



João Miguel Antunes Crisóstomo

## Monitorização *In Vivo* de Neurotransmissores e Substratos Metabólicos

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Miguel Antunes Crisóstomo

# Monitorização *In Vivo* de Neurotransmissores e Substratos Metabólicos

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Miguel Antunes Crisóstomo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010139347, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 7 de Setembro de 2015.

---

(João Miguel Antunes Crisóstomo)

Eu, Rui Manuel da Silva Gomes Barbosa, na qualidade de tutor do estudante João Miguel Antunes Crisóstomo, certifico a presente monografia.

Data: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>1. RESUMO/ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>2. COMPREENDER O FUNCIONAMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....</b>	<b>6</b>
<b>3. A MONITORIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> NO CÉREBRO.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Os Sensores e os Biossensores.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. A Microdiálise.....</b>	<b>11</b>
<b>4. A APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Catecolaminas – Dopamina.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Aminoácidos – Glutamato e GABA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Substratos Metabólicos - Glucose e Lactato.....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....</b>	<b>28</b>

## LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

**AA** - Ácido ascórbico

**ADHD** - Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

**AU** - Ácido úrico

**COMT** - Catecol orto-metiltransferase

**DOPAC** - Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético

**fMRI** - Ressonância Magnética Funcional

**FSCV** - Voltametria Cíclica de Varrimento Rápido

**GABA** - Ácido gama-aminobutírico (IUPAC: ácido 4-aminobutanóico)

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Elevada Pressão

**L-DOPA** - L-3,4-dihidroxifenilalanina

**OPA** - Orto-ftaldialdeído

**PET** - Tomografia por Emissão de Positrões

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TTX** - Tetrodotoxina

## I. RESUMO/ABSTRACT

A identificação e quantificação de moléculas ao nível do Sistema Nervoso Central é um ramo da neurobiologia que tem suscitado crescente interesse, muito do qual associado às potencialidades de identificar biomarcadores para as doenças neurodegenerativas. Uma vez que as alterações no espaço extracelular ocorrem numa escala muito reduzida de tempo e em espaços ínfimos, torna-se essencial a aplicação de técnicas que nos permitam monitorizar a concentração de neurotransmissores, neuromoduladores e substratos metabólicos numa resolução temporal e espacial adequada. Por outro lado, o cérebro está “inundado” de centenas de compostos distintos, pelo que atingir seletividade nas medições requiere o uso de ferramentas analíticas de elevado desempenho. Com esta monografia pretende-se dar uma visão geral da investigação desenvolvida nesta área, apresentando duas técnicas distintas utilizadas na monitorização *in vivo* de neurotransmissores e produtos neurometabólicos: os microssensores e a microdiálise.

The identification and measurement of molecules at Central Nervous System has become a neurobiology topic with an increasing interest, namely the identification of new biomarkers for neurodegenerative diseases. Considering the rapid concentration changes of neurochemicals in a very restricted space, it became crucial the use of techniques capable of measuring the dynamics of neurotransmitters, neuromodulators and neurometabolites concentrations with high temporal and spatial resolution. Because the extracellular space of the brain is “flooded” with hundreds of different compounds, the use of high performance (bio)sensing technology is critical in order to achieve a high sensitivity and selectivity/specificity of the *in vivo* measurements. This monograph aims to give an overview of recent developments of the two invasive analytical techniques used for *in vivo* monitoring of neurotransmitters and neurometabolites: microssensors and microdialysis.

## 2. COMPREENDER O FUNCIONAMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O cérebro é, indubitavelmente, o órgão mais complexo em termos biológicos nos seres vivos, tendo sido ao longo dos séculos objeto de diversos estudos pela curiosidade e fascínio que sempre despoletou na comunidade científica, com particular interesse em compreender a forma como regula as nossas funções corporais, pensamentos, emoções e comportamentos.

Os recentes avanços e descobertas ao nível da medicina vêm-nos prometer um tempo de vida mais prolongado e saudável em comparação com os nossos antepassados. No entanto um novo tipo de doenças tem emergido, ainda sem tratamento disponível, designadamente aquelas que afetam as estruturas cerebrais dos indivíduos de idade mais avançada, como é o caso das doenças de Alzheimer e de Parkinson. Para além deste paradigma, as notícias de um aumento do abuso de substâncias psicotrópicas para controlar estados depressivos de humor, resultantes de fatores ambientais/sociais *stressantes* que acompanham a sociedade moderna, obrigam a uma urgência na efetiva prevenção e tratamento destes desequilíbrios (LAMA *et al.*, 2012). Agora e mais do que nunca necessitamos de compreender e decifrar o complexo funcionamento da biofísica e bioquímica cerebral.

