FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

BRUNO PEREIRA CARREIRA

REGULAÇÃO DA NEUROGÉNESE PELO ÓXIDO NÍTRICO

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA CELULAR

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA INÊS MARIA POMBINHO DE ARAÚJO
PROFESSORA DOUTORA CATARINA RESENDE OLIVEIRA

MARÇO/2014

REGULAÇÃO DA NEUROGÉNESE PELO ÓXIDO NÍTRICO

ARTIGO DE REVISÃO

Bruno Pereira Carreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Universidade de Coimbra

- 2014 -

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Inês Araújo o apoio e a orientação do trabalho aqui apresentado. Agradeço todos os momentos de amizade, de partilha de vivências, ora pessoais, ora profissionais, obrigado. Obrigado pela confiança que sempre depositou em mim e acima de tudo pela sua amizade.

Agradeço à Professora Doutora Catarina Oliveira pelo apoio e orientação na execução deste trabalho. Obrigado pela prontidão com que aceitou ser minha orientadora. Agradeço ainda o apoio e encorajamento que sempre senti da sua parte todas as vezes que recorri a si. Pelo seu exemplo, obrigado!

À Professora Doutora Caetana Carvalho e à Dra. Ana Isabel Santos agradeço toda a disponibilidade e ajuda ao longo destes anos. Sem a sua ajuda este trabalho teria sido mais complicado de concretizar.

Aos meus colegas e amigos, agradeço a companhia, a entreajuda, a partilha e a boa disposição que contribuíram para que esta longa jornada chamada Medicina passasse sem que o tempo se fizesse sentir, em particular ao António, à Anália, à Estela, à Gi, ao Fábio, aos Fernandos, à Fi, ao Emanuel, ao Nuno Pais, ao Pedro, ao Gustavo... Um agradecimento especial para aqueles que sempre me acolheram nas inúmeras turmas por onde passei e que tiveram especial importância nesta caminhada que agora termina. Agradeço ainda a todos os professores e tutores que tive ao longo do curso, aos excelentes e aos... menos bons!

Aos meus pais, porque a eles devo tudo o que sou hoje! Eles que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as escolhas e decisões. Obrigado pelo vosso amor, que tanta força me tem dado quando a "montanha" parece impossível de escalar. Obrigado pela vossa alegria de viver!

Ao meu irmão João...obrigado! És um exemplo para mim a todos os níveis, na integridade, na honestidade e, acima de tudo, na força de viver.

À Inês... obrigado por seres especial e por teres estado sempre lá nesta caminhada que se iniciou a dois...mas que terá em breve um novo elemento nesta viagem que decidimos fazer juntos! Obrigado por fazeres parte da minha vida! Obrigado...

Para ti,

por ti…

Índice

Lista de abreviaturas **5**

Abstract **8**

Resumo **10**

1. Introdução **12**

2. Neurogénese no cérebro de mamíferos adultos **13**

3. Óxido Nítrico **15**

3.1 Mecanismos de acção do óxido nítrico *16*

3.2 Óxido nítrico e neurogénese *18*

3.2.1 Acção anti-neurogénica do óxido nítrico 20

3.2.2 Acção pró-neurogénica do óxido nítrico 21

4. Neuroinflamação **23**

4.1 Neuroinflamação e neurogénese *24*

4.1.1 Acção anti-neurogénica da inflamação 27

4.1.2 Acção pró-neurogénica da inflamação 27

4.2 Estudos futuros *28*

5. Potencial terapêutico da modulação da acção do NO **29**

5.1 Anti-inflamatórios não esteróides dadores de NO *32*

5.2 Inibidores da fosfodiesterase-5 ..... *35*

5.3 Outras estratégias *38*

6. Estratégias futuras **39**

7. Referências **42**

Lista de abreviaturas

BDNF	Factor neurotrófico derivado do cérebro
bFGF	Factor de crescimento de fibroblastos básico
BHE	Barreira hemato-encefálica
cGMP	Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica
COX	Ciclooxigenase
DG	Giro dentado
EGF	Factor de crescimento epidérmico
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
GDNF	Factor neurotrófico derivado de linha celular de glia
GI	Gastrointestinal
IFN	Interferão
IL	Interleucina
iNOS	Sintase do óxido nítrico indutível
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	Proteína cinase activada por mitogénio
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MHC	Complexo de histocompatibilidade major
NO	Óxido nítrico
NO_2	Dióxido de azoto
N_2O_3	Trióxido de diazoto
NO-AINEs	Anti-inflamatórios não-esteróides libertadores do NO
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NOS	Sintase do óxido nítrico
NONOates	Diazeniodiolatos
NSC	Células estaminais neurais
OB	Bolbo olfactivo
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PDE	Fosfodiesterase
PDE5	Fosfodiesterase tipo 5

PI3-K	Fosfoinositídeo 3-cinase
PKG	Proteína cinase dependente de cGMP
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RMS	Fluxo migratório rostral
RNS	Espécies reactivas de nitrogénio
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SDF	Factor derivado do estroma
SE	*Status epilepticus*
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SGZ	Zona subgranular
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Nitroprussiato de sódio
7-NI	7-nitroindazol
SVZ	Zona subventricular
TNF	Factor de necrose tumoral

Regulação da neurogénese pelo óxido nítrico

Bruno P. Carreira[1,2], Catarina Oliveira[1,2], Caetana Carvalho[2], Ana I. Santos[3,4], Inês M. Araújo[3,4]

[1]Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Portugal

[2]Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Portugal

[3]Programa de Medicina Regenerativa, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve, Faro, Portugal

[4]IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Biomedicina molecular e Estrutural, Universidade do Algarve, Faro, Portugal

Email: bruno.p.carreira@gmail.com

Abstract

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule with an important biological role in intercellular communication and in intracellular signaling in various systems. In the central nervous system (CNS). NO has been linked to the regulation of synaptic plasticity and cognitive functions, controling several biological functions including sleep-wake cycle, appetite, body temperature and modulation of hormone release. NO is synthesized by the nitric oxide synthase (NOS) family of enzymes. There are three isoforms of NOS: **a)** neuronal NOS (nNOS or NOS I), b) endothelial NOS (eNOS or NOS III) and **c)** inducible NOS (iNOS or NOS II).

Recently there has been a growing interest in the study of the role of NO in neurogenesis, the process by which new neurons are generated in the brain. There is evidence that NO regulates neurogenesis in diverse ways, and NOS are important players in the different effects on the formation of new neurons. Thus, in physiological conditions, NO synthesized from nNOS acts as a negative regulator of neurogenesis, while in inflammatory conditions, such as acute brain injury or neurodegenerative diseases, a decrease in nNOS levels and increased levels of iNOS may enhance neurogenesis. In fact, depending on the source, NO has a pro-neurogenic effect, promoting the proliferation of neural stem cells, as recently described, but also by favouring other steps for neurogenesis, such as migration, differentiation and cell survival. Although the molecular mechanisms underlying this dual effect of NO on neurogenesis are not fully clarified, the modulation of the nitrergic system seems to be a good target for the development of strategies to enhance endogenous neurogenesis after brain injury.

In this work, we describe the use of two different strategies for the potentiation of endogenous neurogenesis by modulating the nitrergic system: **1)** Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor drugs, that elevate cGMP levels; **2)** NO-releasing non-steroidal anti-inflammatory (NO-NSAID) drugs which elevate NO levels as reduce inflammation.

Although little is known about the use of these drugs for the treatment of CNS disorders, the evidence so far on its use are encouraging. Several studies describe the use of these drugs as a strategy to promote regeneration of injured

areas or as an adjuvant therapy in cell replacement since they favor endogenous neurogenesis. Thus, the design of therapeutic strategies using these drugs to improve the efficiency of neurogenesis in the injured CNS appears to be a promising approach to improve brain repair.

Keywords: Nitric oxide, neuroinflammation, neurogenesis, NSAID-NO, PDE5 inhibitor.

Resumo

O monóxido de azoto, também designado por óxido nítrico (NO), é uma molécula gasosa com um importante papel biológico ao nível da comunicação intercelular e da sinalização intracelular em vários sistemas. No sistema nervoso central (SNC), o NO tem sido associado à regulação da plasticidade sináptica e das funções cognitivas, bem como ao controle de funções biológicas, incluindo o ciclo sono-vigília, apetite, temperatura do corpo e regulação da libertação de hormonas. O NO é sintetizado pela família de enzimas sintases do óxido nítrico (NOS), existindo três isoformas: **a)** NOS neuronal (nNOS ou NOS I), **b)** NOS endotelial (eNOS ou NOS III) e **c)** NOS indutível (iNOS ou NOS II).

Recentemente tem havido um crescente interesse no estudo da função do NO na neurogénese, o processo pelo qual são formados novos neurónios no cérebro. Há evidências de que o NO regula a neurogénese de diversas maneiras, sendo as diferentes NOS determinantes para os diferentes efeitos observados. Deste modo, sob condições fisiológicas, o NO sintetizado a partir de nNOS actua como um regulador negativo da neurogénese, sendo que em condições inflamatórias, tais como doenças neurodegenerativas agudas ou lesão cerebral, uma diminuição nos níveis de nNOS e aumento dos níveis de iNOS podem melhorar a neurogénese. De facto, dependendo da origem, o NO tem um efeito pró-neurogénico, promovendo a proliferação de células estaminais neurais, como foi recentemente descrito, podendo também favorecer outros passos da neurogénese, como a migração, diferenciação e sobrevivência celulares. Embora os mecanismos moleculares subjacentes a este duplo efeito do NO sobre a neurogénese não estejam totalmente esclarecidos, a modulação do sistema nitrérgico parece ser um bom alvo para o desenvolvimento de estratégias para melhorar a neurogénese endógena após lesão cerebral.

Neste artigo, descreve-se a utilização de duas estratégias diferentes para a potenciação da neurogénese endógena pela modulação do sistema nitrérgico: **1)** Inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), que elevam os níveis de cGMP, um mediador da acção do NO, **2)** Anti-inflamatórios não-esteróides libertadores de

NO (NO-AINEs) que, além de reduzirem a inflamação, elevam os níveis do próprio NO.

Embora pouco se saiba acerca da utilização destes fármacos para o tratamento de patologias do SNC, as actuais evidências sobre o seu uso são encorajadoras. Vários trabalhos descrevem o uso destes fármacos como uma boa estratégia para a promoção da regeneração de áreas lesadas ou como adjuvante em terapias de substituição celular, dado que potenciam a neurogénese endógena. Assim, a concepção de estratégias terapêuticas que utilizem estes fármacos no sentido de melhorar a eficiência da neurogénese no SNC lesado parece ser uma abordagem promissora para melhorar a reparação cerebral.

Palavras-chave: Óxido nítrico, neuroinflamação, neurogénese, NO-AINEs, inibidores da PDE5.

1. Introdução

O monóxido de azoto, também designado por óxido nítrico (NO), é um radical livre gasoso com um importante papel biológico na comunicação intercelular, bem como na sinalização intracelular em muitos tecidos, nomeadamente ao nível do sistema nervoso central (SNC), em particular no cérebro (revisto por [1]). O NO é sintetizado pela família de enzimas sintases do óxido nítrico (NOS), que convertem o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO (revisto por [2]).

No sistema nervoso central, o NO tem sido associado à regulação da plasticidade sináptica e das funções cognitivas, mas também ao controlo de funções biológicas como o ciclo de sono-vigília, o apetite, a temperatura corporal ou a modulação do sistema endócrino (revisto em [3]). Na última década, tem havido um crescente interesse no estudo do papel do NO na neurogénese, o processo pelo qual são formados novos neurónios no cérebro. O papel do NO enquanto regulador do processo neurogénico surge na dependência das diferentes enzimas responsáveis pela sua formação. Deste modo, em condições fisiológicas, o NO sintetizado pela nNOS actua como um regulador negativo da neurogénese [4-9], enquanto que em condições inflamatórias, como em doenças neurodegenerativas ou na lesão cerebral aguda, uma diminuição nos níveis de nNOS e um aumento na expressão de iNOS actuam como um mecanismo potenciador da neurogénese [8, 10-13]. De facto, dependendo da origem, o NO tem um efeito pró-neurogénico, quer promovendo a proliferação de células estaminais neurais, tal como foi recentemente descrito pelo nosso grupo [13-14], mas também favorecendo outras etapas da neurogénese, tais como a migração [15]; diferenciação e sobrevivência das células recém-formadas [10, 16]. Embora os mecanismos moleculares exactos, subjacentes a este duplo efeito do NO na regulação da neurogénese, não estejam totalmente esclarecidos, a modulação do sistema nitrérgico emerge como um bom alvo para o desenvolvimento de estratégias com vista à potenciação da neurogénese endógena, particularmente após lesão cerebral.

