

Inês Catarina Barbosa Gonçalves

# Óxido Nítrico como Neuromodulador do Sistema Nervoso Central

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Declaração de Integridade**

Eu, Inês Catarina Barbosa Gonçalves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2007103253, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

Assinatura

---

(Inês Catarina Barbosa Gonçalves)

Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra no âmbito da unidade Estágio Curricular, com vista à obtenção do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

O tutor



---

(Professor Doutor Rui M. Barbosa)

A aluna



---

(Inês Catarina Barbosa Gonçalves)

## Agradecimentos

A obtenção de um grau académico não é só fruto de um grande esforço e de muito trabalho, é também fruto das relações que desenvolvemos com as pessoas que cruzam o nosso percurso durante esses anos de aprendizagem e crescimento. O apoio dos que nos rodeiam, daqueles que nos acompanham todos os dias, de perto ou de longe, revela-se fundamental para que tudo corra pelo melhor e cheguemos a bom porto. Por isso mesmo os agradecimentos que se seguem são mais do que merecidos e parecem sempre pouco perante tudo o que estas pessoas fizeram por mim.

Antes de mais agradeço aos meus pais, pilares da minha vida, que me apoiaram sempre e que tanta força me deram nos momentos mais difíceis. Foram eles que me permitiram ter uma boa educação, chegar até aqui e concretizar este objectivo. Muito obrigada por tudo o que fazem por mim e por estarem sempre ao meu lado! As minhas vitórias são vossas também.

Agradeço ao Ricardo, companheiro de tantas horas e desde há tantos anos. Agradeço-te os conselhos, a paciência, a amizade e o amor.

Uma vez concluída mais uma etapa do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, não posso deixar de expressar o meu sincero agradecimento ao Professor Doutor Rui Barbosa, pelo apoio e orientação na elaboração desta Monografia.

Ao Pedro e à Anita por todo o carinho, por serem verdadeiros amigos e por me apoiarem em todos os momentos. Muito obrigada, amigos de sempre!

Ao Igor, por tantos anos de amizade, por termos feito o mesmo percurso académico e por nos ajudarmos mutuamente, por todas as conversas de ânimo e coragem. Obrigada!

À Alexandra, ao Roberto, ao Álvaro, à Ana e à Sylvia por tudo o que nos une há tanto tempo, por todos os momentos juntos que iremos recordar com um sorriso no rosto.

À Salomé, ao Marcelo, à Diana, à Ângela, à Rita, ao Luís, à Margarida por todos os momentos divertidos, pela amizade verdadeira que construímos e que “levo comigo p’ra vida”.

À Daniela, à Inês Margalho, à Joana Santos, ao Hugo, à Joana Salgueiro, ao João e à Inês Prata por serem amigos fantásticos que tive o prazer de conhecer neste curso e que levo no coração.

A todos aqueles que estiveram presentes na minha vida ao longo destes últimos anos e me ajudaram a chegar até aqui, um sincero obrigada.

A esta cidade maravilhosa e carregada de saudade que é Coimbra, onde nasci, cresci e pude estudar.

A todos, muito obrigada!

*“Let us be grateful to people who make us happy;  
they are the charming gardeners who make our souls blossom.”*

Marcel Proust

# Índice

Abreviaturas.....	2
Resumo .....	3
Abstract .....	4
1. Introdução.....	5
2. Relevância do Óxido Nítrico na Biologia.....	6
2.1. Efeitos fisiológicos do NO .....	8
3. Propriedades Físico-Químicas do Óxido Nítrico .....	9
3.1. Ligação Química .....	10
3.2. Reactividade Química do NO: Efeitos Directos e Indirectos.....	11
3.3. Transporte biológico do NO .....	13
4. Biosíntese do óxido nítrico.....	13
4.1. Isoenzimas: nNOs, eNOS e iNOS.....	14
5. Mecanismos de sinalização do óxido nítrico no cérebro.....	16
5.1. Hipocampo .....	16
5.2. Receptores NMDA no hipocampo.....	17
5.3. Neurotransmissão e Neuromodulação .....	17
5.3.1. Glutamato e Óxido Nítrico .....	18
6. O papel do Óxido Nítrico na Plasticidade Sináptica.....	20
7. Medição do Óxido Nítrico no Cérebro .....	22
Conclusão.....	23
Bibliografia .....	24

## Abreviaturas

AMPA – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

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

eNOS – Sintase do óxido nítrico endotelial, do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*

iNOS – Sintase do óxido nítrico indutiva, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*

LTD – Depressão de longa duração, do inglês, *long-term depression*

LTP – Potenciação de longa duração, do inglês, *long-term potentiation*

NADPH – Dinucleótido de nicotinamida e adenosina fosfato

NMDA – N-metil-D-aspartato

nNOS – Sintase do óxido nítrico neuronal, do inglês, *neuronal nitric oxide synthase*

NO – Óxido Nítrico, do inglês, *nitric oxide*

NOS – Sintase do óxido nítrico, do inglês, *nitric oxide syntahse*

RNS – Espécies reactivas de nitrogénio, do inglês, *reactive nitrogen species*

sGC – Guanilato ciclase solúvel, do inglês, *soluble guanylate cyclase*

SNC – Sistema Nervoso Central

## Resumo

O óxido nítrico (NO) é um radical de natureza gasosa de enorme importância no nosso organismo, nomeadamente no sistema nervoso central (SNC). Apesar de já ser conhecido desde longa data como um poluente atmosférico, só nos anos oitenta é que a sua importância como mensageiro celular foi descoberta tendo sido considerada em 1992, pela Revista *Science*, como a “molécula do ano”. No entanto, quando em 1987/88 se descobriu que as células endoteliais eram capazes de sintetizar NO a partir de L-arginina, a notícia foi recebida com cepticismo na comunidade científica. A sua relevância na biologia está hoje bem estabelecida e é crescente o número de artigos científicos publicados relacionados com as acções do NO como molécula sinalizadora.

O NO surgiu como uma molécula mensageira ubíqua que se encontra envolvida numa grande variedade de processos no nosso organismo. Desde a diabetes, hipertensão, impotência sexual, tuberculose ou outras patologias, passando pelo choque séptico, não há, segundo a Nitric Oxide Society, nenhuma condição patológica em que o NO não esteja envolvido. Esta molécula intervém na sinalização intra e extracelular, actua como factor de vasodilatação no endotélio vascular, intervém na defesa do nosso organismo ao ser produzido pelos macrófagos (células do sistema imunitário) e é também um importante neuromodulador. Neste contexto, modula muitos processos fisiológicos como o fluxo sanguíneo cerebral, a nocicepção, o olfacto e a ingestão de alimentos. Por ser um gás hidrofóbico é facilmente difusível e não necessita de receptores transmembranares para exercer os seus efeitos.

Ao NO atribui-se o envolvimento, na memória e aprendizagem sendo o hipocampo uma das estruturas do cérebro mais relevantes nestes processos. Isto deve-se ao facto de o NO ter sido proposto como sendo o mensageiro retrógrado durante a indução da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo. A LTP, um modelo experimental da plasticidade sináptica, envolve o aumento persistente da neurotransmissão excitatória. No hipocampo, o NO tem origem num neurónio pós-sináptico, atravessa o espaço extracelular e vai actuar directamente no neurónio pré-sináptico. Prova disso foi a utilização de inibidores da sintase do NO que bloquearam a LTP no hipocampo e prejudicaram a aprendizagem espacial, o que indica que o NO está envolvido em algumas formas de memória.

**Palavras-chave:** óxido nítrico, neurotransmissor, sintase do óxido nítrico, hipocampo, LTP, LTD, memória.

## Abstract

Nitric oxide (NO) is a gaseous radical of paramount importance in our body, particularly in the central nervous system (CNS). Despite the fact that it has been known for a long time as an atmospheric pollutant, only in the 80's its role as a cellular messenger was discovered and, in 1992, was elected "Molecule of the Year" by scientific magazine *Science*. In 1987/88 it was found that endothelial cells were able to synthesize NO from L-arginine, but this discovery was received with skepticism by the scientific community. Today, nitric oxide importance in biology is well established despite the increasing number of scientific articles published relating his actions as a signaling molecule.

