M.P. e Wink, D.A. (2002) A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962:195-206.
- Esteves, P.M., De, M.C.J.W., Cardoso, S.P., Barbosa, A.G., Laali, K.K., Rasul, G., Prakash, G.K. e Olah, G.A. (2003) Unified mechanistic concept of electrophilic aromatic nitration: convergence of computational results and experimental data. *J Am Chem Soc.* 125:4836-49.
- Fan, C., Li, G., Zhu, J. e Zhu, D. (2000) A reagentless nitric oxide biosensor based on hemoglobin-DNA films. *Anal Chim Acta.* 423:95-100.

- Fedele, E., Marchi, M. e Raiteri, M. (2001) In vivo NO/cGMP signalling in the hippocampus. *Neurochem Res.* 26:1069-78.
- Feelisch, M. e Stamler, J.S. (1996) Donors of nitrogen oxides. In *Methods in Nitric Oxide Research*. Eds M. Feelish e J. A. Stamler John Wiley & Sons Ltd 71-118.
- Ferreira, N.R., Ledo, A., Frade, J.G., Gerhardt, G.A., Laranjinha, J. e Barbosa, R.M. (2005) Electrochemical measurement of endogenously produced nitric oxide in brain slices using Nafion/*o*-phenylenediamine modified carbon fiber microelectrodes. *Analytica Chimica Acta.* 535:1-7.
- Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Lowe, D.J., Mautner, G.N., Rotilio, G. e Calabrese, L. (1974) Mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis. *Biochem J.* 139:49-60.
- Firestein, B.L. e Bredt, D.S. (1999) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M. *J Biol Chem.* 274:10545-50.
- Fontijn, A., Sabadell, A.J. e Ronco, R.J. (1970) Homogeneous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. *Anal Chem.* 42:575-79.
- Ford, P.C., Wink, D.A. e Stanbury, D.M. (1993) Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett.* 326:1-3.
- Freeman, B.A. e Crapo, J.D. (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem.* 256:10986-92.
- Freund, T.F. e Buzsaki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6:347-470.
- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64:97-112.
- Friedemann, M.N., Robinson, S.W. e Gerhardt, G.A. (1996) *o*-Phenylenediamine-modified carbon fiber electrodes for the detection of nitric oxide. *Anal Chem.* 68:2621-8.
- Fukuto, J. e Ignarro, L.J. (1997) In vivo aspects of nitric oxide (NO) chemistry: Does peroxynitrite (-OONO) play a major role in cytotoxicity? *Accounts Chem. Res.* 30:149-52.
- Furchgott, R.F. e Vanhoutte, P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J.* 3:2007-18.
- Furchgott, R.F. e Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-6.
- Gachhui, R., Abu-Soud, H.M., Ghosha, D.K., Presta, A., Blazing, M.A., Mayer, B., George, S.E. e Stuehr, D.J. (1998) Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem.* 273:5451-4.

- Gadelha, F.R., Thomson, L., Fagian, M.M., Costa, A.D., Radi, R. e Vercesi, A.E. (1997) Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 345:243-50.
- Gardner, P.R., Costantino, G., Szabo, C. e Salzman, A.L. (1997) Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J Biol Chem.* 272:25071-6.
- Gardner, P.R., Martin, L.A., Hall, D. e Gardner, A.M. (2001) Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 31:191-204.
- Garthwaite, J. (1985) Cellular uptake disguises action of L-glutamate on N-methyl-D-aspartate receptors. With an appendix: diffusion of transported amino acids into brain slices. *Br J Pharmacol.* 85:297-307.
- Garthwaite, J., Charles, S.L. e Chess-Williams, R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336:385-8.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M. e Moncada, S. (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur.J.Pharmacol.* 172:413-16.
- Gerhardt, G.A., Oke, A.F., Nagy, G., Moghaddam, B. e Adams, R.N. (1984) Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Res.* 290:390-5.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. e Fenn, W.O. (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 119:623-6.
- Ghosh, D.K. e Stuehr, D.J. (1995) Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry.* 34:801-7.
- Gibson, Q.H. e Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide. *Biochem J.* 86:541-54.
- Giuffre, A., Barone, M.C., Mastronicola, D., D'Itri, E., Sarti, P. e Brunori, M. (2000) Reaction of nitric oxide with the turnover intermediates of cytochrome c oxidase: reaction pathway and functional effects. *Biochemistry.* 39:15446-53.
- Giuffre, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T. e Brunori, M. (1996) On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide. *J Biol Chem.* 271:33404-8.
- Giulivi, C. (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med.* 34:397-408.
- Giulivi, C., Poderoso, J.J. e Boveris, A. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 273:11038-43.