Neste artigo, descreve-se a utilização de duas estratégias diferentes para a potenciação da neurogénese endógena utilizando fármacos cuja acção surge ligada ao sistema nitrérgico: **1)** anti-inflamatórios não esteróides libertadores de óxido nítrico (NO-AINE), **2)** inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). Os inibidores da PDE5 são utilizados na prática clínica para o tratamento de diversas patologias, nomeadamente disfunção eréctil [17] e hipertensão arterial pulmonar [18], enquanto os NO-AINE estão ainda em estudo como uma alternativa aos AINEs no tratamento de condições inflamatórias sistémicas [19]. Embora se saiba pouco acerca da utilização destes fármacos para o tratamento de doenças do SNC, as evidências até à data são encorajadoras. Vários relatórios descrevem estes fármacos como uma boa estratégia para a promoção da regeneração de áreas cerebrais lesadas, ou como adjuvantes em terapias de substituição celular, uma vez que favorecem a neurogénese endógena [20-22]. Assim, a concepção de estratégias terapêuticas que utilizem estes medicamentos para melhorar eficientemente as diferentes etapas da neurogénese, tais como: **a)** a proliferação, **b)** a migração, **c)** a diferenciação, **d)** a integração e, **e)** a sobrevivência de NSC pós-lesão do SNC, parece ser uma abordagem terapêutica promissora para melhorar a reparação do cérebro.

2. Neurogénese no cérebro de mamíferos adultos

A descoberta das células estaminais neurais (NSC) no cérebro de mamíferos adultos contribuiu de forma inquestionável para a compreensão da plasticidade do SNC adulto. São duas as regiões que têm sido classicamente descritas como tendo as características necessárias para a manutenção das NSC: **a)** a zona subgranular (SGZ) do giro dentado (DG) do hipocampo [23-24], e **b)** a zona subventricular (SVZ) ao nível dos ventrículos laterais [25]. As NSC podem ser isoladas a partir da SVZ e SGZ e mantidas em cultura *in vitro* [26], uma vez que algumas das características destas regiões podem ser mimetizadas em cultura, nomeadamente a presença de factores de crescimento tais como o factor de crescimento epidérmico (EGF) [27] e/ou factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) [28].

In vivo, as NSC formadas ao nível da SVZ e SGZ incorrem num complexo processo que conduz, em última instância, à formação de novos neurónios, um fenómeno designado por neurogénese, e que permite a produção contínua de células neuronais ao longo da vida adulta dos mamíferos, incluindo os seres humanos. Genericamente, o processo neurogénico pode ser resumido em seis etapas principais: **1)** proliferação de células precursoras, **2)** determinação do destino destas células; **3)** migração; **4)** diferenciação; **5)** integração funcional no circuito neuronal, e **6)** sobrevivência a longo prazo de novos neurónios. Cada uma dessas etapas é finamente regulada localmente, e vários agentes têm sido descritos como responsáveis pela regulação fisiológica da neurogénese, tais como: EGF, bFGF, Numb, Notch, Sox, Sonic hedgehog, Noggin, entre outros (para revisão ver [29-30]).

A lesão do sistema nervoso central promove a libertação de diferentes sinais a partir das áreas afectadas, num processo associado à tentativa de reparação destas estruturas lesadas e que influencia o ambiente dos nichos neurogénicos e, subsequentemente, o comportamento das NSC, que podem migrar para os locais afectados. A lesão cerebral pode classificar-se em: **a)** aguda, como um traumatismo crânio-encefálico, acidente vascular cerebral isquémico ou crises epilépticas prolongadas, ou **b)** crónica, como doenças neurodegenerativas, cuja progressão é geralmente lenta. Invariavelmente, todas estas condições levam a uma resposta inflamatória [31]. De facto, vários estudos têm demonstrado que a neurogénese no adulto é influenciada por várias condições patológicas [32], como discutido anteriormente [33]. São vários os modelos de lesão cerebral que foram utilizados para demonstrar que a neurogénese é potenciada após lesão, particularmente lesão aguda, o que é geralmente aceite como uma tentativa de reparação do cérebro [33]. Por outro lado, a capacidade neurogénica está diminuída quando em contexto de lesão cerebral crónica, como no caso das doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, doença de Huntington ou a doença de Parkinson [34-36].

No entanto, várias questões permanecem ainda por clarificar, nomeadamente: **a)** quais os factores que regulam a neurogénese durante a resposta

inflamatória, **b)** quais as vias de sinalização envolvidas no recrutamento de NSC para os locais lesados, **c)** de que forma os neurónios recém-formados são integrados e são capazes de sobreviver a longo prazo, **d)** como pode a neurogénese ser modulada com o intuito de melhorar a sua eficiência em contexto inflamatório. A resposta para algumas destas questões é o desafio da Medicina regenerativa e alvo de inúmeros estudos pela comunidade científica nos dias de hoje.

3. Óxido Nítrico

O NO é um radical livre gasoso sintetizado por diferentes membros da família de enzimas da síntese do óxido nítrico (NOS). As NOS estão presentes na maioria dos tecidos do corpo, catalisando a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO [2, 37]. A família de enzimas NOS é caracterizada pela existência de três isoformas distintas nas células dos mamíferos: **a)** a NOS neuronal (nNOS, tipo I), constitutivamente expressa em neurónios, activada por cálcio/calmodulina, após a activação de receptores glutamatérgicos; **b)** a NOS endotelial (eNOS, tipo III), constitutivamente expressa em células endoteliais e astrócitos, regulada pela fosforilação/desfosforilação e/ou por cálcio/calmodulina; e **c)** a NOS indutível (iNOS, tipo II), que pode ser expressa em várias células do sistema imunitário, nomeadamente microglia, macrófagos e neutrófilos, cuja regulação está dependente da síntese *de novo* da enzima, particularmente em condições inflamatórias [2, 38-39].

O NO tem sido descrito como estando envolvido numa variedade de processos fisiológicos, como referido na secção 1 deste artigo, nomeadamente na regulação dos sistemas cardiovascular, imunitário e nervoso (para revisão ver [3]). De referir que o principal mecanismo de regulação da actividade do NO é ao nível da sua síntese. No SNC, o NO tem uma acção distinta quando comparado aos neurotransmissores clássicos, dado que é sintetizado *on demand*, difundindo desde os terminais sinápticos, actuando não só nas células onde é produzido, mas também em células vizinhas [40]. Inicialmente descrito como um mensageiro intracelular, o NO também tem sido associado à plasticidade sináptica, que está

ligada à função cognitiva, ao desenvolvimento neuronal e à modulação da libertação hormonal [41]. Neste contexto, a acção do NO como mensageiro intracelular é mediada pela produção guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP), após a activação dos receptores de glutamato do tipo NMDA [42]. Ao contrário dos neurotransmissores clássicos, que são armazenados em vesículas ou libertados por exocitose e inactivados por recaptação ou degradação enzimática, o NO termina a sua acção após reagir com substratos intracelulares [1]. De acordo com a literatura, a acção do NO no cérebro associa-se a dois resultados diferentes: **a)** regulação de processos fisiológicos, pela sua acção como mensageiro intracelular [41], ou **b)** regulação dos mecanismos de morte celular, devido à sua acção como agente citotóxico [43-44]. Este assunto será abordado na próxima secção 3.1.

3.1 Mecanismos de acção do óxido nítrico

O NO tem sido descrito como estando envolvido na regulação de várias funções fisiológicas, mas também de vários processos fisiopatológicos [2, 37]. A acção do NO, em particular no SNC, é caracterizada pela interacção com vários alvos intracelulares, activando ou inibindo várias vias de sinalização. Aparentemente, esta dupla acção depende isoforma da NOS que catalisa a formação de NO: **a)** o NO formado pela reacção catalizada pela nNOS, ou pela eNOS, está sobretudo envolvido na regulação de funções fisiológicas; e **b)** o NO derivado da iNOS mais envolvido em processos fisiopatológicos. Na verdade, a iNOS não é normalmente expressa no cérebro saudável, contudo na presença de estímulos pró-inflamatórios tais como: **a)** citoquinas; **b)** agentes patogénicos externos, como bactérias ou vírus; ou **c)** stress, como a hipoxia, a iNOS pode ser expressa em macrófagos, astrócitos, microglia e células endoteliais [3,86,94,95], mas também em neurónios [45-46]. No entanto, deve ser mencionado que a presença do neurotransmissor excitatório glutamato durante a resposta inflamatória tem sido associada à activação da nNOS, com a subsequente produção excessiva de NO, consequência também da expressão de iNOS como já foi referido [3]. Uma vez expressa, a iNOS produz NO continuamente, atingindo-

se elevadas concentrações, num processo que pode durar vários dias, que podem ter um efeito citotóxico através da inibição de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e, em última análise, induzindo a apoptose em várias células [47-51]. Um factor essencial para o efeito local do NO é a concentração atingida. Assim, em condições fisiológicas, as concentrações de NO podem variar de 0,1 e 100 nM, valores mais baixos que os detectados em condições que envolvam uma resposta inflamatória [52]. Nestas condições, a acção do NO assenta principalmente na sua ligação ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC), cuja activação conduz à subsequente produção de cGMP [53].

O aumento dos níveis de NO foram ainda relacionados com fenómenos de stress oxidativo e nitrosativo, que têm sido descritos como envolvidos no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas [2, 37]. Uma libertação maciça de NO pode conduzir à produção de dióxido de azoto (NO_2), após a reacção directa entre NO e oxigénio. O NO_2 é altamente reactivo, podendo originar trióxido de diazoto (N_2O_3), após reagir com o NO. Para além disso, o NO_2 também pode oxidar ou nitrar uma vasta variedade de moléculas, sendo a nitração de tirosina, a 3-nitrotirosina, um exemplo clássico [54]. O N_2O_3, por sua vez, está envolvido noutros fenómenos, tais como nitrosação, após reacção com grupos amina ou tiol, sendo um bom exemplo a cisteína, que pode ser nitrosada a S-nitrosocisteina [54]. Além disso, o NO também pode reagir com o superóxido para produzir peroxinitrito (ONOO-), outra molécula extremamente reactiva que pode oxidar ou nitrar outras moléculas, cujo envolvimento na patogénese de diversas doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica, tem sido descrito [2, 55-57]. Tanto a S-nitrosação como a nitração são considerados fenómenos de regulação da actividade e função de proteínas [54]. Deste modo, a compreensão do envolvimento destes fenómenos na etiologia de doenças que afectam o SNC poderá assumir um papel de destaque, dado o potencial terapêutico que a modulação desses processos parece ter.

3.2 Óxido nítrico e neurogénese

O envolvimento do NO na regulação da neurogénese tem sido alvo de intenso debate, dada a discrepância de observações relatadas na literatura. Na verdade, só recentemente o papel do NO na neurogénese foi identificado [4-5, 58]. Dependendo da fonte e concentração atingida localmente no cérebro, o NO tem uma dupla influência na neurogénese, inibindo ou estimulando este processo.

Com base na distribuição das células produtoras de NO relativamente aos nichos de células estaminais, vários trabalhos têm proposto estudar o envolvimento do NO produzido por células/estruturas perivasculares - pericitos e fibroblastos da músculatura lisa, células endoteliais, microglia e células progenitoras gliais e terminações astrocíticas - na regulação da neurogénese. A maioria destes trabalhos reforçam o envolvimento do NO na regulação das diferentes vias de sinalização da angiogénese e neurogénese [4, 59]. Na verdade, a descoberta da expressão de eNOS ao nível de vasos sanguíneos e de nNOS em neurónios, perto da SVZ e SGZ, foi essencial para o estabelecimento de uma relação causal entre a importância da formação do NO e a formação de novos neurónios. Além disso, também foi demonstrada a função citostática do NO ao nível do SNC, dado que o NO derivado da nNOS está envolvido na regulação da neurogénese, especialmente pela regulação da função de NSC [4-5, 58]. Assim, a produção de NO ocorre em estreita proximidade com os nichos neurogénicos, onde se encontram as NCS. Outros autores mostraram ainda que os neurónios que expressam nNOS se dispõem ao longo de todo o fluxo migratório rostral (RMS), em estreita relação, atribuindo por isso uma acção reguladora do NO na migração de células progenitoras derivadas da SVZ ao longo do RMS [60].

Embora a maioria dos estudos realizados inicialmente descrevessem o NO como um agente anti-neurogénico no cérebro adulto normal, em condições de stress, nomeadamente na isquémia ou na hipoxia, o seu efeito pode ser radicalmente diferente, favorecendo a proliferação de células estaminais, como demonstrado em estudos mais recentes [4, 12-13, 59, 61-62]. De facto, a tensão do oxigénio no ar ambiente parece modular o efeito do NO perivascular na neurogénese [62-63], que pode variar desde: **a)** uma acção pró-neurogénica,

dependente da expressão de eNOS e nNOS, em condições fisiológicas [59]; a **b)** uma acção anti-neurogénica, dependente da expressão de iNOS em condições extremas, tais como hipóxia ou isquémia [12-13, 64-65]. No entanto, para que se possa entender claramente o envolvimento do NO produzido pelas diferentes células do nicho perivascular na regulação da neurogénese, são necessários mais estudos. De facto, continua por esclarecer qual o limite de stress oxidativo, e/ou outros estados redox, que levam à produção de NO por cada isoforma da NOS - nNOS, eNOS e iNOS – e deste modo se possa entender o envolvimento do NO produzido a nível perivascular na neurogénese.