Tendo em conta que alterações neurológicas serão sempre acompanhadas por mudanças nas concentrações de substâncias específicas, o estudo da composição química do espaço extracelular reveste-se de extrema importância, de modo a podermos ter uma visão de como os níveis de neurotransmissores e metabolitos variam em resposta a estímulos químicos, físicos ou fisiológicos e, de um modo mais abrangente, quais são os mecanismos subjacentes ao funcionamento cerebral dos organismos.

O sistema nervoso de grande parte dos organismos vivos assenta numa associação de células nervosas (denominadas neurónios) designada por rede neuronal. Esta rede de comunicações assenta num tipo específico de transmissão: a sinapse (Figura 1).

As sinapses podem ser classificadas segundo dois tipos distintos: as sinapses elétricas, que se baseiam na transmissão de corrente elétrica entre neurónios vizinhos através de *gap junctions*; e as sinapses químicas que, sendo as mais comuns, se baseiam na libertação de neurotransmissores por neurónios pré-sinápticos e posterior ligação a recetores membranares nos neurónios pós-sinápticos (KANDEL *et al.*, 2000).

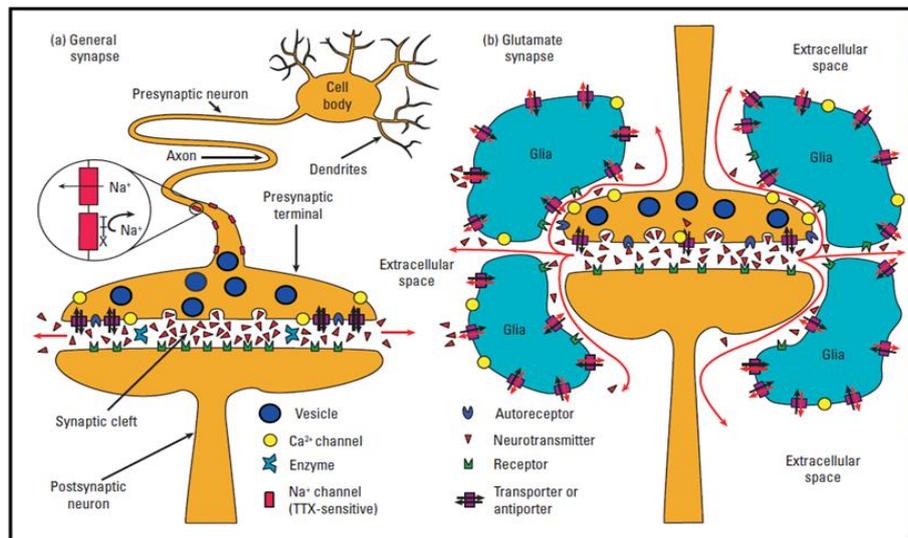


Fig. 1: Ilustrações representativas de sinapses químicas (WATSON *et al.*, 2006).

Mas no fundo o que caracteriza uma molécula como sendo um neurotransmissor? Primeiro, terá de ser sintetizada num neurónio pré-sináptico e transportada até ao terminal pré-sináptico; Segundo, uma vez libertada na fenda sináptica, irá interagir com recetores específicos que vão despoletar uma resposta característica no neurónio pós-sináptico; Terceiro, a sua concentração no espaço extracelular estará dependente de mecanismos ativos de controlo regulados por *feedback* (ANDERZHANOVA *et al.*, 2013).

### 3. A MONITORIZAÇÃO *IN VIVO* NO CÉREBRO

A monitorização *in vivo* de neurotransmissores constitui-se como uma ferramenta de valor inquestionável. Se por um lado as técnicas *ex vivo* (como a análise de cortes histológicos) nos proporcionam informação sobre o *steady-state* do ambiente cerebral (por comparação, é como se tirássemos uma fotografia do espaço cerebral num dado momento fixo no tempo) por outro lado as técnicas *in vivo*, para além de clarificarem a origem dos neurotransmissores (citoplasmática ou vesicular) abrem-nos as portas à dinâmica cerebral, o que nos permite investigar o modo como a complexa rede neuronal que constitui o cérebro regula o fluxo de neurotransmissores, dá-nos uma ideia do efeito fisiológico de fármacos direcionados ao complexo cerebral e ainda clarifica a relação entre as transformações químicas que ocorrem nos neurónios e as decorrentes consequências a nível do comportamento do organismo em estudo.