- Goldstein, S. e Czapski, G. (1995) The reaction of NO. with O₂·- and HO₂·: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med.* 19:505-10.
- Gomberg, M. (1900) An instance of trivalente carbon; triphenylmethyl. *J Am Chem Soc.* 22:757-71.
- Gorbunov, N.V., Osipov, A.N., Day, B.W., Zayas-Rivera, B., Kagan, V.E. e Elsayed, N.M. (1995) Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. *Biochemistry.* 34:6689-99.
- Gorton, L., Lindgren, A., Larsson, T., Munteanu, F.D., Ruzgas, T. e Gazaryan, I. (1999) Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Anal Chim Acta.* 400:91-108.
- Gotti, S., Sica, M., Viglietti-Panzica, C. e Panzica, G. (2005) Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech.* 68:13-35.
- Grant, S.G., O'Dell, T.J., Karl, K.A., Stein, P.L., Soriano, P. e Kandel, E.R. (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science.* 258:1903-10.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126:131-8.
- Griffiths, C. e Garthwaite, J. (2001) The shaping of nitric oxide signals by a cellular sink. *J Physiol.* 536:855-62.
- Griffiths, C., Wykes, V., Bellamy, T.C. e Garthwaite, J. (2003) A new and simple method for delivering clamped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors. *Mol Pharmacol.* 64:1349-56.
- Grima, G., Benz, B. e Do, K.Q. (1997) Glutamate-induced release of the nitric oxide precursor, arginine, from glial cells. *Eur J Neurosci.* 9:2248-58.
- Griscavage, J.M., Hobbs, A.J. e Ignarro, L.J. (1995) Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. *Adv Pharmacol.* 34:215-34.
- Gulyas, A.I., Hajos, N. e Freund, T.F. (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 16:3397-411.
- Gutierrez, H.H., Nieves, B., Chumley, P., Rivera, A. e Freeman, B.A. (1996) Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 21:43-52.

- Hall, C.N. e Garthwaite, J. (2006) Inactivation of nitric oxide by rat cerebellar slices. *J Physiol.* 577:549-67.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Eds. Oxford University Press
- Hemmens, B., Goessler, W., Schmidt, K. e Mayer, B. (2000) Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 275:35786-91.
- Herold, S., Exner, M. e Nauser, T. (2001) Kinetic and mechanistic studies of the NO*-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Biochemistry.* 40:3385-95.
- Hess, M.L. e Manson, N.H. (1984) Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 16:969-85.
- Hevel, J.M. e Marletta, M.A. (1992) Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry.* 31:7160-5.
- Hevel, J.M., White, K.A. e Marletta, M.A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.* 266:22789-91.
- Hevroni, D., Rattner, A., Bundman, M., Lederfein, D., Gabarah, A., Mangelus, M., Silverman, M.A., Kedar, H., Naor, C., Kornuc, M., Hanoch, T., Seger, R., Theill, L.E., Nedivi, E., Richter-Levin, G. e Citri, Y. (1998) Hippocampal plasticity involves extensive gene induction and multiple cellular mechanisms. *J Mol Neurosci.* 10:75-98.
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z. e Rachlin, E.M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 157:87-94.
- Hollmann, M. e Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108.
- Huang, Y.H. e Bergles, D.E. (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol.* 14:346-52.
- Huie, R.E. e Padmaja, S. (1993) The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 18:195-9.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. e Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9265-9.
- Izumi, Y. e Zorumski, C.F. (1993) Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport.* 4:1131-4.

- Izumi, Y. e Zorumski, C.F. (1995) Developmental changes in long-term potentiation in CA1 of rat hippocampal slices. *Synapse*. 20:19-23.
- Jacoby, S., Sims, R.E. e Hartell, N.A. (2001) Nitric oxide is required for the induction and heterosynaptic spread of long-term potentiation in rat cerebellar slices. *J Physiol*. 535:825-39.
- Jaffrey, S.R., Benfenati, F., Snowman, A.M., Czernik, A.J. e Snyder, S.H. (2002) Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3199-204.
- Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J., Cohen, N.A. e Snyder, S.H. (1998) CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron*. 20:115-24.
- Jekabsone, A., Ivanoviene, L., Brown, G.C. e Borutaite, V. (2003) Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release. *J Mol Cell Cardiol*. 35:803-9.
- Jiang, C., Agulian, S. e Haddad, G.G. (1991) O₂ tension in adult and neonatal brain slices under several experimental conditions. *Brain Res*. 568:159-64.
- Jiang, M.H., Kaku, T., Hada, J. e Hayashi, Y. (1999) 7-Nitroindazole reduces nitric oxide concentration in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Eur J Pharmacol*. 380:117-21.
- Johnson, F. e Giulivi, C. (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*. 26:340-52.
- Jourd'heuil, D., Laroux, F.S., Miles, A.M., Wink, D.A. e Grisham, M.B. (1999) Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Arch Biochem Biophys*. 361:323-30.
- Jurado, S., Sanchez-Prieto, J. e Torres, M. (2005) Expression of cGMP-dependent protein kinases (I and II) and neuronal nitric oxide synthase in the developing rat cerebellum. *Brain Res Bull*. 65:111-5.
- Kanner, J., Harel, S. e Granit, R. (1991) Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*. 289:130-6.
- Keefer, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M. e Wink, D.A. (1996) "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol*. 268:281-93.
- Keshive, M., Singh, S., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. e Deen, W.M. (1996) Kinetics of S-nitrosation of thiols in nitric oxide solutions. *Chem Res Toxicol*. 9:988-93.
- Kew, J.N. e Kemp, J.A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 179:4-29.