Nitric oxide is known to be a ubiquitous molecule involved in a variety of processes in our body. According to Nitric Oxide Society, from diabetes, hypertension, male impotence, tuberculosis to septic shock or other pathologies, there is probably no pathological condition where nitric oxide doesn't play an important role. This molecule intervenes in intra- and extracellular signaling, acts as a vasodilation factor in the vascular endothelium, is involved in our body defense because it's produced by macrophages (immune system cells) and it is also an important neuromodulator. In this context modulates many physiological processes such as cerebral blood flow, nociception, olfaction and food intake. Because it is a hydrophobic gas, NO is highly diffusible and doesn't need cell membrane receptors to produce their effects.

NO is involved in memory and learning processes and hippocampus, which is one of the most important brain structures in these mechanisms. This is due to the fact that NO is considered a retrograde messenger during long-term potentiation (LTP) in hippocampus. LTP, an experimental model of synaptic plasticity involves the persistent increase of excitatory transmission. In hippocampus, NO is generated in the postsynaptic neuron, traveling through the extracellular space and acting directly in the presynaptic neuron. Indeed, NO-synthase inhibitors were able to block LTP in hippocampus impaired spatial learning, indicating that NO is involved in some forms of memory.

**Key-words:** nitric oxide, neurotransmitter, nitric oxide synthase, hippocampus, LTP, LTD, memory.

## I. Introdução

A descoberta do NO foi um dos marcos importantes na biologia vascular no século XX, de tal modo que os cientistas envolvidos na sua descoberta foram galardoados com o Prémio Nobel da Medicina e da Fisiologia.

O NO é uma molécula simples e que desempenha várias funções no organismo, tendo acção nos sistemas nervoso, cardiovascular, imunitário e gástrico.

No final da década de 1970, Robert Furchgott começou por examinar a dicotomia no comportamento da acetilcolina. Uma experiência, com artérias das quais havia sido removida a camada adventícia e o endotélio para obter uma preparação de músculo liso “puro”, conduziu à primeira descoberta do NO na história. Nestas circunstâncias, normalmente, a acetilcolina causa contracção da musculatura lisa. Mas, numa ocasião, um técnico da equipa de Furchgott, Zawadzki, não removeu o endotélio numa preparação da artéria aorta e, por isso, a acetilcolina provocou um relaxamento potente (Furchgott, 1980). Furchgott rapidamente estabeleceu que o relaxamento arterial em resposta à acetilcolina apenas ocorre se o endotélio se encontrar presente, ou seja, o relaxamento vascular provocado pela acetilcolina está dependente do endotélio. Foi também possível concluir que o relaxamento é bloqueado pela atropina, o que significa que a acetilcolina actua nos receptores das células endoteliais para produzir uma substância que difunde para o músculo liso e inicia o processo de relaxamento: um factor de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). As diferenças entre as respostas *in vivo* e *in vitro* à acetilcolina resultaram do facto de as preparações *in vivo* permanecerem com o endotélio ao contrário das preparações *in vitro* às quais tinha sido retirado (Furchgott e Zawadzki, 1980).

Em 1987, Palmer *et al.* (1987) relataram que a actividade biológica do factor de relaxamento do endotélio (EDRF) poderia ser explicada pela libertação de NO, uma descoberta muito importante e que foi corroborada por outros investigadores nesse mesmo ano (Ignarro *et al.*, 1987). Seguidamente, descobriu-se a via de síntese do NO (Palmer *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1988).

No entanto, apesar de todas estas descobertas e evidências, as acções químicas e biológicas do NO são bastante complicadas de entender para uma molécula, aparentemente, tão simples. Após a sua descoberta é necessário aprender a manipulá-la, conhecer e compreender o seu papel no metabolismo dos organismos vivos.

## 2. Relevância do Óxido Nítrico na Biologia

O NO surgiu como uma molécula mensageira ubíqua que se encontra envolvida numa grande variedade de processos no nosso organismo (Moncada, 1992). Desde a diabetes, hipertensão, impotência sexual, tuberculose ou outras patologias, passando pelo choque séptico, não há, segundo a Nitric Oxide Society, nenhuma condição patológica em que o NO não esteja envolvido. Esta molécula intervém na sinalização intra e extracelular, actua como factor de vasodilatação no endotélio vascular, intervém na defesa do nosso organismo ao ser produzido pelos macrófagos (células do sistema imunitário) e é também um importante neuromodulador. Neste contexto, modula muitos processos fisiológicos como o fluxo sanguíneo cerebral, a nocicepção, o olfacto e a ingestão de alimentos (Bruhwylar *et al.* 1993).

Actualmente o NO é conhecido por ser uma molécula ubíqua, sinalizadora e têm sido descritas muitas formas das suas sintases (NOS), específicas de sistemas de órgãos particulares e de algumas espécies (Fleming, 1999). É também uma molécula sinalizadora em insectos e bactérias, por exemplo. Nas plantas induz a expansão das folhas e o crescimento da raíz e protege de agressões ambientais e infecções (Delledonne, 2011).

Estas observações sugerem que o NO é uma molécula sinalizadora com uma longa história, que realiza funções biológicas nos organismos mais primitivos. Formas mais primitivas de vida utilizaram nitrogénio vindo directamente da atmosfera para a formação de aminoácidos. Mudanças ambientais, eventualmente, conduziram à evolução de métodos enzimáticos/biológicos de fixação de nitrogénio (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2001).

Espécies reactivas de oxigénio (ROS) tais como o radical superóxido, radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio fazem parte dos mecanismos de sinalização e homeostase de todos os organismos vivos. Estes surgem do normal processo de actividade biológicas das oxidases celulares (por exemplo, NAD(P)H oxidase, xantina oxidase) e da respiração mitocondrial. Semelhantes ao NO, estas moléculas instáveis e reactivas são mediadoras numa grande variedade de actividades biológicas tais como a apoptose e a sinalização intracelular (Droge, 2002). O stress oxidativo, bem como danos celulares, são causados pela produção excessiva de ROS, que causam danos celulares ao interferirem na respiração celular, nos sistemas de mensageiros secundários intracelulares e na síntese proteica (Thannickal e Fanburg, 2000). A produção excessiva destas espécies está implicada na patogénese de várias doenças crónicas, como as doenças neurodegenerativas de Parkinson e Alzheimer, bem como na destruição de endotélio e na formação de placas na aterosclerose (Napoli *et al.*, 2001; Sorescu *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado que o NO desempenha um importante papel como regulador da respiração mitocondrial, como é possível observar na Figura I (Clementi *et al.*, 1999). Liga-se à enzima citocromo C oxidase da cadeia respiratória da mitocôndria mais rapidamente do que o próprio oxigénio e, por isso, parece controlar a taxa de produção de energia por regulação da taxa de entrada de oxigénio na cadeia respiratória (Brown *et al.*, 2001; Clementi *et al.*, 1999). Como a afinidade do NO para a citocromo C oxidase é muito maior do que a afinidade do oxigénio, a respiração mitocondrial pode ser inibida extensivamente com concentrações moderadas de NO. Tem sido sugerido que em momentos de stress celular, o NO inibe o metabolismo (aeróbio) mitocondrial, reduzindo o consumo de oxigénio e prevenindo a apoptose (Beltran *et al.*, 2000). Este efeito protector do NO tem sido postulado como forma de neuroprotecção em situações de stress no sistema nervoso central (Almeida *et al.*, 2001).