Atualmente este tipo de medições pode ser realizado com recurso a dois tipos distintos de ferramentas: as técnicas não-invasivas, nas quais se inclui a PET (em que se administra um composto marcado radioativamente, sendo estudada a sua acumulação no cérebro e posterior decaimento radioativo) e a fMRI (que faz uso de imagens de ressonância magnética para correlacionar a atividade cerebral com alterações no fluxo sanguíneo local (BUZSÁKI, 2006)); e as técnicas invasivas, como é o caso dos microssensores e da amostragem por microdiálise. À parte do facto das técnicas não-invasivas trazerem enormes vantagens, uma vez que dispensam o uso de artefactos invasivos, acarretam no entanto elevados custos de processo, sendo que não são as técnicas mais adequadas à realização de estudos em animais de pequenas dimensões, para além de apenas possuírem uma modesta resolução temporal ( $<10s$ ) e espacial ( $<1cm^2$ ) (WATSON *et al.*, 2006). Todas estas premissas atrás referidas têm direcionado as investigações para o desenvolvimento das técnicas invasivas.

### **3.1. OS SENSORES E OS BIOSSENSORES**

A utilização de elérodos de reduzidas dimensões (microelérodos) como sensores para a deteção de compostos neuronais constitui o ramo científico que se designa por eletroquímica *in vivo* (WIGHTMAN, 2015). Estes microssensores podem ser divididos em dois grupos: os microelérodos voltamétricos (vulgarmente designados apenas por microssensores) e os microelérodos enzimáticos (ou biossensores). Os microssensores têm sofrido uma evolução nos últimos tempos, ao ponto mesmo de alcançarem excelentes resoluções espaciais e temporais (da ordem dos micrómetros e dos milissegundos, respetivamente).

Os primeiros microelérodos usados em medições voltamétricas foram construídos com recurso a pasta de carbono incorporada em fios metálicos revestidos a *Teflon*, resultando em elérodos em formato de disco com diâmetros entre os 100 a 300  $\mu m$  (ROBINSON *et al.*, 2008). No entanto, estas primeiras plataformas de eléctrodo eram demasiado grandes em tamanho, o que limitava a sua aplicação nas regiões cerebrais. Começaram deste modo a ser desenvolvidos os microelérodos construídos em fibra de carbono: a fibra de carbono (com um diâmetro geralmente compreendido entre 5-15  $\mu m$ ) é inserida num capilar de vidro, sendo depois seccionada para se obter um eléctrodo cilíndrico ou biselada de modo a obter um eléctrodo em disco (de modo a criar um isolamento entre a fibra de carbono e o revestimento de vidro podemos ainda adicionar uma resina epoxi). De modo a melhorar a

sensibilidade e seletividade na detecção de determinados compostos e minimizar os fenômenos de "envenenamento" da superfície do microeletrodo podem ainda ser empregues diversos revestimentos externos, constituindo os designados microeletrodos de superfície quimicamente modificada. Entre os diversos materiais utilizados para este fim destacam-se o *Nafion*, a orto-fenilenodiamina e a nitrocelulose (KITA e WIGHTMAN, 2008). MCCARTHY *et al.* (2001) demonstraram ainda vantagens no uso de titânio em substituição da fibra de carbono como estrutura na construção do microssensor, o que ainda que não evite os problemas associadas às lesões de inserção do artefacto, melhora a rigidez da estrutura e prolonga o seu tempo útil de vida.

Consideráveis esforços têm sido dedicados, ao longo dos últimos anos, ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos que permitam a detecção de moléculas que não possuam propriedades eletroativas (DALE *et al.*, 2005). Foram desta forma criados os microbiossensores (Figura 2), que assentam no princípio da detecção à superfície do eletrodo de espécies eletroativas que se formem durante a oxidação por uma reação enzimática do analito em estudo: na maioria dos casos quantifica-se o  $H_2O_2$ , produto de reações enzimáticas de oxidases. Uma oxidase é uma enzima que cataliza uma reação de oxidação que envolve  $O_2$  como aceitador de eletrões, reduzindo-o a  $H_2O_2$  ou  $H_2O$ . Para conseguirem transformar os seus substratos as oxidases fazem uso de co-fatores, compostos orgânicos/inorgânicos que auxiliam na transferência de eletrões (e. g. vitaminas, ferro, magnésio ou zinco).