- Keynes, R.G., Griffiths, C.H., Hall, C. e Garthwaite, J. (2005) Nitric oxide consumption through lipid peroxidation in brain cell suspensions and homogenates. *Biochem J.* 387:685-94.
- Kharazia, V.N., Petrusz, P., Usunoff, K., Weinberg, R.J. e Rustioni, A. (1997) Arginine and NADPH diaphorase in the rat ventroposterior thalamic nucleus. *Brain Res.* 744:151-5.
- Kiedrowski, L., Costa, E. e Wroblewski, J.T. (1992) Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 58:335-41.
- Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y. e Hirobe, M. (1993) Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H₂O₂ system. *Anal Chem.* 65:1794-9.
- Kilinc, E., Yetik, G., Dalbasti, T. e Ozsoz, M. (2002) Comparison of electrochemical detection of acetylcholine-induced nitric oxide release (NO) and contractile force measurement of rabbit isolated carotid artery endothelium. *J Pharm Biomed Anal.* 28:345-54.
- Kissinger, P.T. e Ridgway, T.H. (1996) 5 - Small amplitude controlled-potential techniques. In *Laboratory Techniques in Electrochemical Chemistry* Eds P. T. Kissinger e W. R. Heineman Marcel Dekker, Inc.
- Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P.G. e Koppenol, W.H. (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol.* 10:1285-92.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. e Hofmann, F. (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci.* 19:48-55.
- Koesling, D. (1999) Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods.* 19:485-93.
- Komeima, K., Hayashi, Y., Naito, Y. e Watanabe, Y. (2000) Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem.* 275:28139-43.
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H. e Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 5:834-42.
- Koshland, D.E., Jr. (1992) The molecule of the year. *Science.* 258:1861.
- Kristensen, E.W., Kuhr, W.G. e Wightman, R.M. (1987) Temporal characterization of perfluorinated ion exchange-coated micro-voltammetric electrodes for in vivo use. *Anal. Chem* 59:

- Kumar, S.M., Porterfield, D.M., Muller, K.J., Smith, P.J. e Sahley, C.L. (2001) Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. *J Neurosci.* 21:215-20.
- Kurjak, M., Koppitz, P., Schusdziarra, V. e Allescher, H.D. (1999) Evidence for a feedback inhibition of NO synthesis in enteric synaptosomes via a nitrosothiol intermediate. *Am J Physiol.* 277:G875-84.
- Kwon, N.S., Stuehr, D.J. e Nathan, C.F. (1991) Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med.* 174:761-7.
- Kyrozis, A., Albuquerque, C., Gu, J. e MacDermott, A.B. (1996) Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors: fast kinetics and high Ca²⁺ sensitivity in rat dorsal horn neurons. *J Physiol.* 495 (Pt 2):449-63.
- Lancaster, J.R., Jr. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8137-41.
- Lancaster, J.R., Jr. (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide.* 1:18-30.
- Lancaster, J.R., Jr., Langrehr, J.M., Bergonia, H.A., Murase, N., Simmons, R.L. e Hoffman, R.A. (1992) EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. *J Biol Chem.* 267:10994-8.
- Landar, A., Hall, T.L., Cornwall, E.H., Correia, J.J., Drohat, A.C., Weber, D.J. e Zimmer, D.B. (1997) The role of cysteine residues in S100B dimerization and regulation of target protein activity. *Biochim Biophys Acta.* 1343:117-29.
- Ledo, A., Barbosa, R.M., Gerhardt, G.A., Cadenas, E. e Laranjinha, J. (2005) Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:17483-88.
- Ledo, A., Frade, J., Barbosa, R.M. e Laranjinha, J. (2004) Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol Aspects Med.* 25:75-89.
- Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.K., Chen, H.S., Hartman, J., Sucher, N.J. e Lipton, S.A. (1992) Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* 8:1087-99.
- Leone, A.M., Furst, V.W., Foxwell, N.A., Celtek, S. e Moncada, S. (1996) Visualisation of nitric oxide generated by activated murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 221:37-41.
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L. e Fontecave, M. (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 179:442-8.