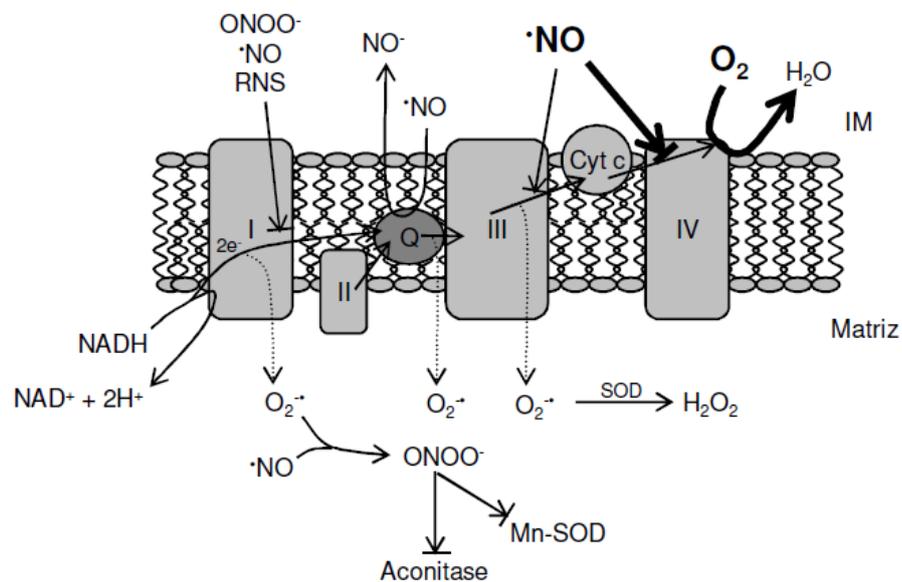


Figura I – Interação do NO com a mitocôndria. Está evidenciado o sentido de fluco de electrões doados ao complexo I pelo NADH, pontos de inactivação deste fluxo com consequente síntese de  $O_2^{\cdot-}$ . (Adaptado de Brown, 2001; Brown, 2007; Brunelli, *et al.*, 2001 e Ledo, 2007).

A citocromo C oxidase mitocondrial pode ter uma segunda função protectora da célula: a remoção de derivados tóxicos do NO, o peroxinitrito (Pearce *et al.*, 2002). O NO tem elevada afinidade para as ROS, o que resulta na formação de espécies reactivas de nitrogénio tóxicas, incluindo o peroxinitrito. Com concentrações baixas e fisiológicas de NO estas reacções não ocorrem porque o NO encontra-se ligado à guanilil ciclase, que estimula a formação de cGMP (Griffiths e Garthwaite, 2001). Em condições patológicas como a sepsis, onde a produção de NO e ROS está bastante aumentada, espécies reactivas de

nitrogénio acumulam-se rapidamente no interior da célula. Estas espécies ligam-se de forma irreversível a múltiplos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, conduzindo ao término da respiração celular, com a conseqüente necrose da célula (Brown e Borutaite, 2001). Todas estas recentes descobertas permitem considerar que o NO é um modulador primário da mitocôndria e o estudo desta complexa interacção pode finalmente conduzir a um melhor entendimento da doença.

## **2.1. Efeitos fisiológicos do NO**

Um dos principais efeitos fisiológicos do NO relaciona-se com o sistema vascular. As células endoteliais controlam o relaxamento dos vasos sanguíneos pela produção de NO, sendo o seu principal alvo as células da musculatura lisa. Pode ainda desempenhar um papel protector do sistema vascular ao inibir a proliferação de células de músculo liso na túnica média e limitando a subsequente invasão e destruição da camada íntima dos vasos sanguíneos que ocorrer nos processos de aterogénese envolvidos na isquémia e demência multi-enfartes (Moncada *et al.*, 1991).

O NO é produzido através de diferentes estímulos e desempenha um papel importante na resposta imunitária (Nathan, 1997). As sintases constitutivas do NO (NOS), que serão abordadas mais pormenorizadamente mais adiante são activadas por um aumento transitório do cálcio citosólico, que provoca um aumento do NO por breves minutos, e a iNOS (sintase do óxido nítrico indutiva) é expressa nas células da glia e imunológicas após o estímulo imunológico ou inflamatório, provocando um elevado aumento de NO por vários dias. A produção massiva de NO pela iNOS é tóxica uma vez que inactiva a cadeia respiratória mitocondrial e pode induzir a apoptose celular.

O NO tem ainda efeitos neuronais actuando como neurotransmissor e/ou neuromodulador tanto no sistema nervoso central como periférico por mecanismos dependentes de cGMP (Bredt e Snyder, 1994; Prast e Philippu, 2011; Lewko e Stepinski, 2002; Trabace e Kendrick, 2000). A acção da nNOS no sistema nervoso central tem sido associada à percepção da dor, especialmente ao nível da medula espinhal (Yamamoto *et al.*, 1993), ao controlo do sono, apetite e termorregulação (Monti e Jantos, 2004), ao desenvolvimento neuronal (Cheng *et al.*, 2003) e à plasticidade sináptica (Dinerman *et al.*, 1994).

### 3. Propriedades Físico-Químicas do Óxido Nítrico

O NO é conhecido por ser um regulador importante da função das células e dos tecidos através de mecanismos que utilizam as suas propriedades físico-químicas únicas como radical livre de reactividade limitada. Quando referimos que este radical livre controla funções biológicas fundamentais é uma afirmação aceite actualmente. Mas quando se estabeleceu a relação entre o factor de relaxamento do endotélio e o NO foi uma surpresa porque até então pensava-se que os radicais eram espécies reactivas tóxicas. O NO é um mensageiro secundário com características únicas não só por ser um radical livre, mas também por ser uma molécula inorgânica, gasosa, estruturalmente simples que não é reconhecida por proteínas através das forças intermoleculares que tipificam o reconhecimento de outros mensageiros secundários. Pelo contrário, o sistema de sinalização do NO actua pela ligação deste ao grupo heme ferroso da enzima guanilato ciclase (sGC) e promove a sua activação. Além disso, o maior avanço resultante desta descoberta não foi a identificação de um novo mensageiro secundário, mas sim a descoberta de uma nova classe de mensageiros que controlam processos biológicos por um novo mecanismo (Ignarro, 1990). As repercussões e implicações destas descobertas em vários campos que vão desde a química, biologia, farmacologia e medicina foram reconhecidos com o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia entregue a Furchgott, Ignarro e Murad em 1998. (Toledo Jr. e Augusto, 2012).

Durante décadas a investigação sobre radicais livres em biologia focou-se no entendimento das propriedades do oxigénio molecular ( $O_2$ ) devido à sua capacidade para gerar radicais livres e antioxidantes como metabolitos, e também para elucidar a forma como as proteínas, lípidos e ADN são danificados por eles, o que resulta em danos celulares e doenças. No entanto tornou-se claro que radicais livres, como o NO, e as espécies reactivas de oxigénio, como o  $H_2O_2$ , são também essenciais à homeostase das células e organismos. Ao exercer função de mensageiros secundários, as espécies reactivas podem regular circuitos fisiológicos e patofisiológicos (Augusto e Myamoto, 2012).

Mediadores biológicos interagem rápida e reversivelmente com proteínas/enzimas específicas e, por isso, a selectividade é um princípio biológico fundamental na sinalização celular. Tanto o  $H_2O_2$  como o NO têm reactividade específica com alvos biológicos. Evidências sugerem que a sinalização com NO se faz através da ligação e activação à sGC, num processo que não envolve alteração redox (Ignarro, 1999).

As propriedades físico-químicas do NO como molécula pequena e sem carga que reage rapidamente com alvos biológicos que contêm electrões desemparelhados permitiram a sua evolução como mediador biológico.

### 3.1. Ligação Química

O NO é uma molécula com 11 electrões de valência: 6 do oxigénio e 5 do nitrogénio, com um par de electrões desemparelhados na última orbital, o que o torna um radical livre. Também pode existir sob a forma de ião nitrosónio ( $\text{NO}^+$ ) dependendo do estado redox (Stamler *et al.*, 1992). É por esta razão que é considerado termodinamicamente instável e tende a reagir com outras moléculas.

Um olhar mais atento sobre a natureza da ligação química da molécula de NO é relevante para o entendimento das suas funções fisiológicas. A diferença na electronegatividade dos átomos de oxigénio e nitrogénio resulta em orbitais moleculares com contribuições distintas do oxigénio e do nitrogénio. As orbitais moleculares de ligação pertencem predominantemente ao oxigénio e as orbitais moleculares anti-ligação pertencem predominantemente ao nitrogénio. Este simples modelo de ligação mostra a natureza radical do NO e uma ordem de ligação  $2\frac{1}{2}$ , que é consistente com o comprimento da sua ligação intermédia (1,15 Å) em relação ao do  $\text{N}_2$  (1,06 Å) e ao do  $\text{O}_2$  (1,18 Å) (Toledo Jr. e Augusto, 2012).