Durante o desenvolvimento embrionário, o NO é produzido no cérebro em diferentes regiões [66-68]. Na verdade, no córtex, existem dois tipos de neurónios com NOS cuja distribuição é de particular interesse devido à relação entre os locais de produção de NO e o desenvolvimento de determinadas patologias [69]. De facto, a localização da nNOS no SNC pode explicar as diferentes funções do NO produzido por esta enzima [69]. Como exemplo, refira-se que a expressão pré ou pós-sináptica da nNOS determina diferentes funções do NO aí produzido [70-71]. Outro exemplo é o bolbo olfactivo (OB), onde a nNOS é altamente expressa em neurónios do epitélio olfactivo em desenvolvimento, durante a embriogénese [70, 72], e nas células periglomerulares e granulares no OB no adulto [70, 73], sendo necessária para o desenvolvimento pós-natal e para a organização glomerular do OB, respectivamente [73-74]. Além disso, após lesão do OB, o aumento da expressão de nNOS foi descrito como envolvido na reparação da área afectada [67, 72-73].

A produção de NO pode ser induzida por factores neurotróficos, o que resulta num efeito antiproliferativo em células alvo pela indução da paragem ciclo celular, favorecendo a diferenciação celular [75-77]. A maioria dos estudos sobre o envolvimento do NO na neurogénese adulta tem vindo a caracterizar o seu efeito na proliferação celular. No entanto, a avaliação da sobrevivência de neurónios e integração dos neurónios recém-formados no circuito neuronal é também importante, dado que o NO é conhecido por ser um importante regulador da apoptose [78]. Neste contexto, vários estudos têm demonstrado que o NO

aumenta a sobrevivência a curto prazo da progenia de células progenitoras ao nível do DG de ratos adultos, por inibição da apoptose depois de SE [79], prevenindo a activação de caspase-3 [80].

3.2.1 Acção anti-neurogénica do óxido nítrico

O efeito anti-neurogénico do NO tem sido atribuído à sua produção através de nNOS, tal como demonstrado em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. Assim, vários autores descreveram um efeito anti-proliferativo do NO derivado da nNOS, o qual parece estar também envolvido na diferenciação neuronal, plasticidade sináptica e sobrevivência celular [4-6, 81-82]. Este efeito anti-proliferativo do NO foi confirmado por vários autores, que mostraram que a inibição da produção de NO por infusão intra-ventricular de um inibidor de NOS, ou pelo silenciamento de nNOS, resultou num aumento da proliferação celular no DG ou na zona subependimal do OB de roedores [4, 6-7, 59]. Outros estudos foram realizados, em que a inibição selectiva de nNOS com 7-nitroindazol (7-NI) mostrou aumentar a proliferação celular na SVZ, RMS e OB de ratos adultos, mas não no DG [5]. Além disso, inibindo a nNOS, demonstrou-se o aumento da neurogénese e subsequente redução da área lesada, após um acidente vascular cerebral [83]. A presença de neurónios diferenciados, produtores de NO, na periferia dos nichos contendo NSC, principalmente em torno do SVZ, contribui para a regulação fisiológica inibitória da neurogénese [5, 60]. Por outro lado, a acção inibitória do NO produzido pela nNOS na neurogénese foi também demonstrado no DG, após isquémia cerebral [83]. No DG, os precursores neurais da SGZ estão em estreita proximidade com os neurónios produtores de NO do *hilus*, sugerindo assim uma acção do NO no controlo da neurogénese adulta, nesta região [84]. Estes estudos mostraram que a inibição crónica da nNOS aumenta a neurogénese, apoiando a ideia de que, fisiologicamente, o NO produzido pela nNOS tem um efeito anti-neurogénico. Recentemente, vários estudos têm sugerido um mecanismo para este efeito negativo do NO sobre a neurogénese. Os autores destes trabalhos sugeriram a inibição do receptor do EGF [82], através de um mecanismo dependente da nitrosação de resíduos de cisteína específicos, e a activação da via de sinalização

do fosfoinositídeo 3-cinase (PI3-K)/Akt [9], como os principais mecanismos pelos quais o NO regula negativamente a neurogénese na SVZ (Tabela I). Além disso, estes autores descreveram o efeito anti-mitótico do NO como estando relacionado com a presença do inibidor da cinase nuclear dependente de ciclina p27Kip1 [9].

3.2.2 Acção pró-neurogénica do óxido nítrico

A acção pró-neurogénica do NO foi avaliada em diversos estudos utilizando abordagens genéticas ou farmacológicas, mostrando que os níveis aumentados de iNOS após lesão do cérebro estão relacionados com o aumento da neurogénese no hipocampo, o que se correlaciona com a diminuição simultânea dos níveis de nNOS [8, 85-87] (Tabela I). No entanto, num estudo acerca do efeito do NO sobre a proliferação celular, foi descrito o envolvimento do NO derivado de ambas as nNOS e iNOS na melhoria da neurogénese no DG de ratos adultos, após convulsões [88]. Outros estudos também demonstraram que o NO sintetizado pela iNOS, após isquémia, ou pela eNOS estimula a neurogénese na SVZ ou no DG, respectivamente [12, 61]. Além disso, o nosso grupo recentemente mostrou que o NO derivado da iNOS promove a proliferação de NSC no hipocampo de ratos adultos, após *status epilepticus* (SE) [13]. Após lesão cerebral aguda, a resposta neuroinflamatória caracteriza-se pela activação de células da microglia, que expressam continuamente iNOS, levando à produção de grandes quantidades de NO, o que se demonstrou ser favorável à neurogénese [89].

Embora algumas questões permaneçam por responder, vários estudos têm procurado explorar as vias de sinalização envolvidas na acção pró-neurogénica do NO de origem inflamatória, particularmente, na regulação da proliferação de NSC. Recentemente, o nosso grupo mostrou que as concentrações de NO suprafisiológicas induzem a proliferação de NSC da SVZ através da activação de, pelo menos, duas vias de sinalização: **a)** a via da proteína cinase activada por mitogénio (MAP), nomeadamente da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) 1 e 2; e/ou **b)** a via da proteína cinase dependente de cGMP (PKG) (Figura 1). O efeito proliferativo do NO parece ser inicialmente mediado pela activação

directa da via de sinalização da ERK 1/2 [13]. O aumento da activação desta via de sinalização após exposição ao NO, leva à activação de vários efectores a jusante, nomeadamente a cinase p90RSK, levando subsequentemente à diminuição dos níveis nucleares da p27Kip1, o que permite a progressão do ciclo celular e divisão celular (Figura 1A) [13]. Por outro lado, a activação da PKG parece ocorrer na sequência de um período de exposição mais prolongado (24 horas) a altas concentrações de NO (Figura 1B) [14].

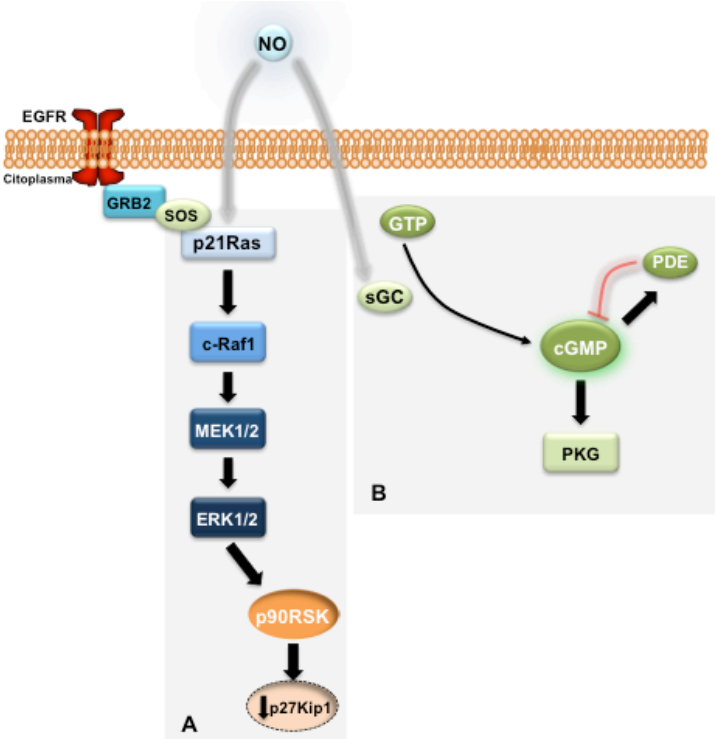

Figura 1 Regulação da proliferação de NSC pelo NO [13]. A) O efeito proliferativo do NO pode ser mediado pela activação directa da via de sinalização da ERK 1/2. A activação desta via de sinalização pelo NO, leva à activação da cinase p90RSK, levando subsequentemente à diminuição dos níveis nucleares da p27Kip1, permitindo a progressão do ciclo celular e divisão celular. **B)** O efeito proliferativo do NO pode ser mediado também pela activação da via da PKG, que ocorre na sequência de períodos de exposição mais prolongados a altas concentrações de NO.

De referir, que o envolvimento do NO na regulação de outras etapas da neurogénese também foi investigado por outros autores. De acordo com a literatura, o NO libertado em condições inflamatórias está igualmente envolvido na diferenciação de NSC, nomeadamente em astrócitos. Este processo, também

denominado como astrogliogénese, ocorre por intermédio de um mecanismo dependente da activação da via de transdução de sinal JAK/STAT-1 [52]. Em conjunto, estes trabalhos mostram que o NO é um importante regulador de neurogénese. O efeito do NO sobre a neurogénese parece ser dependente do tempo de exposição, bem como da fonte de NO. Além disso, dependendo da concentração local e meio ambiente circundante, o NO pode regular a neurogénese de duas formas opostas: favorecendo-a, ou reduzindo-a [84, 90-91].

Como referido anteriormente, o efeito do NO dependente dos níveis atingidos localmente no cérebro. Assim, em condições fisiológicas, o NO inibe a neurogénese [4-5, 58], ao passo que em condições inflamatórias, pela diminuição na expressão da nNOS e o aumento da iNOS, melhora a neurogénese [12-13, 82, 92-93]. No entanto, os mecanismos moleculares exactos e subjacentes a esta dupla acção do NO não são totalmente conhecidos e são necessários mais estudos para determinar os alvos intracelulares do NO, com o intuito de identificar potenciais alvos terapêuticos avaliando se a modulação da actividade destas moléculas melhora a neurogénese. A maioria dos fármacos utilizados em estudos de caracterização do envolvimento do NO na neurogénese são utilizados com outros fins terapêuticos, que não o tratamento duma lesão cerebral. Assim, a sua utilização enquanto estratégia terapêutica para melhorar a neurogénese deve ser explorada. De seguida, algumas das mais promissoras abordagens farmacológicas destinadas a modular as vias de sinalização dependentes de NO serão discutidas.

4. Neuroinflamação

A neuroinflamação é uma resposta biológica a estímulos nocivos que afectam o SNC, tais como stress, lesão ou infecção por agentes patogénicos externos [94-95]. O principal papel da resposta inflamatória é o de proporcionar um ambiente prejudicial para os agentes externos que causam lesões num determinado organismo ou estrutura orgânica e recuperar a sua homeostasia. Ao nível do SNC, a resposta inflamatória é mediada pela activação de dois grandes grupos de células do sistema imunitário: **a)** células residentes no SNC - microglia e astrócitos e, **b)** células do sistema hematopoiético que migram para o SNC -

linfócitos, monócitos e macrófagos [96-97]. A activação destas células é caracterizada pela libertação de diversas substâncias reguladoras, incluindo: quimiocinas, tais como o factor derivado do estroma (SDF)-1alfa; moléculas do complemento; proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1); citocinas, tais como o interferão (IFN)-gama, factor de necrose tumoral (TNF)-alfa), interleucina (IL)-1beta, IL-18 e IL-6; glutamato; espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de nitrogénio (RNS), onde se inclui o NO (para revisão ver [33]). Embora a função principal da neuroinflamação seja a de proteger o cérebro promovendo a remoção de estímulos nocivos e células comprometidas/mortas, restabelecendo assim a homeostasia do tecido cerebral, esta pode também assumir um papel nocivo quando desregulada e contribuir para a perpetuação do dano tecidular secundário, como relatado anteriormente [98]. Na verdade, a geração de um ciclo vicioso onde ocorre um *feeedback* positivo que leva à activação constante da resposta inflamatória pelos agentes por si formados pode resultar na perda neuronal e/ou lesão neuronal.