- Lev-Ram, V., Wong, S.T., Storm, D.R. e Tsien, R.Y. (2002) A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8389-93.
- Lipton, S.A., Rayudu, P.V., Choi, Y.B., Sucher, N.J. e Chen, H.S. (1998) Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res.* 118:73-82.
- Liu, K.J., Bacic, G., Hoopes, P.J., Jiang, J., Du, H., Ou, L.C., Dunn, J.F. e Swartz, H.M. (1995) Assessment of cerebral pO₂ by EPR oximetry in rodents: effects of anesthesia, ischemia, and breathing gas. *Brain Res.* 685:91-8.
- Liu, P., Smith, P.F., Appleton, I., Darlington, C.L. e Bilkey, D.K. (2003) Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience.* 119:679-87.
- Liu, X., Miller, M.J., Joshi, M.S., Thomas, D.D. e Lancaster, J.R., Jr. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2175-9.
- Lores-Arnaiz, S., Perazzo, J.C., Prestifilippo, J.P., Lago, N., D'Amico, G., Czerniczyniec, A., Bustamante, J., Boveris, A. e Lemberg, A. (2005) Hippocampal mitochondrial dysfunction with decreased mtNOS activity in prehepatic portal hypertensive rats. *Neurochem Int.* 47:362-8.
- Loy, R., Koziell, D.A., Lindsey, J.D. e Moore, R.Y. (1980) Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 189:699-710.
- Luo, D., Knezevich, S. e Vincent, S.R. (1993) N-methyl-D-aspartate-induced nitric oxide release: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience.* 57:897-900.
- Luo, D. e Vincent, S.R. (1994) NMDA-dependent nitric oxide release in the hippocampus in vivo: interactions with noradrenaline. *Neuropharmacology.* 33:1345-50.
- MacMicking, J., Xie, Q.W. e Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-50.
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S. e Thompson, J.A. (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11853-8.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A. e Waxham, M.N. (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* 340:554-7.
- Malinow, R., Madison, D.V. e Tsien, R.W. (1988) Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature.* 335:820-4.

- Malinski, T. e Czuchajowski, L. (1996) Nitric oxide Measurement by Electrochemical Methods. In *Methods in NitricOxide Research*. Eds M. Feelish e J. S. Stamler John Wiley & Sons 319-39.
- Malinski, T. e Taha, Z. (1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature*. 358:676-8.
- Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M. e Tomboulian, P. (1993) Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun*. 193:1076-82.
- Manzoni, O. e Bockaert, J. (1993) Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *J Neurochem*. 61:368-70.
- Matsuda, H. e Iyanagi, T. (1999) Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta*. 1473:345-55.
- McCord, J.M. e Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocypreïn). *J Biol Chem*. 244:6049-55.
- McMillan, K., Bredt, D.S., Hirsch, D.J., Snyder, S.H., Clark, J.E. e Masters, B.S. (1992) Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:11141-5.
- McMillan, K. e Masters, B.S. (1995) Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry*. 34:3686-93.
- Meoni, P., Mugnaini, M., Bunnemann, B.H., Trist, D.G. e Bowery, N.G. (1998) [3H]MK-801 binding and the mRNA for the NMDAR1 subunit of the NMDA receptor are differentially distributed in human and rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res*. 54:13-23.
- Meulemans, A. (1994) Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. *Neurosci Lett*. 171:89-93.
- Micheva, K.D., Buchanan, J., Holz, R.W. e Smith, S.J. (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci*. 6:925-32.
- Milner, B., Squire, L.R. e Kandel, E.R. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20:445-68.
- Miranda, K.M., Espey, M.G. e Wink, D.A. (2000) A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J Inorg Biochem*. 79:237-40.
- Mitchell, J.B., Cook, J.A., Krishna, M.C., DeGraff, W., Gamson, J., Fisher, J., Christodoulou, D. e Wink, D.A. (1996) Radiation sensitisation by nitric oxide releasing agents. *Br J Cancer Suppl*. 27:S181-4.