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

Termodinamicamente, o NO é instável – a energia de Gibbs para a sua formação a partir de oxigénio e de nitrogénio moleculares é muito elevada ( $\Delta_f G^\circ_{298} = 86,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e ocorre apenas para temperaturas elevadas. A sua decomposição não é favorável do ponto de vista cinético, daí que o gás possa ser armazenado à pressão de 1 atm e temperatura ambiente sem decomposição apreciável. Para pressões elevadas ocorre desproporção com formação de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{NO}_2$  (Bonner e Stedman, 1996).

O conhecimento da química do NO em sistemas biológicos normalmente organizado em função de efeitos directos e indirectos (Miranda *et al.*, 2000, Wink e Mitchell, 1998). Os

efeitos directos resultam de reacções directas do NO com alvos moleculares (complexos metálicos ou espécies radicalares) de onde resulta um efeito biológico enquanto os efeitos indirectos são mediados por produtos de reacção de NO com  $O_2$  ou  $O_2^-$  para formar RNS que, por sua vez, reagem com moléculas biológicas (Wink e Mitchell, 1998; Ana Ledo, 2007).

### 3.2. Reactividade Química do NO: Efeitos Directos e Indirectos

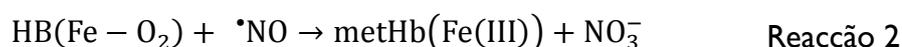
O NO é um fraco agente oxidante e redutor em condições fisiológicas. É uma molécula sem carga e uma base de Lewis muito fraca para actuar como agente nucleofílico. Apesar de ser um radical livre, o NO reage apenas com algumas células alvo e esta preferência/selectividade foi muito importante para a evolução do NO como mediador biológico (Toledo Jr. e Augusto, 2012).

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

i) Ligação ao centro metálico sem alteração da carga formal de valência do metal (nitrosilação). Esta reacção ocorre tipicamente entre o NO e o heme ferroso presente em algumas proteínas (reacção 1), nomeadamente com a guanilato ciclase solúvel (sGC), o alvo de acção biológica do NO mais bem conhecido, várias enzimas do grupo citocromo P450 (catalizam a hidroxilação de vários substratos relevantes no metabolismo de drogas, na biossíntese de colesterol e esteróis) e a óxido nítrico sintase (NOS). A formação de complexos Fe(II)-nitrosilo é um exemplo claro deste tipo de reacção.



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



**Efeitos Indirectos:** A variação da concentração e a fonte de NO parecem determinar o seu efeito biológico. É aceite, embora sem validação experimental robusta, que

enquanto que para concentrações baixas de NO (<1 μM) predominam os efeitos directos acima referidos, para concentrações elevadas (>1 μM), normalmente associadas a processos patológicos, prevalecem os indirectos (Wink e Mitchell, 1998). A reacção do NO com espécies diamagnéticas, como os tióis ou outras biomoléculas, ocorre a uma velocidade lenta em sistemas biológicos (Wink *et al.*, 1994) e é precedida por activação do radical por reacção com O<sub>2</sub> ou O<sub>2</sub><sup>-</sup>. As reacções subsequentes incluem-se na categoria de efeitos indirectos do NO (Wink e Mitchell, 1998; Ledo, 2007).

Os efeitos indirectos do NO em sistemas biológicos podem traduzir-se em três tipos de reacções associadas respectivamente, às noções de stresses oxidativo, nitrosativo e nitrativo: oxidação-redução, nitrosação e nitração. Dependendo da RNS predominante e do ambiente celular, numa situação de desequilíbrio uma ou mais destas reacções pode predominar e caracterizar o tipo de stresse. A química de oxidação-redução envolve a transferência de electrões entre os substratos. As espécies reactivas derivadas da reacção de NO com O<sub>2</sub> com O<sub>2</sub><sup>-</sup> podem ter um poder oxidante moderado, ou seja, ser capazes de remover electrões a outras moléculas (Ledo, 2007).

No sistema nervoso central o ONOO<sup>-</sup> é sugerido como a principal RNS mediadora de stresse oxidativo (Beckman, 1991). A impossibilidade de ser medido em sistemas biológicos devido ao seu reduzido tempo de vida tem mantido acesa a discussão sobre a sua participação nos danos oxidativos atribuídos ao NO (Fukuto e Ignarro, 1997). A figura 2 esquematiza a química biológica do NO.

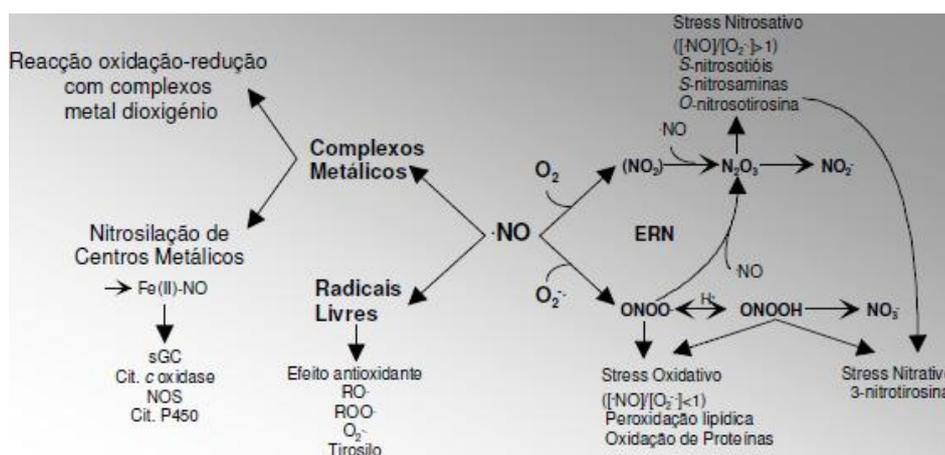


Figura 2 – Química biológica do NO, com distinção entre efeitos directos (à esquerda do NO) e indirectos (à direita do NO). (Adaptado de Davis *et al.*, 2001; Wink e Mitchell, 1998).

### 3.3. Transporte biológico do NO

O NO é razoavelmente solúvel em água e cerca de 10 vezes mais solúvel em solventes hidrofóbicos (Shaw e Vosper, 1977). Por isso mesmo a bicamada lipofílica que constitui as membranas biológicas não representa uma barreira ao NO, que é transportado por difusão simples. Este tipo de transporte confere-lhe propriedades biológicas únicas: atravessa facilmente membranas e não necessita de transportadores membranares; não fica confinado às células ou compartimentos celulares que o produzem; há um movimento de NO das células produtoras, onde se encontra mais concentrado, para as células vizinhas através de difusão simples, um processo dirigido pelo gradiente espacial de concentração (Toledo Jr. e Augusto, 2012).

## 4. Biosíntese do óxido nítrico

Devido ao seu baixo peso molecular e propriedades hidrofóbicas, o NO não pode ser armazenado em vesículas e é capaz de atravessar com facilidade as membranas plasmáticas das células por difusão simples (Shaw and Vosper, 1977), sem que para isso seja necessária a existência de receptores ou transportadores transmembranares.

Nos mamíferos, o NO é sintetizado em vários tipos de células, tais como os neurónios, células endoteliais e macrófagos por uma família de isoenzimas designadas por NOSs (nitric oxide synthases).

As primeiras descrições da sintase do NO demonstraram que a sua síntese requer L-arginina e NADPH, resultando na formação de citrulina. Esta síntese requer ainda outros quatro cofactores/coenzimas, bem como a presença de calmodulina. Trabalhos posteriores demonstraram que o oxigénio é também um substrato para esta reacção, sendo incorporado tanto no NO como na citrulina (Knowles e Moncada, 1994). Sabe-se agora que a síntese do NO a partir da arginina é uma reacção que envolve duas mono-oxigenações separadas. Na primeira a *N*<sup>w</sup>-hidroxiarginina é uma espécie intermediária formada pela reacção de hidroxilação da L-arginina, que requer uma molécula de oxigénio e uma molécula de NADPH, bem como a presença de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>). O segundo passo resulta da oxidação da *N*<sup>w</sup>-hidroxiarginina para formar a citrulina e NO, reacção representada pela figura 3. O domínio redutase liga os dois cofactores de flavina e funciona como aceitador de electrões provenientes do NADPH, passando-os para o grupo hémico, de modo semelhante ao observado para as citocromo P450 redutases (Knowles e Moncada, 1994). De facto, a semelhança na sequência entre a sintase do NO e a redutase do citocromo P450 juntamente com a presença de um centro hémico com as propriedades espectrais do citocromo P450,

demonstram que a sintase do NO é a primeira enzima P450 auto-suficiente a ser identificada. Além disso há evidências que sugerem que a  $N^w$ -hidroxiarginina pode ser convertida em NO e citrulina pela redutase microsossomal do citocromo P450 do fígado (Knowles e Moncada, 1994).