Em suma, a neuroinflamação pode ter um duplo efeito sobre o ambiente celular, sendo benéfica ou prejudicial, dependendo do tempo e do estado de activação das células que medeiam a resposta inflamatória [99].

Deste modo, a resposta inflamatória tem sido associada aos mecanismos subjacentes a várias doenças do sistema nervoso central, interferindo igualmente na homeostasia das regiões SVZ e SGZ, comprometendo em última instância a neurogénese [100]. Se isso significa que a inflamação é sempre prejudicial para a neurogénese, ou se é prejudicial apenas quando a homeostasia da SVZ e / ou SGZ está comprometida, será discutida na secção seguinte.

4.1 Neuroinflamação e neurogénese

Como mencionado na secção anterior, é agora amplamente aceite que a neuroinflamação regula a neurogénese de forma ambígua [101]. Assim, dependendo da gravidade e da complexidade da resposta inflamatória, que pode variar desde uma leve resposta aguda a um processo crónico descontrolado, a neurogénese podem ser duplamente regulável sendo favorecida ou,

alternativamente, prejudicada. Factores como **a)** o tipo de estímulo inflamatório, **b)** o tipo de células inflamatórias, **c)** o tipo de mediador inflamatório, **d)** a área de tecido afectada e **e)** o tempo que as células inflamatórias, particularmente microglia, permanecerão activadas, são determinantes para a mudança de um estado inflamatório pró-neurogénico a um estado inflamatório anti-neurogénico [102].

Neste contexto, o envolvimento de um tipo particular de células inflamatórias, tais como as células da microglia, cuja activação é considerada um marcador da neuroinflamação, parece ser de grande importância para a regulação da neurogénese. A microglia deriva da mesoderme, sendo uma representante do sistema mononuclear fagocitário, ou sistema retículo-endotelial, ao nível do SNC. As principais características da microglia são: **a)** apresentação de receptores do tipo Toll; **b)** moléculas de apresentação de antigénios do MHC (classe II); **c)** apresentação de receptores *scavenger*; **d)** apresentação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs); e **e)** produção de várias citocinas e outros factores inflamatórios (ROS e RNS) [103].

Durante muito tempo, as células da microglia foram consideradas como os agentes nocivos da resposta inflamatória, com um padrão de resposta que conduzia invariavelmente a um efeito prejudicial sobre o ambiente neuronal circundante. No entanto, estudos recentes descrevem a actividade da microglia como sendo "plástica" (para revisão ver [101]. Na verdade, a plasticidade da actividade microglial parece ser um factor determinante para a dupla regulação da neurogénese, uma vez que esta pode assumir diferentes morfologias e diferentes fenótipos e, subsequentemente, libertar diferentes mediadores químicos no decorrer de uma resposta inflamatória que podem influenciar a fisiologia das NSC [13, 101, 104].

Tabela I Regulação da neurogénese adulta dependente de óxido nítrico.

Fonte de NO	**Proliferação de NSC**		**Diferenciação de NCS**		**Sobrevivência de NSC**		**Via de sinalização**	**Referências**
	SVZ	**DG**	**SVZ**	**DG**	**SVZ**	**DG**		
nNOS	-	0	=	0	=	0	Nitrosação do receptor EGF	[9]
	-	0	=	0	0	0	Via da (PI3-K)/Akt	[9, 82]
	0	-	0	-	0	0	PSA-NCAM e CREB	[105]
	0	-	0	-	0	-	Fosforilação do cAMP	[6]
eNOS	+	0	+	0	0	0	BDNF e VEGF	[106]
	0	+	0	+	0	=	VEGF	[61]
iNOS	+	0	0	0	=	0	Via da ERK 1/2	[13]
							Via do cGMP/PKG	[14]
	+	+	+	+	0	=	Receptor NMDA	[107-109]
	+	+	+	+	0	0	L-VGCC	[110]
	+	0	+*	0	=	0	Via da JAK/STAT-1	[52]

Os efeitos elencados na tabela I podem ser indirectos. +, aumenta; -, diminui; =, não altera; 0, sem descrição na literatura; Polysialylated-neuronal cell adhesion molecule, PSA-NCAM; cAMP response element-binding, CREB; Brain-derived neurotrophic factor, BDNF; Vascular endothelial growth factor, VEGF; L-type voltage-gated Ca^{2+} channel, L-VGCC. * - astrogliogenese.

Vários estudos têm relatado o envolvimento de diferentes mediadores inflamatórios derivados da microglia na regulação da neurogénese e/ou neuroprotecção [33, 111-112]. Além disso, tem sido descrito que a activação crónica da microglia pode estimular uma ou mais fases da neurogénese, como a proliferação, migração e diferenciação de NSC, afectando contudo a sobrevivência a longo prazo dos neurónios recém-formados [33].

4.1.1 Acção anti-neurogénica da inflamação

A neuroinflamação, em particular a activação da microglia, foi descrita inicialmente como sendo prejudicial para a neurogénese [113-114]. Diversos estudos demonstraram que a activação da microglia após exposição ao lipopolissacarídeo (LPS) afecta a neurogénese em ratos adultos [113], através de um mecanismo mediado pelo aumento da produção de TNF-alfa [115-116]. Outros estudos relacionaram este efeito anti-neurogénico da inflamação com o aumento da produção de outros mediadores pró-inflamatórios, tais como as interleucinas IL-1 beta e IL-6, ou citocinas IFN-gama e TNF-alfa [117-120]. Além disso, as ROS e RNS, em particular o NO, têm sido descritos como envolvidos no efeito prejudicial da neuroinflamação na formação de novos neurónios no cérebro de roedores adultos, como referido anteriormente [114, 121-122]. Na Tabela II, resumem-se as principais conclusões sobre o efeito dos mais importantes mediadores pró-inflamatórios na neurogénese.

Além disso, o papel deletério da inflamação na neurogénese foi corroborado por numerosos estudos que demonstraram que a neurogénese pode ser restabelecida quando a resposta inflamatória é controlada através da administração de: **a)** antibióticos, tais como a minociclina [113, 123-124], ou **b)** anti-inflamatórios não-esteroides, tais como a indometacina [113-114, 125-126].

4.1.2 Acção pró-neurogénica da inflamação

Contrariamente às observações inicialmente publicadas, estudos recentes indicam que a neuroinflamação também pode suportar diferentes fases da neurogénese, favorecendo assim a formação de novos neurónios após lesão do

SNC [103]. Assim, o microambiente gerado pela resposta inflamatória é responsável pelo envio de "sinais de activação" das NSC, residentes em nichos neurogénicos, como a SVZ ou a SGZ, que depois migram para as áreas lesadas onde se diferenciam e passam a integrar a rede neuronal [109, 127]. Neste contexto, as células da microglia são descritas como centrais na regulação deste processo, o que sugere uma acção ambígua da microglia na regulação da neurogénese aquando duma resposta inflamatória [128].

Embora a microglia possa ser prejudicial para a formação de novos neurónios em fases iniciais da resposta inflamatória após lesão aguda, uma resposta inflamatória prolongada, também referida como inflamação crónica, parece ter um efeito protector ao regular a substituição das células danificadas ou perdidas [104, 129-132]. Assim, foi demonstrado em vários estudos que a inibição da activação da microglia resulta na produção contínua de novos neurónios a partir de NSC adultas [133-134]. Além disso, a activação crónica da microglia é concomitante com uma maior sobrevivência a longo prazo dos neurónios recém-formados [135-136].

Diversos mediadores pró-inflamatórios têm sido relacionadas com o efeito pró-neurogénico da inflamação, incluindo: **a)** citocinas, tais como IFN-gama e TNF-alfa; **b)** quimiocinas, tais como SDF-1alfa e seu receptor CXCR4 [133, 137]; ou **c)** factores tróficos tais como BDNF e GDNF, envolvidos na remoção de sinapses danificadas [136] (Tabela II). Além do efeito pro-neurogénico, estes estudos também sugerem um papel neuroprotector das células da microglia nas células neuronais recém-formadas.

4.2 Estudos futuros

No geral, parece claro que é necessário mais conhecimento sobre o *crosstalk* entre a inflamação e a neurogénese. Será porventura necessária uma melhor caracterização genética e proteómica da microglia aquando duma resposta inflamatória, bem como estudos mais específicos para esclarecer de que forma a neuroinflamação regula cada uma das etapas da neurogénese. Identificar quais os genes expressos, e, posteriormente, que tipo de proteínas estão presentes durante

uma resposta inflamatória permitirá o desenvolvimento de diferentes estratégias para controlar ou mitigar os efeitos deletérios da neuroinflamação na neurogénese.

5. Potencial terapêutico da modulação da acção do NO

Em condições fisiológicas, as células e tecidos lesados são continuamente reparados, a fim de manter a homeostasia e o funcionamento normal do organismo. A desregulação e/ou mau funcionamento dos mecanismos de auto-regeneração tecidular, pode levar a diversas patologias, como referido nas secções 3 e 4. No SNC adulto, a principal limitação que os investigadores enfrentam é a capacidade limitada de regeneração. Além disso, este processo é ainda mais limitado durante condições inflamatórias, onde o microambiente circundante é prejudicial à sobrevivência das células recém-formadas [102]. As lesões cerebrais agudas, como os acidentes vasculares cerebrais, lesões medulares, trauma e convulsões, são acompanhados de uma resposta inflamatória, resultando numa significativa perda neuronal [102]. A neuroinflamação é também uma característica marcante de várias patologias crónicas, tais como doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson [33]. Assim, para superar a capacidade limitada de reparação do cérebro e, como tentativa de reverter a perda neuronal em contexto inflamatório, têm sido estudadas algumas estratégias terapêuticas. Neste contexto, as estratégias mais promissoras incluem: **a)** a estimulação da neurogénese endógena; ou **b)** o transplante de células estaminais/precursoras neurais. De facto, o transplante de células estaminais exógenas é uma abordagem complexa, com várias desvantagens, incluindo questões éticas. Além disso, o risco de rejeição e a proliferação descontrolada das células transplantadas, que podem levar à formação de tumores, levanta algumas preocupações sobre a sua verdadeira aplicabilidade terapêutica.

No entanto e apesar da potenciação da neurogénese endógena parecer ser uma abordagem melhor, com maior possibilidade de aplicação terapêutica, há que ter em linha de conta algumas desvantagens/limitações, tais como: **a)** o baixo rendimento da formação de novos neurónios; **b)** a baixa taxa de sobrevivência a longo prazo de novos neurónios; e **c)** a pouca especificidade desta abordagem para

que a neurogénese seja potenciada na área lesada. Nesta secção, será abordada a potenciação da neurogénese endógena, nomeadamente ao nível da SVZ e SGZ, recorrendo às vias de sinalização envolvidas na bioactividade do NO.

Como discutido na secção 3.2, o NO tem sido amplamente descrito como um duplo regulador da neurogénese adulta, podendo estar envolvido na regulação da proliferação, migração, diferenciação neuronal e sobrevivência da NSC (ver Tabela II). A grande maioria dos estudos encontrados na literatura, caracterizou o envolvimento do NO na regulação da proliferação de NSC. De facto, conforme relatado pelo nosso grupo, o NO de origem inflamatória tem um efeito proliferativo na SVZ e SGZ [13]. No entanto, a fim de compreender como as diferentes etapas do processo neurogénico são reguladas em contexto inflamatório, são necessários mais estudos acerca do envolvimento do NO na regulação da: **a)** migração; **b)** diferenciação em neurónios funcionais que devem integrar correctamente os circuitos neuronais existentes; **c)** e sobrevivência destes neurónios recém-formados. Embora pouco se saiba sobre a aplicabilidade *in vivo* desta estratégia, as evidências mais recentes são encorajadoras, demonstrando que a modulação farmacológica do sistema nitrérgico pode favorecer a neurogénese [138-139]. No entanto, esta abordagem não deve ser considerada isoladamente regenerativa em contexto regenerativo, mas sim como estratégia adjuvante para assegurar uma terapia eficaz. Por conseguinte, duas estratégias diferentes devem ser consideradas para a potenciação da neurogénese: **a)** aumento dos níveis de NO, com recurso a fármacos dadores de NO, particularmente anti-inflamatórios não esteróides dadores de NO (NO-AINEs); e **b)** prevenção da degradação de cGMP pela utilização de inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE5). Em seguida, estas abordagens terapêuticas serão discutidas.

Tabela II Regulação da neurogénese adulta pelos mediadores da resposta inflamatória.