- Mittal, C.K. e Murad, F. (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:4360-4.
- Mo, E., Amin, H., Bianco, I.H. e Garthwaite, J. (2004) Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *J Biol Chem*. 279:26149-58.
- Moller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R. e Denicola, A. (2005) Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 280:8850-4.
- Monaghan, D.T. e Cotman, C.W. (1985) Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci*. 5:2909-19.
- Moncada, S. e Erusalimsky, J.D. (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:214-20.
- Moncada, S., Radomski, M.W. e Palmer, R.M. (1988) Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*. 37:2495-501.
- Mori, V. e Bertotti, M. (2000) Nitric oxide solutions: standardization by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. *Analyst*. 125:1629-32.
- Morris, R., Southam, E., Gittins, S.R., de Vente, J. e Garthwaite, J. (1994) The NO-cGMP pathway in neonatal rat dorsal horn. *Eur J Neurosci*. 6:876-9.
- Mulkey, D.K., Henderson, R.A., 3rd, Olson, J.E., Putnam, R.W. e Dean, J.B. (2001) Oxygen measurements in brain stem slices exposed to normobaric hyperoxia and hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol*. 90:1887-99.
- Murphy, K.P. e Bliss, T.V. (1999) Photolytically released nitric oxide produces a delayed but persistent suppression of LTP in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol*. 515 (Pt 2):453-62.
- Murphy, K.P., Williams, J.H., Bettache, N. e Bliss, T.V. (1994) Photolytic release of nitric oxide modulates NMDA receptor-mediated transmission but does not induce long-term potentiation at hippocampal synapses. *Neuropharmacology*. 33:1375-85.
- Nair, P.K., Buerk, D.G. e Halsey, J.H., Jr. (1987) Comparisons of oxygen metabolism and tissue PO₂ in cortex and hippocampus of gerbil brain. *Stroke*. 18:616-22.
- Nakamichi, N. e Yoneda, Y. (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca²⁺ for drug development: desensitization of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *J Pharmacol Sci*. 97:348-50.
- Nakano, M., Kimura, H., Hara, M., Kuroiwa, M., Kato, M., Totsune, K. e Yoshikawa, T. (1990) A highly sensitive method for determining both Mn- and Cu-Zn superoxide dismutase activities in tissues and blood cells. *Anal Biochem*. 187:277-80.

- Nicholls, D. e Attwell, D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 11:462-8.
- Nicoll, R.A. e Malenka, R.C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 377:115-8.
- Nishida, C.R. e Ortiz de Montellano, P.R. (1999) Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem.* 274:14692-8.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. e Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 307:462-5.
- O'Dell, T.J., Kandel, E.R. e Grant, S.G. (1991) Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature.* 353:558-60.
- Ohnuki, K., Matsuda, H., Ohsaka, T. e Oyama, N. (1983) Permselectivity of films prepared by electrochemical oxidation of phenol and amino-aromatic compounds *J Electroanal Chem.* 158:55-67.
- Okada, D. (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem.* 59:1203-10.
- Otersen, O.P. e Landsend, A.S. (1997) Organization of glutamate receptors at the synapse. *Eur J Neurosci.* 9:2219-24.
- Ozawa, S., Kamiya, H. e Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54:581-618.
- Pacher, P., Beckman, J.S. e Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87:315-424.
- Palacios-Callender, M., Quintero, M., Hollis, V.S., Springett, R.J. e Moncada, S. (2004) Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7630-5.
- Palmer, C.L., Cotton, L. e Henley, J.M. (2005) The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev.* 57:253-77.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. e Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524-6.
- Pariante, F., Alonso, J.L. e Abruna, H.D. (1994) Chemically modified electrode for selective and sensitive determination of nitric oxide (NO) in vitro and in biological systems. *J Electroanal Chem.* 379:191-97.