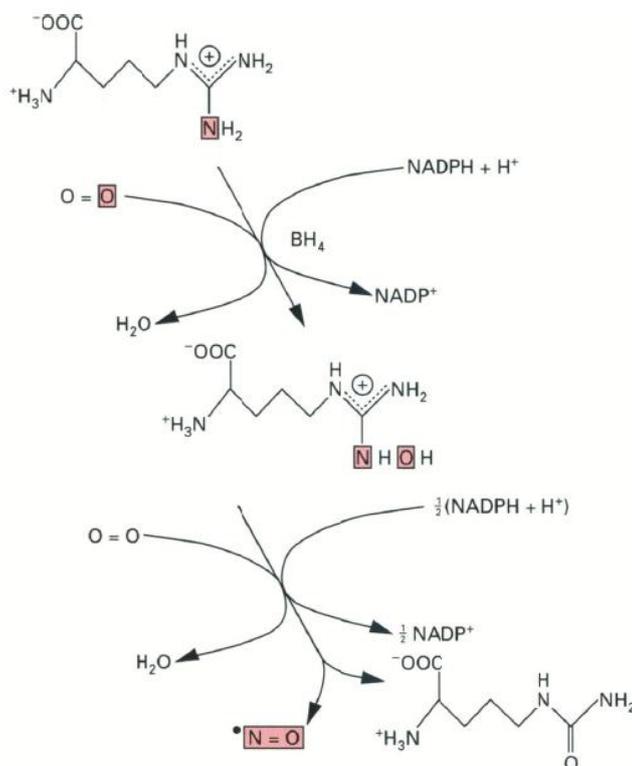


Figura 3 – Reacção de síntese do NO. O N e O dentro dos quadrados demonstram a origem dos átomos constituintes do NO. (Adaptado de Knowles e Moncada, 1994.)

#### 4.1. Isoenzimas: nNOs, eNOS e iNOS

Até ao momento foram caracterizadas e clonadas três sintases do NO distintas, o que veio permitir classificá-las em: nNOS (neuronal NO synthase) que se encontra presente nos neurónios e é expressa constitutivamente, sendo a sua actividade regulada pelo cálcio, também designada como NOS tipo I; eNOS (endothelial NO synthase), designada NOS tipo III, que está presente nas células endoteliais do sistema vascular, sendo também expressa constitutivamente e regulada pelo cálcio; iNOS (inducible NO synthase), designada NOS tipo II, presente nos macrófagos e é expressa de forma induzida pela presença de citocinas não sendo regulada pelo cálcio (Förstermann e Kleinert, 1995; Mayer e Andrew, 1998).

Embora distintas em vários aspectos, as isoformas de NOS partilham três características estruturais: o terminal amínio forma o domínio oxigenase catalítico e liga os cofactores heme,  $\text{BH}_4$  e o substrato L-arginina; o terminal carboxílico forma o domínio redutase e liga os restantes cofactores (FMN, FAD) e o co-substrato NADPH; existe um

local de ligação para a calmodulina entre os dois domínios (Ghosh e Stuehr, 1995; McMillan e Masters, 1995).

A nNOS foi a primeira isoenzima a ser purificada e clonada, a sua actividade é dependente de cálcio e calmodulina e é expressa constitutivamente cérebro. Devido à sua ampla distribuição, por vários tecidos do sistema nervoso central e periférico e na medula óssea, e à sua elevada actividade no cérebro e músculo-esquelético, é provável que esta isoenzima seja responsável pela maior proporção de actividade da sintase do NO nos mamíferos. A clonagem, sequenciação e caracterização do cDNA da nNOS revelaram uma elevada homologia (93%) entre a nNOS do rato e a nNOS do homem, o que significa que esta enzima mantém uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre espécies.

A eNOS, a sintase do NO constitutiva das células do endotélio vascular, aparenta funcionalidade semelhante à nNOS e actividade distinta em relação à iNOS, a isoenzima encontrada em macrófagos activados. As duas primeiras isoenzimas são constitutivas e dependentes de cálcio e calmodulina para a sua actividade, ao contrário do que ocorre com a iNOS. Com a clonagem da eNOS bovina e humana foi possível perceber que esta e a nNOS têm produtos de genes distintos, com apenas 57% de homologia de aminoácidos entre si. A eNOS tem em comum com a nNOS os locais de ligação da calmodulina, NADPH e FAD, mas apresentam diferenças ao nível do N-terminal. Esta isoforma de sintase do NO é, provavelmente, responsável pela actividade da sintase do NO no endotélio vascular dos vasos sanguíneos: a análise BLOT revelou a presença de mRNA para eNOS nas células de endotélio vascular de artérias, pequenos vasos ou veias de humanos, bovinos, coelhos e ratos (Knowles e Moncada, 1994).

Após exposição de vários tipos de células e tecidos a citocinas ou produtos bacterianos, uma sintase do NO é induzida o que revelou que esta é diferente da nNOS e eNOS. Os macrófagos de roedores têm sido a fonte de estudos intensivos sobre a iNOS. A sintase de NO dos macrófagos tem sido purificada e é totalmente activa tanto na ausência de cálcio como na ausência de calmodulina. A sequência de aminoácidos demonstra que esta enzima indutível é bastante distinta das outras duas isoenzimas constitutivas, partilhando 51% e 54% de homologia com a eNOS e nNOS, respectivamente (Knowles e Moncada, 1994).

Os genes que codificam a sintase do NO representam uma família de genes dispersa em três diferentes cromossomas, uma vez que o gene que codifica a nNOS se encontra no cromossoma 12, o gene da eNOS encontra-se no cromossoma 7 e o gene para a iNOS encontra-se no cromossoma 17.

Estudos intensivos sobre as sintases do NO durante os últimos 5 anos têm revelado uma família de enzimas, capazes de realizar complexas reacções, que aparentam uma elevada

conservação entre espécies mamíferas estudadas até agora. Esta conservação entre espécies, juntamente com a diversidade das isoenzimas e a enorme lista de funções fisiológicas que desempenham, sugere que a síntese do NO a partir da L-arginina é um mecanismo de regulação e defesa do hospedeiro de grande importância. A combinação das várias funções que o NO desempenha, nomeadamente sinalização intracelular, intercelular e como molécula citotóxica, não tem precedentes na biologia.

## **5. Mecanismos de sinalização do óxido nítrico no cérebro**

Tal como já foi dito anteriormente, o NO é uma molécula sinalizadora difusível e que está amplamente envolvida em processos fisiológicos e patológicos como por exemplo na doença de Alzheimer. No cérebro, a síntese de NO depende da activação dos receptores NMDA do glutamato que desencadeia uma cadeia de sinalização intracelular com efeitos na plasticidade sináptica, no desenvolvimento neuronal, na degenerescência sugerindo portanto que o NO intervém nestes processos.

### **5.1. Hipocampo**

Ao NO atribui-se a capacidade que o ser humano tem em adquirir conhecimentos e experiências, sendo o hipocampo um dos locais mais importantes neste processo de aquisição de memória sobretudo nas memórias de longa duração.

Os mamíferos possuem um hipocampo em cada hemisfério. É uma estrutura de forma curva que se localiza no lobo temporal mediano do SNC. Cada hipocampo é constituído por duas camadas de células principais em forma de “C” que se encaixam uma na outra. A primeira destas camadas é formada por células piramidais (que no humano formam as sub-regiões CA1 a CA4 e no rato formam as sub-regiões CA1 e CA3) enquanto que a segunda é formada pelas células granulares do giro dentado (DG), o hipocampo recebe também informação oriunda do septo, amígdala, tálamo, hipotálamo e núcleos monoaminérgicos do tronco cerebral e, em algumas espécies, do hipocampo contralateral (situado no hemisfério oposto). Embora não exista enervação do córtex sensorial primário, a informação sensorial chega indirectamente ao hipocampo a partir do córtex associativo relacionado com o estado de alerta, atenção, emoção e memória (Copper e Lowenstein, 2003).