Mediador inflamatório	**Proliferação de NSC**		**Diferenciação de NCS**		**Sobrevivência de NSC**		**Via de sinalização**	**Referências**
	SVZ	**DG**	**SVZ**	**DG**	**SVZ**	**DG**		
IL-1 beta	-	-	0	0	+	+	SAPK/JNK	[140-141]
IL-6	-	-	-	-	-	-	JAK/STAT and MAPK	[113, 121, 131]
IFN-gama	-	0	+	+	-	0	ERK 1/2 pathway	[117, 128, 142-144]
	+	0	0	0	=	0	NF-kappaB	[145-146]
TNF-alfa	+	0	0	-	0	-	0	[115]
	0	0	0	0	-	-	TNF-R1 and TNF-R2	[118, 142]
	+	0	-	0	=	0	TNF-R1	[147]
	+	+	+	+	+	+	TNF-R2	[148]
	+	0	+	0	+	0	TNF-R1	[149]
	0	-	0	-	+	0	TNR-R1	[119]
	+	+	+	+	+	+	TNF-R2	[102, 119]
SDF-1alfa	+	+	+	0	+	0	CXC-R4	[133, 137, 150]

Os efeitos listados na Tabela II poderão ser indirectos. +, aumenta; -, diminui; =, não altera; 0, sem descrição na literatura.

5.1 Anti-inflamatórios não esteróides dadores de NO

Os fármacos libertadores de NO têm sido amplamente utilizados em vários estudos de caracterização do envolvimento do NO na regulação das diferentes etapas da neurogénese endógena. Estas ferramentas farmacológicas foram essenciais para entender que os efeitos mediados pelo NO ao nível da neurogénese são dependentes do tempo de exposição e da concentração [14, 52]. Está disponível uma grande variedade de compostos libertadores de NO, sendo os mais comuns os diazeniodiolatos, também conhecidos como NONOates (tais como o DEA/NO, SPER/NO ou DETA/NO), que libertam espontaneamente o NO em condições fisiológicas [151]. Os NONOates também foram utilizados em vários estudos para investigar o efeito das concentrações suprafisiológicas do NO na neurogénese, mimetizando assim as elevadas concentração de NO atingidas no cérebro em condições inflamatórias [13, 52]. No entanto, os fármacos libertadores de NO são quimicamente distintos, com tempos de semi-vida diferentes, libertando quantidades diferentes de NO *in vitro*. As principais desvantagens da utilização destes fármacos relacionam-se com a incapacidade de controlar a quantidade de NO libertado *in vivo*, mas também na incapacidade de libertar NO especificamente no tecido/células pretendidas. Além disso, factores como o pH, a temperatura e a luz, podem alterar a libertação de NO por estes compostos [151-152]. Como descrito acima, dado que diferentes quantidades de NO têm diferentes efeitos sobre a neurogénese, é essencial controlar a libertação de NO, de modo a mantê-lo em níveis que favoreçam o processo neurogénico. Assim, a necessidade de desenvolver novos fármacos libertadores de NO, com o intuito de superar estas desvantagens, torna-se evidente.

Mais recentemente, uma nova classe de compostos libertadores de NO for desenvolvida, os NO-AINEs. Estes fármacos são sintetizados por adição de um grupo dador de óxido nítrico a um AINE clássico e apresentam algumas vantagens sobre eles, como se indica a seguir. Os AINEs convencionais são compostos de largo espectro utilizados devido às suas propriedades como analgésicas, antipiréticas e, em doses mais elevadas, anti-inflamatórias. No entanto, o uso crónico de AINEs tem implicações clínicas, principalmente devido ao aumento

dos efeitos colaterais no tracto gastrointestinal (GI), no sistema cardiovascular e sistema renal (para revisão ver [153-155]). Os AINEs tradicionais exercem o seu efeito através da inibição de ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), bloqueando assim a síntese de prostaglandinas. A maioria dos efeitos colaterais associados à utilização destes fármacos estão associados com a inibição da via da COX-1 e subsequente diminuição das prostaglandinas gastroprotectoras.

Com o intuito de melhorar estes efeitos medicamentosos adversos e melhorar a segurança dos AINEs, foram desenvolvidos novos fármacos: **a)** os coxibes, inibidores selectivos da COX-2, e **b)** pró-fármacos híbridos, que incluem os NO-AINEs. Estes últimos, tiram partido de algumas características do NO, tais como o seu potente efeito vasodilatador, a inibição da adesão de leucócitos ao endotélio vascular gástrico e inibição da actividade de caspases, mimetizando assim, os efeitos biológicos das prostaglandinas no tracto GI [19, 156-157]. Neste âmbito, vários estudos *in vivo* mostraram que o NO libertado pelos NO-AINEs possui um perfil de toxicidade gastrointestinal reduzido, quando comparado com AINEs clássicos, sem afectar a sua eficácia anti-inflamatória [158-160]. Doses baixas de dadores de NO convencionais inibem a apoptose *in vivo*, através da inibição da actividade das caspases e, consequentemente, poupam a mucosa gástrica do efeito pro-apoptótico induzido pelo TNF-alfa, um efeito que parece ser dependente da formação de cGMP [160-163]. O NO libertado pelos NO-AINEs inactiva as caspases, contribuindo para o efeito protector da mucosa gástrica. Além disso, estes fármacos libertam NO em quantidades similares às obtidas *in vivo* pela acção da NOS constitutiva, o que parece estar ligado a uma toxicidade reduzida quando comparada com o AINE isoladamente [19, 164]. A velocidade relativamente lenta de libertação do NO pelos NO-AINEs clássicos, quando comparado com os dadores de NO convencionais, tais como o nitroprussiato de sódio (SNP) [165], permite uma libertação mais controlada de NO e um efeito protector de longa duração, o qual deve ser considerado uma das principais vantagens da utilização destes fármacos. Deste modo, o facto de não ocorrer uma libertação massiva e abrupta de NO com a utilização destes fármacos, é evitada a excitotoxicidade quando comparados com os fármacos clássicos. A doença de

Alzheimer caracteriza-se pela existência de um ambiente inflamatório crónico, em que vários mediadores pró-inflamatórios são libertados, tais como as citocinas IL-1beta e TNF-alfa [166], sendo a concomitante activação de caspases responsável por processos de morte neuronal [167]. Observou-se que a administração crónica de AINEs poderá reduzir o risco de desenvolver doença de Alzheimer [168-171], melhorando também o decréscimo nas funções cognitivas de doentes com esta patologia (revisto em [172]). Outros estudos foram realizados para estudar o efeito de fármacos anti-inflamatórios no tratamento de lesões cerebrais agudas, tais como *status epilepticus* e isquémia. Neste contexto, os medicamentos anti-inflamatórios, tais como a indometacina, têm sido descritos como responsáveis pela redução da activação da microglia, promovendo a proliferação de células estaminais neurais e melhorando também a migração e sobrevivência das células recém-formadas, restaurando, assim, a neurogénese após irradiação craniana ou isquémia focal [114, 173]. Por isso, embora os efeitos neuroprotectores dos AINEs tenham sido recentemente descritos na literatura, após estudos em modelos animais de inflamação crónica do cérebro, os efeitos adversos dos AINEs noutros sistemas biológicos não deve ser ignorado. Dadas as vantagens dos NO-AINEs, e dada a sua capacidade de atravessar rapidamente a barreira hemato-encefálica (BHE) [174], estes fármacos têm sido considerados para o tratamento de patologias do SNC, em particular para o controlo da neuroinflamação que, como já discutido, pode afectar a neurogénese [164]. No entanto, até ao momento, pouco se sabe sobre o efeito dos NO-AINEs na neurogénese após lesão cerebral aguda ou crónica. Estudos em modelos de inflamação crónica do cérebro, mostraram que a administração crónica de NO-flurbiprofeno atenua significativamente a inflamação cerebral pela diminuição da densidade e do estado reactivo da microglia [175-176]. Um trabalho em particular, demonstrou que o tratamento com o NO-flurbiprofeno reduz a neuroinflamação em ratos adultos jovens, atenuando os efeitos da activação da microglia, mas não em ratos idosos [177]. Com base nestes resultados, os autores deste estudo sugerem a hipótese do uso deste medicamento em estadios precoces da doença de Alzheimer, antes do desenvolvimento de eventos inflamatórios crónicos associados à idade e

envelhecimento [177]. Embora a maioria dos trabalhos refira os AINEs como agentes que diminuem os níveis de iNOS, o NO-flurbiprofeno parece aumentar a expressão desta enzima em células da microglia activadas pelo LPS [178]. Este efeito conduz a um aumento ainda maior nos níveis de NO, o que tem sido atribuído ao NO libertado a partir do NO-flurbiprofeno, uma vez que com dadores de NO clássicos se obtiveram resultados semelhantes. Curiosamente, a presença de iNOS, em células da microglia, na sequência de uma lesão cerebral correlaciona-se com o aumento da proliferação de NSC na SGZ após SE, promovendo assim a etapa inicial da neurogénese [13].

Em suma, os efeitos benéficos dos NO-AINEs observados em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas são encorajadores para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com recurso a esses fármacos, com vista ao controlo da neuroinflamação e potenciação da neurogénese endógena [164]. No entanto, são necessários mais estudos a fim de compreender os mecanismos e quais as doses de NO-AINEs que podem promover a neurogénese.

5.2 Inibidores da fosfodiesterase-5

O principal alvo intracelular do NO é o grupo heme da enzima sGC. Activação da sGC leva à da produção de cGMP [53, 179], que subsequentemente activa a PKG [180-181]. A PKG regula diversos processos fisiológicos, como a plasticidade sináptica ou a síntese e libertação de neurotransmissores (revisto por [182]). Em condições fisiológicas, os níveis intracelulares de cGMP são controlados por intermédio de fosfodiesterases (PDE), enzimas que hidrolisam a ligação 3'-fosfodiéster de nucleótidos cíclicos, tais como o AMP cíclico (cAMP) ou o cGMP, originando os nucleótidos inactivos 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente. As PDE são enzimas ubíquas, classificadas em 11 famílias, de acordo com a sua especificidade para substratos, propriedades cinéticas e distribuição intracelular (para revisão ver [183]). Como as diferentes famílias de PDE apresentam uma distribuição extensa por vários tecidos, incluindo o cérebro, a inibição de uma ou mais PDE tem sido estudada como estratégia para o tratamento de diversas doenças, principalmente por intermédio do controlo dos

níveis de cAMP e/ou cGMP, importantes mensageiros secundários em diferentes vias de sinalização. As funções fisiológicas dependentes de cGMP, podem ser reguladas pelo controlo da actividade da isoenzima PDE tipo 5 (PDE5), que hidrolisa especificamente cGMP. Assim, uma boa estratégia para aumentar os níveis intracelulares de cGMP será através de inibição desta enzima [184]. A PDE5 é uma enzima citosólica amplamente expressa, cuja actividade foi descrita no pulmão, músculo liso da traqueia e vasos sanguíneos, baço, plaquetas, corpos cavernosos [185-187], bem como em várias regiões do cérebro, incluindo células de Purkinje e SVZ [188-190]. A PDE5 e o efeito da sua inibição têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas e vários fármacos têm sido desenvolvidos. Neste contexto, o inibidor da PDE5 mais bem caracterizado é o sildenafil, disponível comercialmente como Viagra, um medicamento utilizado para o tratamento da disfunção eréctil e da hipertensão arterial pulmonar. No entanto, além da PDE5, o sildenafil também inibe a PDE1 e 6, embora em menor extensão [191]. A fim de colmatar esta inespecificidade na acção do sildenafil, outros inibidores mais selectivos da PDE5 foram desenvolvidos para o tratamento da disfunção eréctil: vardenafil (Levitra), tadalafil (Cialis) e, mais recentemente, avanafil (Stendra). Além disso, um novo composto com maior selectividade para a PDE5 também foi desenvolvido, o T0156 [192].

A diminuição dos níveis de cGMP parece ser uma das causas para a diminuição da neurogénese durante o envelhecimento, o que normalmente está correlacionado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas [193]. Embora a neurogénese se encontre aumentada em estadios iniciais de doenças neurodegenerativas, como se de um mecanismo compensatório se tratasse, os estadios mais avançados ou graves caracterizam-se por uma acentuada diminuição da neurogénese [194]. No cérebro envelhecido, há uma diminuição dos níveis de NO com um concomitante declínio nos níveis de cGMP, resultando na supressão da proliferação celular e em compromisso da aprendizagem e memória [193]. A procura de uma enzima específica e selectiva para a hidrólise do cGMP, tal como a PDE5, provou ser uma boa estratégia para inverter este processo e, assim, potenciar a neurogénese após lesão cerebral aguda ou crónica [195]. De facto, os

inibidores da PDE5 são conhecidos por influenciar diversas funções do cérebro adulto. Diversos trabalhos mostraram que os inibidores da PDE5, tais como o sildenafil, têm uma acção neuroprotectora, melhorando a memória e aprendizagem [20, 196-201]. Além do importante papel na memória e cognição, os inibidores da PDE5 podem também ser utilizados para potenciar a neurogénese endógena no cérebro adulto [195]. Nas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, a neurodegeneração progressiva resulta em disfunção cognitiva, com perda de memória e alterações comportamentais. Deste modo, a administração de inibidores da PDE5 tem sido estudada como um possível tratamento para este tipo de patologia, em particular devido à sua capacidade para reverter os défices de memória ao longo do tempo [202-203]. O sildenafil tem sido associado também à melhoria dos sintomas da esclerose múltipla [22], enquanto que a administração crónica de sildenafil ou tadalafil parece ter um efeito ansiolítico [204]. Além disso, os inibidores da PDE5 foram descritos como potenciadores da neurogénese endógena [205] e recuperação da função neuronal em vários modelos de lesão cerebral aguda, como acidente vascular cerebral isquémico [195, 206-209]. Além disso, foi demonstrado que o sildenafil estimula a proliferação de NSC da SVZ, um efeito que parece ser dependente da activação da via de sinalização PI3-K/Akt [190].