- Park, J.K., Tran, P.H., Chao, J.K., Ghodadra, R., Rangarajan, R. e Thakor, N.V. (1998) In vivo nitric oxide sensor using non-conducting polymer-modified carbon fiber. *Biosens Bioelectron.* 13:1187-95.
- Pasquet, J.P., Zou, M.H. e Ullrich, V. (1996) Peroxynitrite inhibition of nitric oxide synthases. *Biochimie.* 78:785-91.
- Patel, R.P., Levonen, A., Crawford, J.H. e Darley-Usmar, V.M. (2000) Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 47:465-74.
- Pearce, L.L., Epperly, M.W., Greenberger, J.S., Pitt, B.R. e Peterson, J. (2001) Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide.* 5:128-36.
- Phillips, P.E.M. e Wightman, R.M. (2003) Critical guidelines for validation of the selectivity of *in-vivo* chemical microcrossensors. *Trends Anal Chem.* 22:509-14.
- Pin, J.P. e Duvoisin, R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34:1-26.
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F. e Boveris, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 328:85-92.
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Schopfer, F., Lisdero, C.L., Riobo, N.A., Giulivi, C., Boveris, A.D., Boveris, A. e Cadenas, E. (1999) The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radic Biol Med.* 26:925-35.
- Pollock, J.S., Forstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M. e Murad, F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10480-4.
- Pontie, M., Bedioui, F. e Devynck, J. (1999) New composite modified carbon microfibers for sensitive and selective determination of physiologically relevant concentrations of nitric oxide in solution. *Electroanal.* 11:845-50.
- Pontie, M., Gobin, C., Pauporté, T., Bedioui, F. e Devynck, J. (2000) Electrochemical nitric oxide microsensors: sensitivity and selectivity characterization. *Anal Chim Acta.* 411:175-85.
- Porterfield, D.M., Laskin, J.D., Jung, S.K., Malchow, R.P., Billack, B., Smith, P.J. e Heck, D.E. (2001) Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281:L904-12.
- Pou, S., Pou, W.S., Bredt, D.S., Snyder, S.H., Rosen, G.M. (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 267:24173-24176.

- Prast, H. e Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 64:51-68.
- Pryor, W.A. e Squadrito, G.L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 268:L699-722.
- Puppo, A. e Halliwell, B. (1988) Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J.* 249:185-90.
- Radenovic, L. e Selakovic, V. (2005) Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. *Brain Res Bull.* 67:133-41.
- Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4003-8.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. e Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 288:481-7.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M. e Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 30:463-88.
- Raman, C.S., Li, H., Martasek, P., Kral, V., Masters, B.S. e Poulos, T.L. (1998) Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell.* 95:939-50.
- Rameau, G.A., Chiu, L.Y. e Ziff, E.B. (2004) Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 279:14307-14.
- Rebec, G.V. e Pierce, R.C. (1994) A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol.* 43:537-65.
- Rice, M.E. e Russo-Menna, I. (1998) Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience.* 82:1213-23.
- Riobo, N.A., Clementi, E., Melani, M., Boveris, A., Cadenas, E., Moncada, S. e Poderoso, J.J. (2001) Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J.* 359:139-45.
- Robinson, V.K., Sato, E., Nelson, D.K., Camhi, S.L., Robbins, R.A. e Hoyt, J.C. (2001) Peroxynitrite inhibits inducible (type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells in vitro. *Free Radic Biol Med.* 30:986-91.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D. e Wenthold, R.J. (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci.* 4:794-802.

- Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Mulsch, A. e Dimmeler, S. (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem.* 274:6823-6.
- Sakai, T., Takenaka, H. e Torikai, E. (1986) Gas Diffusion in the Dried and Hydrated Nafions. *J Electrochem Soc.* 133:88-92.
- Salvemini, D., Radziszewski, W., Korbut, R. e Vane, J. (1990) The use of oxyhaemoglobin to explore the events underlying inhibition of platelet aggregation induced by NO or NO-donors. *Br J Pharmacol.* 101:991-5.
- Saran, M., Michel, C. e Bors, W. (1998) Radical functions in vivo: a critical review of current concepts and hypotheses. *Z Naturforsch [C].* 53:210-27.
- Sarti, P., Giuffre, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M.C. e Brunori, M. (2000) Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 274:183-7.
- Sarti, P., Silver, R.B., Paroli, L., Nikonorov, I. e Blanck, T.J. (1999) Permeability of rat heart myocytes to cytochrome c. *Cell Mol Life Sci.* 56:1061-9.
- Schlossmann, J. e Hofmann, F. (2005) cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today.* 10:627-34.
- Schmidt, H.H., Gagne, G.D., Nakane, M., Pollock, J.S., Miller, M.F. e Murad, F. (1992) Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem.* 40:1439-56.
- Schmidt, H.H. e Murad, F. (1991) Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 181:1372-7.
- Schuman, E.M. e Madison, D.V. (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* 254:1503-6.
- Schuman, E.M. e Madison, D.V. (1994) Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science.* 263:532-6.
- Schuman, E.M., Meffert, M.K., Schulman, H. e Madison, D.V. (1994) An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11958-62.
- Schweizer, M. e Richter, C. (1994) Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun.* 204:169-75.
- Scoville, W.B. e Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 20:11-21.
- Shaw, A.W. e Vosper, A.J. (1977) Solubility of nitric oxide in aqueous and non-aqueous solvents. *J Chem Soc Faraday Trans.* 8:1239-44.