Os níveis mais elevados de NO em todo o organismo foram encontrados nos neurónios (Bredt, 1999), sabendo-se que o NO está envolvido na plasticidade sináptica em diferentes áreas do cérebro, incluindo o cerebelo e o hipocampo. O NO contribui para a

plasticidade sináptica no SNC entre as quais se destaca a potenciação de longa duração (LTP), bem como a existência de outros tipos de plasticidade sináptica (Garthwaite e Boulton, 1995; Prast e Philippu, 2001; Bliss e Collingridge, 1993). A LTP corresponde a um aumento, de longa duração, na transmissão sináptica e representa um modelo experimental de estudo da memória e da aprendizagem (Bliss e Collingridge, 1993). Estudos recentes revelam que a LTP pode ser comunicada a sinapses “vizinhas” perto do local de indução (Engert e Bonhoeffer, 1997).

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

## **5.2. Receptores NMDA no hipocampo**

Os receptores NMDA têm um papel fundamental no processo de memória e aprendizagem. A activação dos receptores NMDA conduz ao aumento de cálcio intracelular no neurónio pós-sináptico que por sua vez se liga à calmodulina activando a nNOS. Como anteriormente referimos, o NO vai activar a guanilato ciclase solúvel (sGC) levando ao aumento de cGMP. Parte deste é libertado no fluido extracelular através de transportadores de cGMP presentes nas membranas celulares (Sager, 2004). Vários estudos indicam que a activação desta via glutamato-NO-cGMP está envolvida em algumas formas de aprendizagem (Danysz *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1998). O papel do NO na aprendizagem é de acordo com os estudos efectuados mediado pela activação da guanilato ciclase solúvel e pelo aumento de cGMP (Figura 4). Demonstrou-se também que a administração de análogos do cGMP permeáveis às membranas facilitou a consolidação de memória (Bernabeu *et al.*, 1996), enquanto a administração bilateral intra-hipocampo de um inibidor da sGC provocou amnésia total na aprendizagem de fuga quando administrado imediatamente após o treino (Bernabeu *et al.*, 1997). Todos estes resultados indicam que o aumento de cGMP produzido pela guanilato ciclase em resposta ao NO tem um papel fundamental na memória e aprendizagem.

## **5.3. Neurotransmissão e Neuromodulação**

O conceito de NO enquanto neuromodulador tomou forma quando se relacionou a activação do receptor do glutamato do tipo NMDA com a síntese do radical em fatias de cérebro (Garthwaite *et al.*, 1988, Garthwaite *et al.*, 1989). A actividade reguladora do NO é

particularmente relevante no hipocampo uma vez que tem sido proposto o seu envolvimento nos mecanismos de memória e aprendizagem bem como nos mecanismos de morte celular associados ao envelhecimento e neurodegenerescência nesta estrutura do SNC. Neste contexto é importante salientar que o NO é um mensageiro distinto dos convencionais – como é um gás hidrofóbico e altamente difusível, não pode ser armazenado em vesículas e libertado face a uma estimulação. Antes, quando a célula produtora recebe o estímulo apropriado, sintetiza NO que então difunde intra e intercelularmente, sem que estruturas membranares limitem a sua esfera de acção (Ana Ledo, 2007). Por outro lado, não existem receptores membranares específicos para o NO como acontece para outros neurotransmissores. O seu principal alvo molecular é a guanilato ciclase solúvel que se encontra no citosol das células alvo.

A guanilato ciclase solúvel (sGC) foi o primeiro alvo fisiológico do NO a ser identificado (Arnold *et al.*, 1977). A enzima faz parte da família de nucleótido ciclases onde se incluem a guanilato ciclase membranares e a adenilato ciclase e cataliza a conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (cGMP). Embora ainda não esteja ainda totalmente esclarecido o mecanismo de activação da sGC, sabe-se que o NO se liga ao ferro hémico resultando daí uma alteração conformacional e quebra da ligação axial do heme a um resíduo de histidina. (Stone e Marletta, 1996). O cGMP formado por actividade desta enzima é um mensageiro intracelular, isto é, traduz o sinal de NO numa resposta celular. A elevação da concentração intracelular de cGMP resulta na regulação de canais iónicos, na activação proteína cinases dependentes de cGMP – cGKI e cGKII – que fosforilam resíduos de serina e treonina (Jurado *et al.*, 2005) em proteínas que regulam processos fisiológicas diversos no hipocampo, nomeadamente alguns associados à aprendizagem (Schlossmann e Hofmann, 2005).

### **5.3.1. Glutamato e Óxido Nítrico**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC dos mamíferos (Clements, 1996, Clements *et al.*, 1992, Nicholls e Attwell, 1990). No hipocampo por exemplo, 90 % das sinapses são glutamatérgicas (Vizi e Kiss, 1998). O neurotransmissor é armazenado em vesículas no terminal pré-sináptico, sendo libertado quando este recebe um estímulo apropriado. Uma vez na fenda sináptica, liga-se a receptores ionotrópicos a outros de natureza metabotrópica, funcional e farmacologicamente distintos (Ana Ledo, 2007). A activação de receptores metabotrópicos resulta na activação de proteínas G, que podem conduzir à supressão de corrente de canais de K<sup>+</sup>, ao aumento de corrente em canais iónicos não selectivos, à inibição de receptores de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) e à

potenciação de receptores ionotrópicos (Conn e Pin, 1997, Pin e Duvoisin, 1995). Os receptores ionotrópicos são canais iónicos cuja actividade depende da ligação de um ligando específico, neste caso glutamato, e são responsáveis pela maior parte da transmissão sináptica excitatória no SNC.

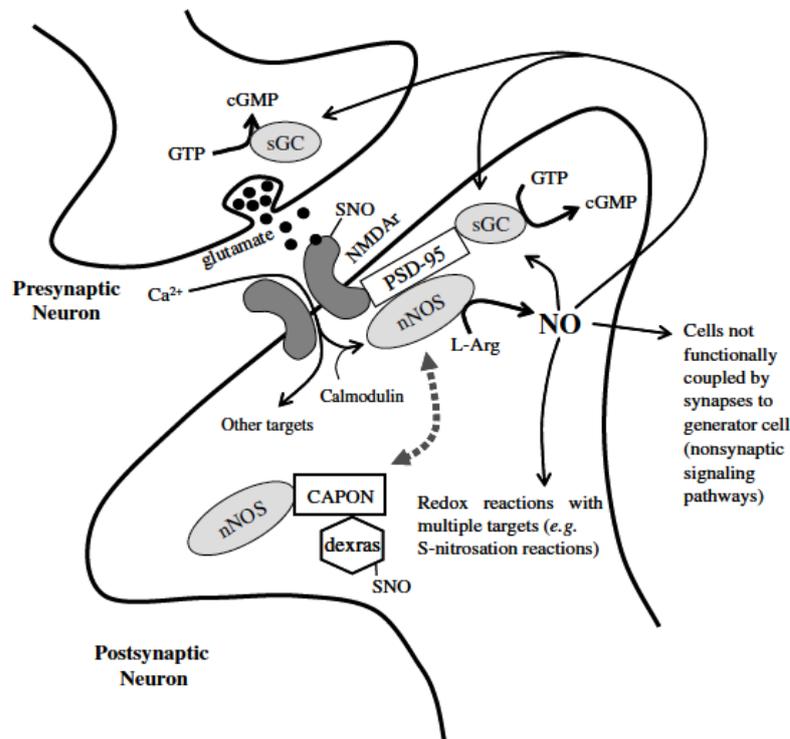


Figura 4 – Esquema de sinapse com o envolvimento do NO e de receptores NMDA do glutamato. (Adaptado de Ledo *et al.*, 2004).