No geral, para além de ligeiras diferenças na sua selectividade, a maioria dos inibidores da PDE5 têm efeitos semelhantes no que concerne à elevação dos níveis de cGMP e activação subsequente das vias dependentes do NO. Apesar da inibição da PDE5 não ter um efeito anti-inflamatório como os NO-AINEs, o seu efeito neuroprotector parece ser consensual. Contudo, no SNC, o efeito dos inibidores da PDE5 é altamente dependente da sua permeabilidade pela BBB, e mais estudos devem ser realizados a fim de caracterizar correctamente a cinética destes fármacos ao nível do CNS. Neste contexto, a modulação da actividade da PDE5 parece ser, de facto, um bom método para controlar os níveis de cGMP, que poderia ser utilizado no tratamento de diversas patologias em que os níveis de cGMP estão alterados. Embora existam alguns estudos focados na estimulação da neurogénese endógena, o uso de inibidores da PDE5 merece uma investigação

mais aprofundada, com o intuito de esclarecer o seu efeito nos diferentes estadios da neurogénese, nomeadamente na migração, diferenciação, integração funcional e sobrevivência dos neurónios recém-formados, e, deste modo, entender melhor os mecanismos subjacentes a esse efeito.

5.3 Outras estratégias

O envolvimento do NO numa ampla variedade de processos fisiológicos, bem como na função de diferentes tipos de células, torna-o numa molécula desejável para uso clínico, sendo um dos principais alvos da indústria farmacêutica. Além das estratégias acima mencionadas, muitos compostos têm sido desenvolvidos com várias modificações químicas e biológicas, a fim de colmatar algumas limitações do NO, tais como a sua semi-vida curta, a sua instabilidade e a sua potencial toxicidade. Deste modo, as recentes inovações no campo da nanotecnologia, tendo em conta o desenvolvimento de novos fármacos dadores de NO no sentido de aumentar a utilidade e a segurança destes compostos, têm como o intuito final estes poderem ser utilizados clinicamente, como descrito de seguida.

Existe uma grande variedade de dadores de NO capazes de libertar NO espontaneamente ou de uma forma controlada em determinados tecidos. O grande desafio assenta na faculdade destes fármacos libertarem NO numa concentração óptima, localmente no cérebro, promovendo assim um efeito terapêutico com toxicidade mínima [210]. Estudos recentes visam a incorporação de dadores de NO em biopolímeros, mimetizando a produção endógena de NO [211]. Desta forma, sistemas de distribuição concebidos com nanomateriais surgem como uma promissora estratégia terapêutica. Estes novos sistemas são vantajosos devido à(s) sua(s): **a)** reduzidas dimensões; **b)** capacidade para atingir tecidos ou células específicas, possuindo ainda a capacidade de atravessar várias barreiras biológicas, tais como a BHE, atingindo assim tecidos inacessíveis aos medicamentos clássicos; **c)** capacidade de atingir elevadas concentrações; **d)** melhor biodisponibilidade e solubilidade; **e)** facilidade em ser administrada;

f) redução da dose necessária para exercer um efeito terapêutico eficiente; e **g)** baixa toxicidade local e menores efeitos secundários (revisto em [212]).

A aplicação de nanomateriais em dadores de NO clássicos pode ser uma boa estratégia no sentido de melhorar a sua estabilidade e libertar níveis terapêuticos de NO de foram controlada e sustentada. No entanto, há uma falta de conhecimento relativo à aplicação destas estratégias no SNC. Até ao momento, nenhum nanossistema está disponível comercialmente e são necessários mais estudos no sentido de desenvolver fármacos eficazes na libertação de NO. Com a adopção destas estratégias, as limitações tradicionais dos dadores de NO clássicos podem ser resolvidas, permitindo assim o controlo dos níveis de NO em regiões específicas do cérebro adulto, na tentativa de reparar áreas lesionadas.

6. Estratégias futuras

A maioria dos distúrbios cerebrais têm características comuns, tais como a neurodegeneração e a neuroinflamação. A compreensão dos mecanismos subjacentes à evolução dessas patologias, os factores que conduzem ao seu início e a biologia da lesão neuronal é de extrema importância para o desenvolvimento de terapias eficazes, permitindo assim actuar sobre os grupos de risco, a fim de prevenir a sua ocorrência. A neurogénese é uma importante faculdade do cérebro adulto, particularmente se considerado o seu potencial enquanto mecanismo de reparação, sendo desta forma um alvo fundamental para neutralizar a perda de neurónios associada a várias patologias. Como discutido acima, duas estratégias promissoras podem ser consideradas com o intuito de melhorar a neurogénese, que incluem: **a)** o transplante de células estaminais e/ou precursoras neurais; ou **b)** a estimulação da neurogénese endógena. No entanto, ambas as estratégias para potenciar a eficiência da neurogénese têm sido associadas a uma resposta inflamatória por parte do cérebro.

O transplante de células estaminais é uma abordagem complexa e invasiva com várias desvantagens, levantando questões quanto à sua aplicabilidade terapêutica, tais como: **a)** a proliferação descontrolada das células transplantadas, que pode levar à formação de tumores; **b)** o risco de rejeição; e **c)** questões éticas.

No entanto, a potenciação da neurogénese endógena parece ser uma abordagem melhor, embora com algumas limitações/desvantagens, tais como: **a)** o baixo rendimento na formação de novos neurónios; **b)** a baixa taxa de sobrevivência a longo prazo dos neurónios recém formados, e **c)** a pouca especificidade das abordagens conhecidas para o aumento da neurogénese para as áreas afectadas. Em geral, a estimulação da neurogénese endógena parece ter um potencial mais elevado quando considerada a sua aplicação terapêutica, e embora seja uma estratégia menos eficiente, tem sido considerada mais segura quando comparada com o transplante celular.

Desta forma, esclarecendo de que forma a resposta inflamatória interfere com a neurogénese e quais os factores envolvidos neste efeito, após uma lesão cerebral, permitirá a modulação de determinadas vias de sinalização envolvidas na regulação da formação de novos neurónios.

A modulação do sistema nitrérgico surge assim como uma estratégia de enorme potencial no sentido de potenciar a neurogénese endógena. Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos que possam modular a actividade das vias de sinalização reguladas pelo NO são um desafio crescente para a indústria farmacêutica. Actualmente, estão a ser estudadas várias estratégias para o tratamento das patologias do SNC, algumas delas voltadas precisamente para o sistema nitrérgico. O desenvolvimento de NO-AINEs assume particular interesse, uma vez que estes fármacos combinam o efeito anti-inflamatório com a libertação de NO, reduzindo assim os efeitos deletérios da neuroinflamação na neurogénese e, simultaneamente, o efeito pró-neurogénico do NO [164]. Além disso, os inibidores da PDE5 também parecem ser uma boa estratégia para potenciar a neurogénese, embora a falta de um efeito anti-inflamatório pareça ser uma desvantagem, se comparados aos NO-AINEs [213]. Embora pouco se saiba sobre a aplicabilidade destas estratégias terapêuticas com vista à regeneração neuronal, as recentes evidências entretanto descritas na literatura são encorajadoras. Deste modo, os inibidores da PDE5 e os NO-AINEs devem ser considerados como estratégias terapêuticas viáveis para potenciar a neurogénese, como discutido nesta revisão.

Apesar de todas as evidências que mostram o importante papel do sistema nitrérgico na regulação da neurogénese, sem dúvida que são necessários mais estudos. Na verdade, mais estudos sobre a regulação da migração, diferenciação, integração funcional e sobrevivência dos neurónios recém-formados deverão ser realizados, com o intuito de se compreender como estes diferentes estadios da neurogénese são regulados em contexto inflamatório, dado o grande número de agentes envolvidos além do NO. A modulação das vias reguladas pelo NO deve assim ser considerada no campo da medicina regenerativa, não isoladamente, mas em vez disso, como estratégia adjuvante na terapia de várias patologias agudas e/ou crónicas que levam à perda neuronal.

7. Referências

1. Moncada, S. and J.P. Bolanos, *Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration.* J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1676-89.
2. Guix, F.X., et al., *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain.* Prog Neurobiol, 2005. **76**(2): p. 126-52.
3. Calabrese, V., et al., *Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity.* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(10): p. 766-75.
4. Packer, M.A., et al., *Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9566-71.
5. Moreno-Lopez, B., et al., *Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb.* J Neurosci, 2004. **24**(1): p. 85-95.
6. Zhu, X.J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation.* Neuroscience, 2006. **141**(2): p. 827-36.
7. Fritzen, S., et al., *Neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) knockout increases the survival rate of neural cells in the hippocampus independently of BDNF.* Mol Cell Neurosci, 2007. **35**(2): p. 261-71.
8. Luo, C.X., et al., *Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression.* J Neurochem, 2007. **103**(5): p. 1872-82.
9. Murillo-Carretero, M., et al., *S-Nitrosylation of the epidermal growth factor receptor: a regulatory mechanism of receptor tyrosine kinase activity.* Free Radic Biol Med, 2009. **46**(4): p. 471-9.
10. Zhang, R., et al., *A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats.* Ann Neurol, 2001. **50**(5): p. 602-11.
11. Lu, D., et al., *Upregulation of neurogenesis and reduction in functional deficits following administration of DEtA/NONOate, a nitric oxide donor, after traumatic brain injury in rats.* J Neurosurg, 2003. **99**(2): p. 351-61.
12. Zhu, D.Y., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus.* J Neurosci, 2003. **23**(1): p. 223-9.
13. Carreira, B.P., et al., *Nitric oxide stimulates the proliferation of neural stem cells bypassing the epidermal growth factor receptor.* Stem Cells, 2010. **28**(7): p. 1219-30.
14. Carreira, B.P., et al., *Differential Contribution of the Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP-Protein Kinase G Pathway to the Proliferation of Neural Stem Cells Stimulated by Nitric Oxide.* Neurosignals, 2013. **21**(1-2):1-13.
15. Tegenge, M.A., et al., *Nitric oxide stimulates human neural progenitor cell migration via cGMP-mediated signal transduction.* Cell Mol Life Sci, 2010. **68**(12): p. 2089-99.
16. Contestabile, A., *Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells.* Prog Neurobiol, 2008.
17. Corbin, J.D., *Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction.* Int J Impot Res, 2004. **16 Suppl 1**: p. S4-7.
18. Hemnes, A.R. and H.C. Champion, *Sildenafil, a PDE5 inhibitor, in the treatment of pulmonary hypertension.* Expert Rev Cardiovasc Ther, 2006. **4**(3): p. 293-300.
19. Keeble, J.E. and P.K. Moore, *Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs.* Br J Pharmacol, 2002. **137**(3): p. 295-310.
20. Rutten, K., et al., *The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices.* Behav Brain Res, 2005. **164**(1): p. 11-6.
21. Koc and S.G. Kucukguzel, *Medicinal chemistry and anti-inflammatory activity of nitric oxide-releasing NSAI drugs.* Mini Rev Med Chem, 2009. **9**(5): p. 611-9.
22. Pifarre, P., et al., *Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis.* Acta Neuropathol, 2011. **121**(4): p. 499-508.
23. Seri, B., et al., *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus.* J Neurosci, 2001. **21**(18): p. 7153-60.
24. Limke, T.L. and M.S. Rao, *Neural stem cells in aging and disease.* J Cell Mol Med, 2002. **6**(4): p. 475-96.
25. Doetsch, F. and C. Scharff, *Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals.* Brain Behav Evol, 2001. **58**(5): p. 306-22.
26. Morte, M.I., et al., *Evaluation of proliferation of neural stem cells in vitro and in vivo.* Curr Protoc Stem Cell Biol, 2013. **Chapter 2**: p. Unit 2D 14.