Destaque ainda para os biossensores que permitiram a quantificação dos níveis de glucose e lactato no cérebro (BÉLANGER *et al.*, 2011), funcionando como a base de partida para a construção de outros que vieram possibilitar a detecção de glutamato, acetilcolina, GABA e adenosina. Este biossensores são de uma forma geral acompanhados de equipamentos de detecção amperométrica, sendo por isso indispensável a seleção de membranas seletivas que minimizem a presença de compostos interferentes.

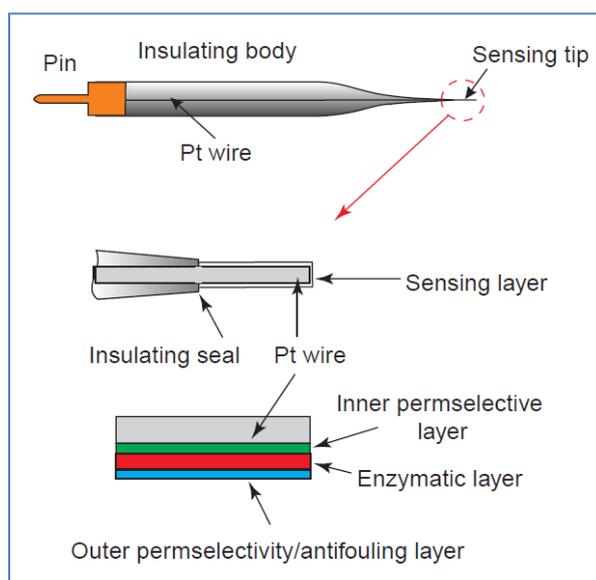


Fig. 2: Representação esquemática da estrutura de um microbiossensor (Copyright 2005 Elsevier).

Os microssensores têm vindo a desempenhar um papel importante nas neurociências e quando associados a técnicas eletroquímicas conseguem estabelecer um sistema que cumpre os pressupostos requeridos para a monitorização no espaço extracelular do cérebro: tamanho reduzido que nos oferece a possibilidade de efetuar a deteção de compostos ao nível do espaço extracelular, sem provocar alterações significativas no tecido cerebral; resolução temporal que permita acompanhar os eventos bioquímicos que ocorrem geralmente na ordem dos milissegundos a segundos; adequada seletividade que permita um elevado nível de validade nas medições, uma vez que existe uma miríade de substâncias quimicamente bastante semelhantes no espaço extracelular; elevada sensibilidade e baixo limite de deteção para alguns neurotransmissores (e.g. dopamina que se apresenta com concentrações muito baixas no espaço extracelular, inferior ao micromolar).

A escolha pela utilização de métodos eletroquímicos de deteção traduz-se em resultados interessantes graças à natureza eletroquímica das monoaminas (como as catecolaminas, onde se incluem a dopamina e a adrenalina, ou as indolaminas, como a serotonina ou a histamina), que podem assim ser estudadas quantitativamente em termos das suas flutuações de concentração. Existem atualmente duas técnicas de deteção ultrarrápida acoplada aos microelétrodos (MOQUIN *et al.*, 2011): a amperometria e a voltametria cíclica de varrimento rápido (FSCV).

Na amperometria é aplicado ao elétrodo um potencial superior (“mais positivo”) daquele que se sabe ser o potencial de pico para a oxidação do composto eletroativo, de modo que a corrente resultante seja proporcional à concentração do composto. A amperometria a potencial constante tem sofrido diversas atualizações no decorrer dos últimos tempos, sendo que já se conseguiu construir plataformas de microelétrodos com múltiplos sítios ativos (*micro-arrays*), que combinam os vários microelétrodos com o objetivo de obter uma “imagem” eletroquímica, o que permite no fundo o mapeamento em tempo real do ambiente cerebral (LIN *et al.*, 2012).

No entanto, o facto de esta técnica ser realizada a um potencial constante limita a sua seletividade, de modo que foi desenvolvida uma nova variante – a crono-amperometria. Nesta variante técnica aplica-se um impulso de potencial em formato de onda quadrada ao microelétrodo (dentro de limites definidos). Em cada momento em que o potencial é aplicado existe uma considerável corrente não-*Faradaica* ou capacitiva que decai exponencialmente (GRATTON *et al.*, 1988). Geralmente a corrente que constitui os últimos 80% deste passo é medida e é-lhe atribuída uma natureza *Faradaica*. Se for obtida uma

“fotografia” da variação entre os valores de natureza redutiva para os de natureza oxidativa esta irá selecionar seletivamente o composto em análise. Podemos ainda alcançar uma seletividade superior se, à superfície do eletrodo, aplicarmos exogenamente o analito em estudo, sendo que posteriormente iremos quantificar a sua remoção ou *clearance* do espaço extracelular.