- Shen, W., Hintze, T.H. e Wolin, M.S. (1995) Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation*. 92:3505-12.
- Sheng, M. e Pak, D.T. (1999) Glutamate receptor anchoring proteins and the molecular organization of excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci*. 868:483-93.
- Shibuki, K. (1990) An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci Res*. 9:69-76.
- Shibuki, K. e Okada, D. (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*. 349:326-8.
- Shintani, F., Kanba, S., Nakaki, T., Sato, K., Yagi, G., Kato, R. e Asai, M. (1994) Measurement by in vivo brain microdialysis of nitric oxide release in the rat cerebellum. *J Psychiatry Neurosci*. 19:217-21.
- Shiva, S., Brookes, P.S., Patel, R.P., Anderson, P.G. e Darley-Usmar, V.M. (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7212-7.
- Shiva, S., Oh, J.Y., Landar, A.L., Ulasova, E., Venkatraman, A., Bailey, S.M. e Darley-Usmar, V.M. (2005) Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 38:297-306.
- Siddhanta, U., Wu, C., Abu-Soud, H.M., Zhang, J., Ghosh, D.K. e Stuehr, D.J. (1996) Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J Biol Chem*. 271:7309-12.
- Smith, D.A., Hoffman, A.F., David, D.J., Adams, C.E. e Gerhardt, G.A. (1998) Nicotine-evoked nitric oxide release in the rat hippocampal slice. *Neurosci.Lett*. 255:127-30.
- Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P.L., Fishman, M.C. e Kandel, E.R. (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*. 87:1015-23.
- Souza, J.M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C.S. e Ischiropoulos, H. (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*. 371:169-78.
- Stamford, J.A., Crespi, F. e Marsden, C.A. (1992) 5 - In Vivo Voltammetric Methods for Monitoring Monoamine Release and Metabolism. In *Monitoring Neuronal Activity*. Eds J. A. Stamford Oxford University Press 113-45.
- Stamler, J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 78:931-6.
- Stamler, J.S., Toone, E.J., Lipton, S.A. e Sucher, N.J. (1997) (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*. 18:691-6.

- Stanton, P.K., Chattarji, S. e Sejnowski, T.J. (1991) 2-Amino-3-phosphonopropionic acid, an inhibitor of glutamate-stimulated phosphoinositide turnover, blocks induction of homosynaptic long-term depression, but not potentiation, in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 127:61-6.
- Stanton, P.K., Winterer, J., Bailey, C.P., Kyrozis, A., Raginov, I., Laube, G., Veh, R.W., Nguyen, C.Q. e Muller, W. (2003) Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *J Neurosci.* 23:5936-44.
- Stingele, R., Wilson, D.A., Traystman, R.J. e Hanley, D.F. (1998) Tyrosine confounds oxidative electrochemical detection of nitric oxide. *Am J Physiol.* 274:H1698-704.
- Stone, J.R. e Marletta, M.A. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry.* 35:1093-9.
- Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A., Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Bassett, D.E., Jr., Bredt, D.S. e Li, M. (1997) PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat Biotechnol.* 15:336-42.
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F. e Nathan, C.F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7773-7.
- Stuehr, D.J. e Ikeda-Saito, M. (1992) Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like heme proteins that contain a flavin semiquinone radical. *J Biol Chem.* 267:20547-50.
- Takata, N., Harada, T., Rose, J.A. e Kawato, S. (2005) Spatiotemporal analysis of NO production upon NMDA and tetanic stimulation of the hippocampus. *Hippocampus.* 15:427-40.
- Tatoyan, A. e Giulivi, C. (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 273:11044-8.
- Thomas, D.D., Liu, X., Kantrow, S.P. e Lancaster, J.R., Jr. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:355-60.
- Thomas, F. e Henze, G. (2001) *Introduction to Voltammetric Analysis - Theory and Practice*. Eds. CSIRO 251.
- Toms, N.J. e Roberts, P.J. (1994) NMDA receptor-mediated stimulation of rat cerebellar nitric oxide formation is modulated by cyclic AMP. *Eur J Pharmacol.* 266:63-6.
- Topel, I., Stanarius, A. e Wolf, G. (1998) Distribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase in the developing rat brain: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 788:43-8.