27. Doetsch, F., et al., *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells.* Neuron, 2002. **36**(6): p. 1021-34.
28. Gritti, A., et al., *Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor.* J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 1091-100.
29. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.* Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
30. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions.* Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
31. Lowenstein, D.H. and J.M. Parent, *Brain, heal thyself.* Science, 1999. **283**(5405): p. 1126-7.
32. Jiruska, P., et al., *Dentate gyrus progenitor cell proliferation after the onset of spontaneous seizures in the tetanus toxin model of temporal lobe epilepsy.* Neurobiol Dis, 2013. **54**: p. 492-8.
33. Whitney, N.P., et al., *Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders.* J Neurochem, 2009. **108**(6): p. 1343-59.
34. Tatebayashi, Y., et al., *The dentate gyrus neurogenesis: a therapeutic target for Alzheimer's disease.* Acta Neuropathol, 2003. **105**(3): p. 225-32.
35. Gil, J.M., et al., *Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice.* Neurobiol Dis, 2005. **20**(3): p. 744-51.
36. Lazic, S.E., et al., *Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice.* Neuroreport, 2004. **15**(5): p. 811-3.
37. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
38. Bredt, D.S., *Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology.* Free Radic Res, 1999. **31**(6): p. 577-96.
39. Dawson, T.M. and S.H. Snyder, *Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain.* J Neurosci, 1994. **14**(9): p. 5147-59.
40. Garthwaite, J. and C.L. Boulton, *Nitric oxide signaling in the central nervous system.* Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 683-706.
41. Prast, H. and A. Philippu, *Nitric oxide as modulator of neuronal function.* Prog Neurobiol, 2001. **64**(1): p. 51-68.
42. Garthwaite, J., S.L. Charles, and R. Chess-Williams, *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.* Nature, 1988. **336**(6197): p. 385-8.
43. Brown, G.C., et al., *Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration.* Neurosci Lett, 1995. **193**(3): p. 201-4.
44. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, *Nitric oxide neurotoxicity.* J Chem Neuroanat, 1996. **10**(3-4): p. 179-90.
45. Heneka, M.T. and D.L. Feinstein, *Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons.* J Neuroimmunol, 2001. **114**(1-2): p. 8-18.
46. Serou, M.J., M.A. DeCoster, and N.G. Bazan, *Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression.* J Neurosci Res, 1999. **58**(4): p. 593-8.
47. Murphy, S., *Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS.* Glia, 2000. **29**(1): p. 1-13.
48. Chao, C.C., et al., *Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism.* J Immunol, 1992. **149**(8): p. 2736-41.
49. Galea, E., D.L. Feinstein, and D.J. Reis, *Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10945-9.
50. Murphy, S., et al., *Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells.* Trends Neurosci, 1993. **16**(8): p. 323-8.
51. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.* Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
52. Covacu, R., et al., *Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astrogliogenesis.* Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2792-800.
53. Schlossmann, J. and F. Hofmann, *cGMP-dependent protein kinases in drug discovery.* Drug Discov Today, 2005. **10**(9): p. 627-34.
54. Hanafy, K.A., J.S. Krumenacker, and F. Murad, *NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction.* Med Sci Monit, 2001. **7**(4): p. 801-19.
55. Lee, S.Y., et al., *17beta-estradiol activates ICI 182,780-sensitive estrogen receptors and cyclic GMP-dependent thioredoxin expression for neuroprotection.* Faseb J, 2003. **17**(8): p. 947-8.

56. Cunningham, G.A., et al., *L-Alanine induces changes in metabolic and signal transduction gene expression in a clonal rat pancreatic beta-cell line and protects from pro-inflammatory cytokine-induced apoptosis.* Clin Sci (Lond), 2005. **109**(5): p. 447-55.
57. Calabrese, V., et al., *Nitric oxide in cell survival: a janus molecule.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2717-39.
58. Matarredona, E.R., et al., *Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone.* Brain Res, 2004. **995**(2): p. 274-84.
59. Park, C., et al., *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases adrenalectomy-induced granule cell death in the rat dentate gyrus.* Brain Res, 2002. **933**(1): p. 81-4.
60. Moreno-Lopez, B., et al., *Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis.* Brain Res, 2000. **869**(1-2): p. 244-50.
61. Reif, A., et al., *Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour.* Eur J Neurosci, 2004. **20**(4): p. 885-95.
62. Luo, C.X., et al., *Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells.* Stem Cells, 2010. **28**(11): p. 2041-52.
63. Vieira, H.L., P.M. Alves, and A. Vercelli, *Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species.* Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 444-55.
64. Charles, N., et al., *Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells.* Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 141-52.
65. Eyler, C.E., et al., *Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2.* Cell, 2011. **146**(1): p. 53-66.
66. Vercelli, A., et al., *Maturation of NADPH-d activity in the rat's barrel-field cortex and its relationship to cytochrome oxidase activity.* Exp Neurol, 1999. **156**(2): p. 294-315.
67. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium.* Neuron, 1994. **13**(2): p. 301-13.
68. Bredt, D.S., et al., *Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase.* Neuron, 1991. **7**(4): p. 615-24.
69. Garbossa, D., et al., *Differential distribution of NADPH-diaphorase histochemistry in human cerebral cortex.* Brain Res, 2005. **1034**(1-2): p. 1-10.
70. Chen, J., et al., *The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance.* Dev Biol, 2004. **269**(1): p. 165-82.
71. Arancio, O., et al., *Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons.* Cell, 1996. **87**(6): p. 1025-35.
72. Roskams, A.J., et al., *Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons.* Neuron, 1994. **13**(2): p. 289-99.
73. Weruaga, E., et al., *Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration.* Eur J Neurosci, 2000. **12**(4): p. 1177-93.
74. Santacana, M., et al., *Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex.* Brain Res Dev Brain Res, 1998. **111**(2): p. 205-22.
75. Peunova, N. and G. Enikolopov, *Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells.* Nature, 1995. **375**(6526): p. 68-73.
76. Poluha, W., et al., *A novel, nerve growth factor-activated pathway involving nitric oxide, p53, and p21WAF1 regulates neuronal differentiation of PC12 cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 24002-7.
77. Cheng, A., et al., *Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain.* Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 319-33.
78. Kokaia, Z. and O. Lindvall, *Neurogenesis after ischaemic brain insults.* Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(1): p. 127-32.
79. Ekdahl, C.T., et al., *Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus.* Eur J Neurosci, 2001. **14**(6): p. 937-45.
80. Kim, Y.M., R.V. Talanian, and T.R. Billiar, *Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms.* J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 31138-48.
81. Holscher, C., *Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity.* Trends Neurosci, 1997. **20**(7): p. 298-303.
82. Torroglosa, A., et al., *Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway.* Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 88-97.
83. Sun, Y., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis.* J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(4): p. 485-92.

84. Estrada, C. and M. Murillo-Carretero, *Nitric Oxide and Adult Neurogenesis in Health and Disease.* Neuroscientist, 2005. **11**(4): p. 294-307.
85. Corsani, L., et al., *Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion.* Exp Neurol, 2008. **211**(2): p. 433-40.
86. Cardenas, A., et al., *Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices.* J Neurochem, 2000. **74**(5): p. 2041-8.
87. Jander, S., M. Schroeter, and G. Stoll, *Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia.* J Neuroimmunol, 2000. **109**(2): p. 181-7.
88. Jiang, W., et al., *Effects of nitric oxide on dentate gyrus cell proliferation after seizures induced by pentylenetrazol in the adult rat brain.* Neurosci Lett, 2004. **367**(3): p. 344-8.
89. Parent, J.M., *Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus.* Prog Brain Res, 2007. **163**: p. 529-40.
90. Cardenas, A., et al., *Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis.* Brain Res Brain Res Rev, 2005. **50**(1): p. 1-6.
91. Matarredona, E.R., et al., *Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis.* Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(2): p. 355-66.
92. Alvaro, A.R., et al., *Neuropeptide Y stimulates retinal neural cell proliferation--involvement of nitric oxide.* J Neurochem, 2008. **105**(6): p. 2501-10.
93. Zhang, R.L., et al., *Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia.* Neuroscience, 2001. **105**(1): p. 33-41.
94. Nencini, P., et al., *Acute inflammatory events and ischemic stroke subtypes.* Cerebrovasc Dis, 2003. **15**(3): p. 215-21.
95. Schmidt, O.I., et al., *Closed head injury--an inflammatory disease?* Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(2): p. 388-99.
96. Stoll, G. and S. Jander, *The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS.* Prog Neurobiol, 1999. **58**(3): p. 233-47.
97. Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell, *Reactive microgliosis.* Prog Neurobiol, 1999. **57**(6): p. 563-81.
98. Wyss-Coray, T. and L. Mucke, *Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword.* Neuron, 2002. **35**(3): p. 419-32.
99. Stoll, G., S. Jander, and M. Schroeter, *Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system.* Adv Exp Med Biol, 2002. **513**: p. 87-113.
100. Das, S. and A. Basu, *Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis.* J Neurosci Res, 2008. **86**(6): p. 1199-208.
101. Ekdahl, C.T., *Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis.* Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 41.
102. Ekdahl, C.T., Z. Kokaia, and O. Lindvall, *Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia.* Neuroscience, 2009. **158**(3): p. 1021-9.
103. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.* Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.
104. Walton, N.M., et al., *Microglia instruct subventricular zone neurogenesis.* Glia, 2006. **54**(8): p. 815-25.
105. Park, C., et al., *The inhibition of nitric oxide synthase enhances PSA-NCAM expression and CREB phosphorylation in the rat hippocampus.* Neuroreport, 2004. **15**(2): p. 231-4.
106. Chen, J., et al., *Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice.* J Neurosci, 2005. **25**(9): p. 2366-75.
107. Arvidsson, A., Z. Kokaia, and O. Lindvall, *N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke.* Eur J Neurosci, 2001. **14**(1): p. 10-8.
108. Shen, L. and J. Zhang, *NMDA receptor and iNOS are involved in the effects of ginsenoside Rg1 on hippocampal neurogenesis in ischemic gerbils.* Neurol Res, 2007. **29**(3): p. 270-3.
109. Arvidsson, A., et al., *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.* Nat Med, 2002. **8**(9): p. 963-70.
110. Luo, C.X., et al., *Blockade of L-type voltage-gated Ca channel inhibits ischemia-induced neurogenesis by down-regulating iNOS expression in adult mouse.* J Neurochem, 2005. **94**(4): p. 1077-86.
111. Gonzalez-Perez, O., F. Jauregui-Huerta, and A.Y. Galvez-Contreras, *Immune system modulates the function of adult neural stem cells.* Curr Immunol Rev, 2010. **6**(3): p. 167-173.
112. Gonzalez-Perez, O., A. Quinones-Hinojosa, and J.M. Garcia-Verdugo, *Immunological control of adult neural stem cells.* J Stem Cells, 2010. **5**(1): p. 23-31.

113. Ekdahl, C.T., et al., *Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13632-7.
114. Monje, M.L., H. Toda, and T.D. Palmer, *Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis.* Science, 2003. **302**(5651): p. 1760-5.
115. Liu, Y.P., H.I. Lin, and S.F. Tzeng, *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-18 modulate neuronal cell fate in embryonic neural progenitor culture.* Brain Res, 2005. **1054**(2): p. 152-8.
116. Cacci, E., et al., *In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia.* Glia, 2008. **56**(4): p. 412-25.
117. Ben-Hur, T., et al., *Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells.* Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(3): p. 623-31.
118. Cacci, E., J.H. Claasen, and Z. Kokaia, *Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro.* J Neurosci Res, 2005. **80**(6): p. 789-97.
119. Iosif, R.E., et al., *Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis.* J Neurosci, 2006. **26**(38): p. 9703-12.
120. Koo, J.W. and R.S. Duman, *IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 751-6.
121. Vallieres, L., et al., *Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6.* J Neurosci, 2002. **22**(2): p. 486-92.
122. Liu, B.F., et al., *Proliferation of neural precursors in the subventricular zone after chemical lesions of the nigrostriatal pathway in rat brain.* Brain Res, 2006. **1106**(1): p. 30-9.
123. Liu, Z., et al., *Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia.* Stroke, 2007. **38**(1): p. 146-52.
124. Rueger, M.A., et al., *Effects of minocycline on endogenous neural stem cells after experimental stroke.* Neuroscience, 2012. **215**: p. 174-83.
125. Simard, A.R. and S. Rivest, *Role of inflammation in the neurobiology of stem cells.* Neuroreport, 2004. **15**(15): p. 2305-10.
126. Hoehn, B.D., T.D. Palmer, and G.K. Steinberg, *Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin.* Stroke, 2005. **36**(12): p. 2718-24.
127. Nakatomi, H., et al., *Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors.* Cell, 2002. **110**(4): p. 429-41.
128. Butovsky, O., et al., *Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells.* Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(1): p. 149-60.
129. Aarum, J., et al., *Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15983-8.
130. Morgan, S.C., D.L. Taylor, and J.M. Pocock, *Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades.* J Neurochem, 2004. **90**(1): p. 89-101.
131. Nakanishi, M., et al., *Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells.* Eur J Neurosci, 2007. **25**(3): p. 649-58.
132. Jakubs, K., et al., *Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain.* J Neurosci, 2008. **28**(47): p. 12477-88.
133. Thored, P., et al., *Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke.* Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 739-47.
134. Kokaia, Z., et al., *Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress.* Cereb Cortex, 2006. **16 Suppl 1**: p. i162-7.
135. Bonde, S., C.T. Ekdahl, and O. Lindvall, *Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation.* Eur J Neurosci, 2006. **23**(4): p. 965-74.
136. Thored, P., et al., *Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke.* Glia, 2009. **57**(8): p. 835-49.
137. Imitola, J., et al., *Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18117-22.
138. Zhang, R.L., Z.G. Zhang, and M. Chopp, *Targeting nitric oxide in the subacute restorative treatment of ischemic stroke.* Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(7): p. 843-51.
139. Godinez-Rubi, M., A.E. Rojas-Mayorquin, and D. Ortuno-Sahagun, *Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction.* Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 297357.