A outra técnica eletroquímica utilizada é a FSCV: o eletrodo identifica uma substância com base na reação específica, que por sua vez se baseia no registo de um pico de oxidação/redução. Esta técnica apresenta uma boa seletividade, tendo sido empregue como a principal forma de deteção *in vivo* de dopamina no cérebro. No entanto, também a FSCV tem sofrido avanços recentes de modo a aumentar a sensibilidade, como por exemplo a modificação da superfície do eletrodo através da aplicação de nanotubos de carbono ou de polímeros catiónicos (ROSS *et al.*, 2012). Já se conseguiu igualmente produzir *micro-arrays* que permitem medições simultâneas através de múltiplos eletrodos ou mesmo a aquisição simultânea de sinais em diferentes localizações cerebrais, o que se traduz por exemplo na medição simultânea de dopamina e adrenalina em locais distintos (PARK *et al.*, 2011). A FSCV tem sido aplicada com sucesso em mamíferos de grandes dimensões, incluindo no ser humano. A tecnologia WINCS (do inglês *Wireless Instantaneous Neurotransmitter Concentration System*) permite já o processamento de sinais sem comprometer a mobilidade do animal em estudo, uma vez que tem a capacidade de transmissão remota para os sistemas analíticos (BLEDSOE *et al.*, 2009). Se por um lado este *upgrade* tem permitido um diagnóstico em tempo real dos níveis de dopamina em pacientes afetados pela doença de Parkinson, por outro lado tem oferecido a possibilidade de estimular o núcleo sub-talâmico cerebral de modo a controlar os tremores frequentemente evidenciados pelos doentes.

### **3.2. A MICRODIÁLISE**

A outra ferramenta analítica que se propõe como alternativa aos microssensores é a microdiálise. O termo “*diálise*” significa a separação de um conjunto restrito de moléculas recorrendo à sua difusão passiva através de uma membrana artificial semipermeável. Este modelo tem por principal objetivo a análise da fração recolhida (o dialisado) e, com base na sua constituição, concluir acerca da dinâmica comportamental, farmacológica e genética de um ser vivo (BORLAND *et al.*, 2005). Esta técnica, ainda que alcance resoluções espaciais e temporais mais limitadas (0,1mm<sup>3</sup> e 600s, respetivamente), possui características que se podem dizer complementares ao uso dos microssensores e das técnicas não-invasivas. Uma

vez que se baseia numa ferramenta de colheita de amostras pode deste modo ser associada a um variado conjunto de técnicas analíticas: HPLC associada a detetores eletroquímicos, detetores de fluorescência ou absorção no UV-Visível, cromatografia gasosa ou até mesmo ensaios imuno-enzimáticos (Figura 3) – o que irá permitir a deteção e quantificação de qualquer espécie de molécula (independentemente de esta ser de origem endógena, como os neurotransmissores, ou de origem exógena, como é o caso dos fármacos). Pode-se até mesmo afirmar que, em muitos dos casos, a microdiálise possui a distinta capacidade de deteção de múltiplos analitos presentes numa mesma amostra (não esquecendo porém que a definição dos limites de deteção e quantificação da técnica como um todo está dependente da sensibilidade da instrumentação analítica que lhe for acoplada). Importa ainda referir que, analisando o facto de a amostragem se realizar num processo contínuo ao longo do tempo, esta vai-nos fornecer tanto concentrações basais como nos dará ainda a oportunidade de traçar um perfil dinâmico que defina as alterações nas concentrações que ocorrem numa dada região do cérebro.