Existem três tipos de receptores ionotrópicos de glutamato com propriedades distintas. Os nomes foram atribuídos em função da selectividade dos seus agonistas não endógenos – NMDA, AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-4-metil-4-isoxazolepropionato) e KA (cainato). Estes 2 últimos são normalmente designados de não-NMDA, pois a especificidade de ligação a cada um dos agonistas não é total. Para além das diferenças farmacológicas entre os diferentes receptores ionotrópicos, existem também diferenças ao nível da permeabilidade iónica: enquanto os receptores NMDA são permeáveis principalmente a  $\text{Ca}^{2+}$  e apenas ligeiramente permeáveis a  $\text{Na}^+$ , os receptores não-NMDA apresentam tipicamente maior permeabilidade a  $\text{Na}^+$  (Dingledine *et al.*, 1999, Kew e Kemp, 2005, Ozawa *et al.*, 1998).

A observação de que o aminoácido excitatório glutamato, ao actuar nos receptores NMDA localizados nos neurónios provoca a libertação de um agente com propriedades semelhantes ao EDRF levou Garthwaite *et al.* (1988) a sugerir que o EDRF era uma molécula mensageira do sistema nervoso central. Um ano antes o EDRF foi identificado como sendo o NO (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987; Snyder e Brecht, 1991). Foram necessários mais

alguns anos até que fosse possível demonstrar, pela primeira vez, que o NO modula a libertação neuronal de neurotransmissores tanto em condições *ex vivo* (Hanbauer *et al.*, 1992; Lonart *et al.*, 1992) como *in vivo* (Prast e Philippu, 1992) o que levou à conclusão de que está envolvido na neurotransmissão química.

## 6. O papel do Óxido Nítrico na Plasticidade Sináptica

A sintase do NO é expressa na região CA1 do hipocampo (Hara *et al.*, 1996; Doyle e Slater, 1997), e na região CA1, a LTP é induzida pós-sinápticamente (Medina e Izquierdo, 1995). Este conhecimento conduziu à hipótese de que um mensageiro retrógrado se difunde do terminal pós- para o pré-sináptico durante a indução da LTP (Schuman e Madison, 1994). No hipocampo, o NO foi identificado como sendo o mensageiro retrógrado, (Arancio *et al.*, 1996). De facto, inibidores da nNOS bloquearam a LTP no hipocampo (Bohme *et al.*, 1991) e interferiu com a aprendizagem espacial, indicando que o NO está envolvido em algumas formas de memória (Bohme *et al.*, 1993).

Encontra-se hoje bem estabelecido que o NO participa em vários tipos de plasticidade sináptica, incluindo a depressão de longa duração (LTD) no cerebelo e a potenciação de longa duração no hipocampo (LTP) e córtex cerebral (Garthwaite e Boulton, 1995; Daniel *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 1998; Centonze *et al.*, 1999). LTP e LTD são formas modificadas de transmissão sináptica. Este tipo de plasticidade neuronal, demonstrada pela primeira vez no hipocampo (Lomo, 1966), tem sido encontrado noutras regiões do cérebro como um fenómeno muito difundido no SNC. Tal como já foi referido, a descoberta de que o NO actuava como mensageiro retrógrado permitiu perceber que este tem influência na transmissão sináptica e promove a plasticidade sináptica.

Consistente com esta hipótese foi a descoberta que a LTP no hipocampo é eliminada (Böhme *et al.*, 1991; O'Dell *et al.*, 1991; Schuman and Madison, 1991; Bon *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1996) ou parcialmente bloqueada (Gribkoff and Lum-Ragan, 1992; Chetkovich *et al.*, 1993; Haley *et al.*, 1993; Iga *et al.*, 1993) por inibidores da NOS e pelo *knocking-out* da nNOS e eNOS em ratinhos duplamente mutados (Son *et al.*, 1996). A inibição da LTP também é conseguida através da injeção de inibidores da NOS nos terminais pós-sinápticos, mas não ocorre caso a injeção seja nos terminais pré-sinápticos (O'Dell *et al.*, 1991; Schumann e Madison, 1991). Estas e outras descobertas sugerem que, tal como referido anteriormente, como consequência de estimulação repetida, o NO é sintetizado na célula pós-sináptica, atravessa o espaço extracelular e induz a formação de cGMP no terminal do nervo pré-sináptico, modulando a função celular que conduz à LTP.

Uma vez que a LTP está associada à aprendizagem, é de esperar que o bloqueio de um mensageiro retrógrado envolvido na plasticidade sináptica venha a afectar essa mesma capacidade. De facto, inibidores da NOS reduzem a capacidade de animais realizarem várias tarefas de aprendizagem. A manipulação do sistema NO-cGMP afecta a aprendizagem associativa do olfacto em ratos recém-nascidos (Samama e Boehm, 1999), o reconhecimento de indivíduos da mesma espécie numa tarefa de interacção olfactiva (Böhme *et al.*, 1993), aprendizagem espacial (Chapman *et al.*, 1992; Böhme *et al.*, 1993; Mogensen *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995; Ho" Ischer *et al.*, 1996; Toyoda *et al.*, 1996; Prendergast *et al.*, 1997; Ingram *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998), o reconhecimento de objectos que se baseia na memória de trabalho (Cobb *et al.*, 1995; Prickaerts *et al.*, 1997) e a habituação a um novo ambiente (Yamada *et al.*, 1995).

A eficácia dos inibidores da NOS nestas tarefas sugere que o NO está envolvido na formação de vários tipos de memória a longo prazo. Nestas tarefas, o NO afecta, preferencialmente, a aquisição de memória, um processo que se acredita estar relacionado com a fase de indução da LTP.

Várias linhas de evidência sugerem que o NO e o cGMP são necessários para facilitar a plasticidade sináptica em várias estruturas do cérebro incluindo o hipocampo, córtex cerebral, amígdala, entre outros. A nNOs e eNOs estão envolvidas nesta função do NO e este influencia a LTP. De acordo com esta conclusão está também o facto de a inibição da NOS afectar alguns tipos de aprendizagem através da deterioração da aquisição de memória.

Por outro lado, estudos com genes *knock-out* foram uma nova abordagem a esta temática. Para testar como a transmissão neuronal é afectada na ausência da sintase do NO foi criada uma estirpe de ratinhos que não expressavam a nNOS. A plasticidade sináptica no cérebro desses animais não foi comprometida e não houve sinais de défices de aprendizagem. De forma surpreendente, outros estudos demonstraram que bloqueadores da sintase do NO afectavam a LTP no cérebro. Demonstrou-se posteriormente que os neurónios piramidais no hipocampo expressam, também, a forma endotelial da sintase do NO (eNOS) (O'Dell *et al.*, 1994). A nNOS por si só pode não ser crucial na indução do LTP ou dos processos de aprendizagem, ou talvez a expressão de mais eNOS durante o desenvolvimento possa compensar a falta de nNOS. Estes resultados suportam a hipótese de que o NO é um importante mensageiro neuronal que actua na plasticidade sináptica.

O fenómeno inverso da LTP é o enfraquecimento da força sináptica por um longo período, denominada de depressão de longa duração (LTD), e normalmente surgem em resposta a uma estimulação tetânica fraca. No hipocampo, a LTD é dependente da activação de receptores do glutamato ionotrópicos (nomeadamente do tipo NMDA) e

metabotrópicos (Bashir *et al.*, 1993, Dudek e Bear, 1992, Stanton *et al.*, 1991, Wexler e Stanton, 1993). Observa-se elevação da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nos terminais pós- e pré-sináptico, e também neste caso, o NO foi identificado como um mensageiro retrógrado (Izumi e Zorumski, 1993). Contrariamente ao observado em LTP, o NO diminui a quantidade de neurotransmissor libertada, o que claramente resulta na diminuição da força sináptica (Stanton *et al.*, 2003).

## 7. Medição do Óxido Nítrico no Cérebro

A detecção de NO representa um desafio para os investigadores devido à sua reactividade, rápida eliminação, bem como à sua gama de concentrações fisiológicas.

Por ser um radical com uma reactividade significativa, designadamente com o radical superóxido e também em menor extensão com o oxigénio, tem um tempo de vida curto no organismo o que dificulta a sua medição directa *in vivo* em tempo real (Archer, 1993). Frequentemente, são utilizados inibidores da sintase do NO (NOS), enzima responsável pela conversão da L-arginina em NO (Bredt *et al.*, 1991). Estes agentes designados como inibidores da NOS são análogos substituídos da L-arginina que inibem competitivamente a NOS (Palmer *et al.*, 1988; Sakuma *et al.*, 1988). Assim analisam-se produtos resultantes da sua actividade biológica, em vez do próprio NO.