140. Wang, X., et al., *Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway.* Mol Cell Neurosci, 2007. **36**(3): p. 343-54.
141. Green, H.F., et al., *A role for interleukin-1beta in determining the lineage fate of embryonic rat hippocampal neural precursor cells.* Mol Cell Neurosci, 2012. **49**(3): p. 311-21.
142. Wong, G., Y. Goldshmit, and A.M. Turnley, *Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells.* Exp Neurol, 2004. **187**(1): p. 171-7.
143. Song, J.H., et al., *Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway.* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12896-901.
144. Baron, R., et al., *IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease.* Faseb J, 2008. **22**(8): p. 2843-52.
145. Widera, D., et al., *Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling.* BMC Neurosci, 2006. **7**: p. 64.
146. Wu, J.P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha modulates the proliferation of neural progenitors in the subventricular/ventricular zone of adult rat brain.* Neurosci Lett, 2000. **292**(3): p. 203-6.
147. Iosif, R.E., et al., *Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1.* J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(9): p. 1574-87.
148. Heldmann, U., et al., *TNF-alpha antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain.* Exp Neurol, 2005. **196**(1): p. 204-8.
149. Bernardino, L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures.* Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2361-71.
150. Peng, H., et al., *Differential expression of CXCL12 and CXCR4 during human fetal neural progenitor cell differentiation.* J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(3): p. 251-8.
151. Megson, I.L. and D.J. Webb, *Nitric oxide donor drugs: current status and future trends.* Expert Opin Investig Drugs, 2002. **11**(5): p. 587-601.
152. Feelisch, M. and M. Kelm, *Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **180**(1): p. 286-93.
153. Scheiman, J.M. and A.M. Fendrick, *Summing the risk of NSAID therapy.* The Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1580-1581.
154. Aalykke, C. and K. Lauritsen, *Epidemiology of NSAID-related gastroduodenal mucosal injury.* Best practice & research. Clinical gastroenterology, 2001. **15**(5): p. 705-722.
155. Harirforoosh, S. and F. Jamali, *Renal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Expert Opinion on Drug Safety, 2009. **8**(6): p. 669-681.
156. Martin, G.R. and J.L. Wallace, *Gastrointestinal Inflammation: A Central Component of Mucosal Defense and Repair.* Experimental Biology and Medicine, 2006. **231**(2): p. 130-137.
157. Stanek, A., et al., *Role of nitric oxide in physiology and pathology of the gastrointestinal tract.* Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(14): p. 1549-60.
158. Wallace, J.L., et al., *A diclofenac derivative without ulcerogenic properties.* European Journal of Pharmacology, 1994. **257**(3): p. 249-255.
159. Wallace, J.L., et al., *Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat.* Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 173-179.
160. Fiorucci, S., et al., *Gastrointestinal safety of nitric oxide–derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats.* Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1089-1106.
161. Fiorucci, S., *NO-releasing NSAIDs are caspase inhibitors.* Trends in Immunology, 2001. **22**(5): p. 232-235.
162. Fiorucci, et al., *Nitric oxide-releasing NSAIDs inhibit interleukin-1β converting enzyme-like cysteine proteases and protect endothelial cells from apoptosis induced by TNFα.* Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 1999. **13**(3): p. 421-435.
163. Dimmeler, S., et al., *Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1β–converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32–like Proteases.* The Journal of Experimental Medicine, 1997. **185**(4): p. 601-608.
164. Ajmone-Cat, M.A., E. Cacci, and L. Minghetti, *Non steroidal anti-inflammatory drugs and neurogenesis in the adult mammalian brain.* Curr Pharm Des, 2008. **14**(14): p. 1435-42.
165. Wallace, J.L., et al., *Enhanced anti-inflammatory effects of a nitric oxide–releasing derivative of mesalamine in rats.* Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 557-566.
166. Griffin, W.S., et al., *Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression.* Brain Pathol, 1998. **8**(1): p. 65-72.
167. Shimohama, S., H. Tanino, and S. Fujimoto, *Changes in Caspase Expression in Alzheimer's Disease: Comparison with Development and Aging.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **256**(2): p. 381-384.

168. Broe, G.A., et al., *Anti-inflammatory drugs protect against Alzheimer disease at low doses.* Arch Neurol, 2000. **57**(11): p. 1586-91.
169. Andersen, K., et al., *Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam Study.* Neurology, 1995. **45**(8): p. 1441-5.
170. Blasko, I., et al., *Ibuprofen Decreases Cytokine-Induced Amyloid Beta Production in Neuronal Cells.* Neurobiology of Disease, 2001. **8**(6): p. 1094-1101.
171. in 't Veld, B.A., et al., *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer's Disease.* New England Journal of Medicine, 2001. **345**(21): p. 1515-1521.
172. Hüll, M., K. Lieb, and B.L. Fiebich, *Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease?* Expert Opinion on Investigational Drugs, 2000. **9**(4): p. 671-683.
173. Hoehn, B.D., T.D. Palmer, and G.K. Steinberg, *Neurogenesis in Rats After Focal Cerebral Ischemia is Enhanced by Indomethacin.* Stroke, 2005. **36**(12): p. 2718-2724.
174. Parepally, J.M., H. Mandula, and Q.R. Smith, *Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin.* Pharm Res, 2006. **23**(5): p. 873-81.
175. Hauss-Wegrzyniak, B., et al., *Peripheral administration of novel anti-inflammatories can attenuate the effects of chronic inflammation within the CNS.* Brain Research, 1999. **815**(1): p. 36-43.
176. Jantzen, P.T., et al., *Microglial Activation and β-Amyloid Deposit Reduction Caused by a Nitric Oxide-Releasing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug in Amyloid Precursor Protein Plus Presenilin-1 Transgenic Mice.* The Journal of Neuroscience, 2002. **22**(6): p. 2246-2254.
177. Hauss-Wegrzyniak, B., P. Vraniak, and G.L. Wenk, *The effects of a novel NSAID on chronic neuroinflammation are age dependent.* Neurobiol Aging, 1999. **20**(3): p. 305-13.
178. Ajmone-Cat, M.A., A. Nicolini, and L. Minghetti, *Differential effects of the nonsteroidal antiinflammatory drug flurbiprofen and its nitric oxide-releasing derivative, nitroflurbiprofen, on prostaglandin E2, interleukin-1β, and nitric oxide synthesis by activated microglia.* Journal of Neuroscience Research, 2001. **66**(4): p. 715-722.
179. Jurado, S., J. Sanchez-Prieto, and M. Torres, *Expression of cGMP-dependent protein kinases (I and II) and neuronal nitric oxide synthase in the developing rat cerebellum.* Brain Res Bull, 2005. **65**(2): p. 111-5.
180. Ignarro, L.J., *Signal transduction mechanisms involving nitric oxide.* Biochem Pharmacol, 1991. **41**(4): p. 485-90.
181. Murad, F., *Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system.* Adv Pharmacol., 1994. **26**: p. 19-33.
182. Madhusoodanan, K.S. and F. Murad, *NO-cGMP Signaling and Regenerative Medicine Involving Stem Cells.* Neurochemical Research, 2007. **32**(4): p. 681-694.
183. Lugnier, C., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents.* Pharmacol Ther, 2006. **109**(3): p. 366-98.
184. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase.* Brain Res Bull, 2004. **62**(6): p. 505-15.
185. Lincoln, T.M., et al., *Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate binding proteins in rat tissues.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(8): p. 2559-63.
186. Coquil, J.F., G. Brunelle, and J. Guedon, *Occurrence of the methylisobutylxanthine-stimulated cyclic GMP binding protein in various rat tissues.* Biochem Biophys Res Commun, 1985. **127**(1): p. 226-31.
187. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro.* Am J Cardiol, 1999. **83**(5A): p. 3C-12C.
188. Shimizu-Albergine, M., et al., *Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation.* J Neurosci, 2003. **23**(16): p. 6452-9.
189. Bender, A.T. and J.A. Beavo, *Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages.* Neurochem Int, 2004. **45**(6): p. 853-7.
190. Wang, L., et al., *Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone.* J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(9): p. 1150-8.
191. Ballard, S.A., et al., *Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes.* J Urol, 1998. **159**(6): p. 2164-71.
192. Mochida, H., et al., *Enzymological and pharmacological profile of T-0156, a potent and selective phosphodiesterase type 5 inhibitor.* Eur J Pharmacol, 2002. **456**(1-3): p. 91-8.

193. Chalimoniuk, M. and J.B. Strosznajder, *Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid beta peptide.* Mol Chem Neuropathol, 1998. **35**(1-3): p. 77-95.
194. Chen, Q., et al., *Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration.* Neurobiology of Disease, 2008. **29**(2): p. 316-326.
195. Chen, X.M., et al., *Neuroprotection by sildenafil: neuronal networks potentiation in acute experimental stroke.* CNS Neurosci Ther, 2014. **20**(1): p. 40-9.
196. Reneerkens, O.A.H., et al., *Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition improves object recognition memory: Indications for central and peripheral mechanisms.* Neurobiology of Learning and Memory, 2012. **97**(4): p. 370-379.
197. Devan, B.D., et al., *Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates a maze learning impairment in rats induced by nitric oxide synthase inhibition.* Psychopharmacology (Berl), 2006. **183**(4): p. 439-45.
198. Devan, B.D., et al., *Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates the learning impairment induced by blockade of cholinergic muscarinic receptors in rats.* Pharmacol Biochem Behav, 2004. **79**(4): p. 691-9.
199. Prickaerts, J., et al., *Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat.* Neuroscience, 2002. **113**(2): p. 351-61.
200. Singh, N. and M. Parle, *Sildenafil improves acquisition and retention of memory in mice.* Indian J Physiol Pharmacol, 2003. **47**(3): p. 318-24.
201. Puzzo, D., et al., *Phosphodiesterase 5 Inhibition Improves Synaptic Function, Memory, and Amyloid-β Load in an Alzheimer's Disease Mouse Model.* The Journal of Neuroscience, 2009. **29**(25): p. 8075-8086.
202. Cuadrado-Tejedor, M., et al., *Sildenafil restores cognitive function without affecting β-amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease.* British Journal of Pharmacology, 2011. **164**(8): p. 2029-2041.
203. Sabayan, B., N. Zamiri, and S. Farshchizarabi, *Phoshphodiesterase-5 inhibitors: novel weapons against Alzheimer's disease?* Int J Neurosci, 2010. **120**(12): p. 746-51.
204. Liebenberg, N., et al., *Chronic treatment with the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil and tadalafil display anxiolytic effects in Flinders Sensitive Line rats.* Metabolic Brain Disease, 2012: p. 1-4.
205. Santos, A.I., et al., *Stimulation of neural stem cell proliferation by inhibition of phosphodiesterase 5.* Stem Cells Int, 2014. **2014**: p. 878397.
206. Zhang, R.L., et al., *Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia.* J Neurosci Res, 2006. **83**(7): p. 1213-9.
207. Zhang, L., et al., *Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor.* Stroke, 2005. **36**(4): p. 847-52.
208. Zhang, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats.* Stroke, 2002. **33**(11): p. 2675-80.
209. Zhang, L., et al., *Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke.* Brain Res, 2006. **1118**(1): p. 192-8.
210. Scatena, R., et al., *Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks.* Curr Med Chem, 2010. **17**(1): p. 61-73.
211. Frost, M.C., M.M. Reynolds, and M.E. Meyerhoff, *Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices.* Biomaterials, 2005. **26**(14): p. 1685-1693.
212. Saraiva, J., et al., *Nanocarriers for Nitric Oxide Delivery.* Journal of Drug Delivery, 2011.
213. Uthayathas, S., et al., *Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications.* Pharmacol Rep, 2007. **59**(2): p. 150-63.