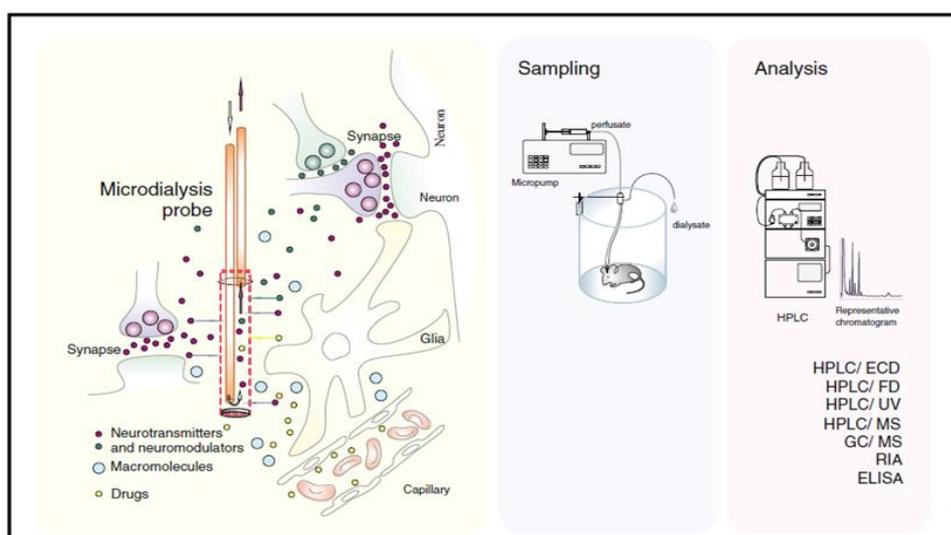


Fig. 3: Representação esquemática da técnica de microdiálise (ANDERZHANOVA *et al.*, 2013).

De modo a ser possível conduzir um ensaio *in vivo* recorrendo a esta técnica, devem ser seguidos os seguintes pressupostos (ZAPATA *et al.*, 2009):

- Seleção de uma sonda de amostragem com a respetiva cânula de auxílio à inserção: este processo estará sempre condicionado pela região cerebral que se pretende estudar, pela duração da experiência e pelo composto que se pretende monitorizar. Entre os fatores determinantes que devem ser previamente estudados estão o comprimento da membrana semipermeável, a composição e o

fluxo do fluido de perfusão e o tempo de estabilização necessário até se atingir o estado estacionário experimental.

- Implantação da sonda: uma inserção precisa e que forneça medições reprodutíveis é crucial para o sucesso da microdiálise (por vezes recorre-se a imagens histológicas para monitorizar o procedimento de inserção), bem como a manutenção de um ambiente estéril durante a cirurgia.
- Preparação do animal: os estudos podem ser conduzidos em animais anestesiados ou acordados. Quando se aplica uma sonda em animais anestesiados é dispensado o sistema de ancoragem ao animal e a análise pode ser iniciada assim que se demonstrar a libertação do neurotransmissor; no entanto, a anestesia e a temperatura corporal do animal podem afetar a libertação de vários neurotransmissores. Por outro lado, se o animal estiver acordado o tipo de anestesia deixa de ser um fator determinante e podemos monitorizar o seu comportamento, ainda que seja necessário aplicar um sistema de ancoragem que tanto proteja o animal e lhe dê liberdade de movimentos no interior da jaula bem como proteja a sonda de sofrer danos que inviabilizem o seu uso.

A seleção da sonda de microdiálise a utilizar é não só o primeiro passo de toda a técnica como também um dos mais importantes. A inserção desta estrutura no cérebro segue uma aplicação por estereotaxia (em que existe apenas a necessidade de proceder à abertura de um pequeno orifício no crânio para obter acesso interno). Presentemente, as sondas de microdiálise podem apresentar-se sob diversas geometrias: horizontal, *side-by-side*, concêntrica ou *U-shaped*, sendo as últimas duas as mais usadas em procedimentos de análise cerebral. Internamente são constituídas por dois microtubos (um externo e outro interno, que respetivamente recolhem o dialisado e por outro lado injetam a solução de perfusão), envolvidos por uma membrana semipermeável (BERT *et al.*, 2002). A membrana desempenha um papel fundamental em todo o processo: qualquer molécula de peso molecular inferior à sua porosidade vai difundir através da mesma de acordo com um gradiente de concentração, o qual é estabelecido através da perfusão do interior da membrana (regra geral com soluções que mimetizam a constituição do local da medição), o que por sua vez irá gerar uma corrente que levará as moléculas recolhidas até ao instrumento de análise. O fluxo constante através da sonda é responsável por este gradiente de concentração entre o espaço extracelular e o interior da membrana, o que significa que poderá existir difusão de componentes tanto na direção espaço extracelular – sonda (o que permitirá a análise dos

fluidos cerebrais) bem como na direção contrária, da sonda para o espaço extracelular (oferecendo a hipótese de distribuição localizada de fármacos).