- Torres, J., Sharpe, M.A., Rosquist, A., Cooper, C.E. e Wilson, M.T. (2000) Cytochrome c oxidase rapidly metabolises nitric oxide to nitrite. *FEBS Lett.* 475:263-6.
- Tovar, K.R. e Westbrook, G.L. (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron.* 34:255-64.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A. e Crapo, J.D. (1982) Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 217:411-21.
- Umbriaco, D., Garcia, S., Beaulieu, C. e Descarries, L. (1995) Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus.* 5:605-20.
- Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Kharazia, V.N., Nakane, M. e Schmidt, H.H. (1993) Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J Comp Neurol.* 331:111-21.
- Vanderkooi, J.M., Erecinska, M. e Silver, I.A. (1991) Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am J Physiol.* 260:C1131-50.
- Vincent, S.R. e Kimura, H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 46:755-84.
- Vizi, E.S. e Kiss, J.P. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus.* 8:566-607.
- Watts, J., Fowler, L., Whitton, P.S. e Pearce, B. (2005) Release of arginine, glutamate and glutamine in the hippocampus of freely moving rats: Involvement of nitric oxide. *Brain Res Bull.* 65:521-8.
- Weeks, J.C., Jacobs, G.A., Pierce, J.T., Sandstrom, D.J., Streichert, L.C., Trimmer, B.A., Wiel, D.E. e Wood, E.R. (1997) Neural mechanisms of behavioral plasticity: metamorphosis and learning in *Manduca sexta*. *Brain Behav Evol.* 50 Suppl 1:69-80.
- Welter, R., Yu, L. e Yu, C.A. (1996) The effects of nitric oxide on electron transport complexes. *Arch Biochem Biophys.* 331:9-14.
- Wendland, B., Schweizer, F.E., Ryan, T.A., Nakane, M., Murad, F., Scheller, R.H. e Tsien, R.W. (1994) Existence of nitric oxide synthase in rat hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2151-5.
- Wexler, E.M. e Stanton, P.K. (1993) Priming of homosynaptic long-term depression in hippocampus by previous synaptic activity. *Neuroreport.* 4:591-4.
- White, A.A., Crawford, K.M., Patt, C.S. e Lad, P.J. (1976) Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 251:7304-12.

- White, K.A. e Marletta, M.A. (1992) Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry*. 31:6627-31.
- Whittam, R. (1962) The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem J*. 82:205-12.
- Williams, D.L.H. (1988) *Nitrosation*. Eds. Cambridge Press
- Wink, D.A., Cook, J.A., Kim, S.Y., Vodovotz, Y., Pacelli, R., Krishna, M.C., Russo, A., Mitchell, J.B., Jourdain, D., Miles, A.M. e Grisham, M.B. (1997) Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*. 272:11147-51.
- Wink, D.A., Darbyshire, J.F., Nims, R.W., Saavedra, J.E. e Ford, P.C. (1993) Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol*. 6:23-7.
- Wink, D.A., Grisham, M.B., Mitchell, J.B. e Ford, P.C. (1996) Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol*. 268:12-31.
- Wink, D.A. e Mitchell, J.B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 25:434-56.
- Wink, D.A., Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Laval, F., Laval, J., Cook, J.A., Krishna, M.C. e et al. (1994) Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol*. 7:519-25.
- Wood, J. e Garthwaite, J. (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*. 33:1235-44.
- Xian, Y., Zhang, W., Xue, J., Ying, X. e Jin, L. (2000) Direct Measurement of nitric oxide release from the rat hippocampus. *Analytica Chimica Acta*. 415:127-33.
- Xie, Y.W., Shen, W., Zhao, G., Xu, X., Wolin, M.S. e Hintze, T.H. (1996) Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circ Res*. 79:381-7.
- Xu, W., Liu, L.Z., Loizidou, M., Ahmed, M. e Charles, I.G. (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res*. 12:311-20.
- Yamamoto, T., Maruyama, W., Kato, Y., Yi, H., Shamoto-Nagai, M., Tanaka, M., Sato, Y. e Naoi, M. (2002) Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm*. 109:1-13.

7. Referências Bibliográficas

Yang, Y., Ning, G.M., Kutor, J., Hong, D.H., Zhang, M. e Zheng, X.X. (2004) Nitric oxide spatial distribution in single cultured hippocampus neurons: investigation by projection of reconstructed 3-D image and visualization technique. *Cell Biol Int.* 28:577-83.

Yao, J.A., Jiang, M. e Tseng, G.N. (1997) Mechanism of enhancement of slow delayed rectifier current by extracellular sulfhydryl modification. *Am J Physiol.* 273:H208-19.

Zacharia, I.G. e Deen, W.M. (2005) Diffusivity and solubility of nitric oxide in water and saline. *Ann Biomed Eng.* 33:214-22.

Zech, B., Wilm, M., van Eldik, R. e Brune, B. (1999) Mass spectrometric analysis of nitric oxide-modified caspase-3. *J Biol Chem.* 274:20931-6.

Zhao, G., Bernstein, R.D. e Hintze, T.H. (1999) Nitric oxide and oxygen utilization: exercise, heart failure and diabetes. *Coron Artery Dis.* 10:315-20.