Os métodos mais utilizados para a sua medição são baseados em espectroscopia e electroquímica. Métodos baseados na absorção na região do visível (como por exemplo, o método de Griess), beneficiam de uma instrumentação e procedimentos experimentais simples, mas são incapazes de detectar NO em tempo real e a baixas concentrações. Indicadores ou sondas de fluorescência sensíveis ao NO são sensíveis a produtos reactivos resultantes da oxidação do NO. Além disso os dois tipos de reacções de quimiluminescência que existem para a sua detecção são baseados no NO ou um produto derivado que reage com  $\text{O}_3$  ou luminol. Ambos têm baixos limites de detecção e um intervalo de detecção alargado. A ressonância paramagnética electrónica (EPR) é um bom método de detecção e imagem da produção de NO em amostras biológicas tanto *in vivo* como *ex vivo*. Sensores electroquímicos sensíveis e selectivos têm sido produzidos com o uso de membranas permeáveis e/ou modificações em sensores electrocatalíticos para reduzir o potencial necessário à oxidação do NO (Santos *et al.*, 2008; Hetrick e Schoenfish, 2009). Outra abordagem promissora para a medição de NO passa pelo uso de microelctrodos de fibra de carbono inseridos em tecido cerebral para medir a distribuição de NO (Ledo *et al.*, 2005).

As concentrações de NO podem ser medidas directamente com eléctrodos selectivos em experiências com células (Malinski *et al.*, 1993), sendo que o intervalo de valores da concentração fisiológica de NO aceite é de 1 nM a 100 nM. Em condições infecciosas e inflamatórias a concentração de NO aumenta devido à expressão de iNOs nas células do sistema imunitário. Este aumento permite a detecção instantânea de concentrações de NO em fluidos biológicos e tecidos de animais experimentais por ressonância paramagnética electrónica (EPR).

## Conclusão

A descoberta do NO demonstrou que as células conseguem comunicar através da produção e da difusão local de uma molécula instável e hidrofóbica. Desde a demonstração que as propriedades relaxantes vasculares derivam do NO, esta molécula fascinante tem demonstrado que desempenha múltiplos e complexos papéis em vários sistemas biológicos. Sabe-se hoje que é uma molécula essencial em muitas funções fisiológicas, especialmente no cérebro. Induz a vasodilatação, inibe a apoptose e desempenha um papel muito importante nos processos de memória, tornando-o num agente terapêutico muito valioso no que toca a doenças associadas ao envelhecimento.

Hoje sabe-se que o hipocampo é uma estrutura heterogénea no que se refere à síntese de NO dependente da activação de receptores NMDA, com maior produção do gás na subregião CA1, o que coincide não só com diferenças funcionais conhecidas para essas subregiões no âmbito dos mecanismos da memória, como também com uma susceptibilidade diferencial associada a processos de envelhecimento e neuropatologias (Lourenço *et al.* 2014; Ledo, 2007).

No entanto, apesar de todas estas descobertas e evidências, as acções químicas e biológicas do NO são bastante complexas para uma molécula, aparentemente, tão simples. Após a sua descoberta foi necessário aprender a manipulá-la, conhecer e compreender o seu papel no metabolismo dos organismos vivos.

O cérebro humano continua a ser alvo de imensas investigações por ainda haver tanto para descobrir sobre ele. Por isso mesmo muitas descobertas irão surgir na busca incessante que o Homem promove para melhor se conhecer, compreender e melhorar sua saúde.

## Bibliografia

BARBOSA, R. *et al.* – ***In vivo* Real-time Measurement of Nitric Oxide in Anesthetized Rat Brain.** *Methods in Enzymology*, 441 (2008) 351-367.

BON, C., GARTHWAITE, J. – **On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation.** *The Journal of Neuroscience*, 23(5) (2003) 1941-1948.

BREDT, D., SNYDER, S. – **Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 9030-9033.

GUIX, F., *et al.* – **The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain.** *Progress in Neurobiology*, 76 (2005) 126-152.

HALBACH, O., ALBRECHT, D., HEINEMANN, U., SCHUCHMANN, S. – **Spatial Nitric Oxide Imaging Using 1,2-Diaminoanthraquinone to Investigate the Involvement of Nitric Oxide in Long-Term Potentiation in Rat Brain Slices.** *Neuroimage*, 15 (2002) 633-639.

HÖLSCHER, C. – **Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity.** *Trends Neurosci.*, 20 (1997) 298-303.

HOPPER, R., GARTHWAITE, J. – **Tonic and Phasic Nitric Oxide Signals in Hippocampal Long-Term Potentiation.** *The Journal of Neuroscience*, 26(45) (2006) 11513-11521.

IADECOLA, C., *et al.* – **Nitric Oxide Synthase Inhibition and Cerebrovascular Regulation.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14 (1994) 175-192.

IGNARRO, L. *et al.* – **Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 9265-9269.

KISS, J., VIZI, E. – **Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission.** *TRENDS in Neurosciences*, 24 (2001) 211-215.

KNOWLES, R., MONCADA, S. – **Nitric oxide synthases in mammals.** *Biochem. J.*, 298 (1994) 249-258.

LEDO, A. *et al.* – **Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of NMDA glutamate receptor.** PNAS, 102 (2005) 17483-17488.

LEDO, A., FRADE, J., BARBOSA, R., LARANJINHA, J. – **Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions.** Molecular Aspects of Medicine, 25 (2004) 75-98.

LEDO, Ana Margarida da Cruz – Dinâmica de Concentração do Óxido Nítrico Produzido no Hipocampo de Rato por Activação de Receptores do Glutamato: Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2007. 1-166 pp. Dissertação apresentada para prestação de provas de doutoramento em Bioquímica, especialidade de Toxicologia Bioquímica.

LIN, A., KAO, L., CHAI, C. – **Involvement of Nitric Oxide in Dopaminergic Transmission in Rat Striatum: An In Vivo Electrochemical Study.** Journal of Neurochemistry, 65 (1995) 2043-2049.

LIU, D. *et al.* – **NMDA induces NO release from primary cell cultures of human fetal cerebral cortex.** Neuroscience Letters, 223 (1997) 145-148.

LOURENÇO, C. *et al.* – **The pattern of glutamate-induced nitric oxide dynamics *in vivo* and its correlation with nNOS expression in rat hippocampus, cerebral cortex and striatum.** Brain Research, 1554 (2014) 1-11.

MAJLESSI, N. *et al.* – **Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat.** Neurobiology of Learning and Memory, 90 (2008) 413-419.

NKONENKO, I. *et al.* – **Nitric oxide mediates local activity-dependent excitatory synapse development.** PNAS, (2013) E4142-E4151.

PIEDRAFITA, B. *et al.* – **The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain *in vivo* and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 14 (2007) 254-258.

PRAST, H., PHILIPPU, A. – **Nitric oxide as modulator of neuronal function.** Progress in Neurobiology, 64 (2001) 51-68.

SANTOS, R. *et al.* – **A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue.** *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008) 704-709.

SCHWEIGHOFER, N., FERRIOL, G. – **Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A stimulation study.** *PNAS*, 97 (2000) 10661-10665.

STUART-SMITH – **Demystified...Nitric oxide.** *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, 55 (2002) 360-366.

TOLEDO JR., J, AUGUSTO, O. – **Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide.** *Chemical Research in Toxicology*, 25 (2012) 975-989.

VINCENT, S. – **Nitric oxide neurons and neurotransmission.** *Progress in Neurobiology*, 982 (2009) 1-10.

VIZI, E., KISS, J., LENDVAI, B. – **Nonsynaptic communication in the central nervous system.** *Neurochemistry International*, 45 (2004) 443-451.

WEGENER, G., VOLKE, V., ROSENBERG, R. – **Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine *in vivo*.** *British Journal of Pharmacology*, 130 (2000) 575-580.

XU, L. *et al.* – **Nitric oxide (NO) serves as a retrograde Messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors.** *Nitric Oxide*, 17 (2007) 18-24.