É importante ressaltar o seguinte pormenor: sempre que se procede à inserção da sonda de microdiálise (ou mesmo de microssensores), esta irá recolher amostras do espaço extracelular, ou seja, do espaço existente entre as diversas células cerebrais, sendo este um compartimento usado como via de circulação para neurotransmissores, metabolitos e fármacos que fluem entre os neurónios, as células da glia e a corrente sanguínea (por esta razão a concentração de um neurocomposto reflete um balanço entre o número de moléculas que são libertadas e as que são removidas). Ferramentas como a modelação matemática demonstraram que num sistema de difusão multi-compartimental como é o espaço neuronal a concentração de uma substância ao nível da membrana da sonda depende apenas da sua libertação e recaptção ao nível dos neurónios e células da glia e não é afetada pela remoção através do processo de diálise (CHEFER *et al.*, 2009).

A eficiência de uma sonda de microdiálise (e do processo de monitorização como um todo) pode ser medida através da sua capacidade de recolha. Este *ratio* pode ser afetado por variáveis de diversa natureza: fluxo da solução de perfusão, resistência à difusão oferecida pela matriz da membrana de diálise, comprimento e diâmetro da sonda e ainda as características físico-químicas dos neurotransmissores. Torna-se importante diferenciar as duas formas que este *ratio* pode assumir: a recolha absoluta e a recolha relativa. A

primeira tem em conta a quantidade absoluta de matéria que é transferida durante um determinado período de tempo, expressa em moles/minuto. Já a recolha relativa, como a própria designação indica, refere-se à concentração de uma substância difundida e retida no interior da sonda em relação à concentração dessa mesma substância no espaço extracelular, expressa como uma percentagem (Figura 4). De referir que os valores de recolha absoluta e relativa se correlacionam respetivamente de forma positiva e negativa com o fluxo da solução de perfusão (JUSTICE, 1993). É plausível pensar-se que a

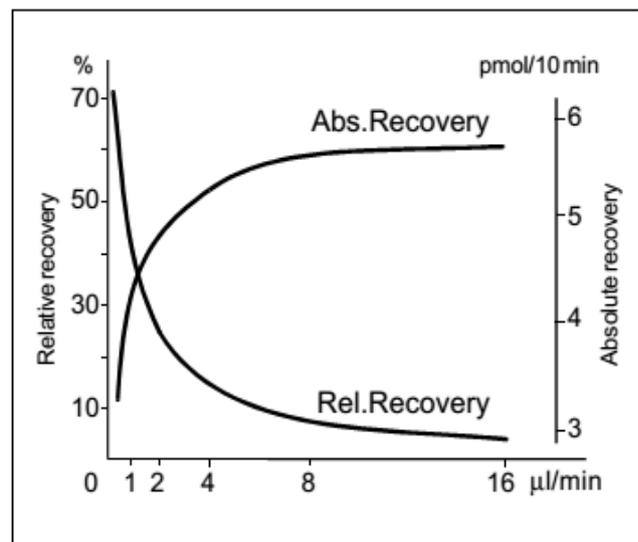


Fig. 4: Variação dos valores de recolha absoluta e relativa da Dopamina em função do fluxo da solução de perfusão (ELIASSON, 1991).

determinação *in vitro* destes parâmetros para um neurotransmissor iria permitir a extrapolação para o ambiente *in vivo*. No entanto a recolha *in vivo* nunca mostrou atingir os valores de referência da técnica *in vitro* correspondente nos vários estudos efetuados (ROBINSON *et al.*, 2008), pelo que se torna problemático inferir concentrações absolutas. Este facto não invalida no entanto que estudos *in vitro* não possam ser utilizados para, por exemplo, conduzir testes que definam as características ideais de uma sonda na deteção de um metabolito específico.

Um detalhe que não deve ser descurado é a escolha de um método de calibração adequado, de modo a minimizar problemas de níveis de recolha flutuantes e erróneos ao longo do processo. Um dos métodos mais usados é o método *in vivo no-net-flux*, em que a sonda de microdiálise é perfundida com uma solução contendo uma gama de concentrações na qual se espera que esteja englobada a concentração no meio extracelular do analito que se pretende estudar (CHEN, 2005). No caso da concentração do neurotransmissor ser superior na solução de perfusão em relação ao meio extracelular, este irá sofrer difusão no sentido de saída da sonda; no caso oposto, se a concentração for superior no meio extracelular, então o movimento de massa irá aumentar a presença do produto no dialisado recolhido. O balanço entre as perdas e ganhos é definido por uma função, sendo que o ponto de intercessão entre a abcissa e a função corresponde ao momento de transferência de massa nula, o chamado *no-net-flux* (podemos afirmar que neste ponto a concentração do metabolito será igual dentro e fora da sonda de amostragem). O dado talvez mais importante que pode ser inferido é-nos dado pelo declive da função, permitindo-nos estimar indiretamente os mecanismos de transporte de um neurotransmissor que afetam a sua concentração no espaço neuronal.

A técnica de amostragem por microdiálise tem vindo a ser utilizada ao longo dos últimos anos em vários ramos das neurociências. Para este reconhecido sucesso muito têm contribuído as vantagens que este processo apresenta perante outros similares (WESTERHOUT *et al.*, 2012):

1) Possibilidade de monitorizar alterações no conteúdo extracelular das substâncias em estudo em animais acordados e que têm a capacidade de se movimentarem livremente no espaço de amostragem, durante vários dias.

2) Capacidade de amostragem *in vivo* sem perturbar a homeostase cerebral: não existe remoção de moléculas de grandes dimensões, como proteínas ou enzimas; não se verificam perdas ou ganhos significativos de fluidos, já que a composição da solução de perfusão

mimetiza o fluido extracelular; a membrana semipermeável funciona como uma barreira a infecções de origem externa ao sistema e ao local de implantação; existem já disponíveis sondas de elevada qualidade no que toca à utilização de materiais biocompatíveis.

3) Resolução espacial e temporal eficiente permitindo efetuar leituras em regiões de dimensões reduzidas (e.g. núcleo *accumbens*) durante testes de comportamento do organismo em estudo.

4) A variedade de métodos analíticos que podem ser acoplados para a quantificação dos metabolitos recolhidos torna vasta a lista de analitos detetáveis, permitindo a quantificação simultânea de vários componentes numa mesma amostra.

5) Não existe a necessidade de purificação das amostras previamente à análise, nem nos deparamos com degradação enzimática das substâncias recolhidas nos dialisados. Estas são duas das razões que permitem o acoplamento direto do equipamento de microdiálise ao instrumento analítico, oferecendo a possibilidade de realizar análises *on-line*.

Existem no entanto também algumas desvantagens associadas a esta técnica (KENDRICK, 1989):

1) A implantação estereotáxica requer um procedimento cirúrgico cansativo para os animais, que geralmente necessitam de um período de recuperação de 5 a 7 dias.

2) A inserção da sonda resulta em alterações na zona que circunda o local de aplicação (hipervascularização, isquémia, inflamação, edema e por vezes hemorragias). Grande parte destas lesões desaparece ao fim de 12-24 horas, o que significa que as medições não devem ser iniciadas antes de decorridas 18-24 horas após a implantação da sonda.

3) Atendendo que as soluções de infusão são aquosas, a amostragem de moléculas lipofílicas torna-se problemática. Pela mesma razão, compostos de baixa polaridade sofrem também uma cinética de difusão mais lenta e portanto o sistema irá demorar mais tempo até atingir o equilíbrio.

Comparando a técnica de microdiálise com os microssensores uma vantagem significativa pode ser adiantada: a microdiálise não está limitada à análise de um conjunto reduzido de substâncias. Este fato explica-se por si próprio olhando ao fundamento da microdiálise: é um procedimento de recolção de compostos, de modo que qualquer técnica analítica pode ser acoplada para quantificar o analito de interesse.

O simples facto de inserir um artefacto na região cerebral irá resultar em danos no tecido envolvente, tanto no imediato (edema do local de inserção da sonda) bem como prolongados no tempo (inflamação, hipertrofia e proliferação celular – processo denominado por microangiopatia cerebral). Estudos iniciais demonstraram que, num espaço de tempo de 2h após a inserção da sonda de microdiálise, o fluxo sanguíneo e o metabolismo de glucose sofrem uma redução nas células circundantes ao local de inserção, mas que estes valores retomam a normalidade 24h após o início da medição. Este facto leva a que, de um modo indireto, a maioria dos dialisados recolhidos leve cerca de 1 a 2 horas a estabilizar no que toca à concentração em neurotransmissores. Estudos histológicos de tecidos analisados 1 a 3 dias após a implantação da sonda mostram células de aparência normal e neurónios em processo degenerativo (ZHOU *et al.*, 2002). Ainda que não exista informação detalhada acerca desta situação, pensa-se que o nível de dano tecidular pode estar associado à dimensão da sonda (SZAROWSKI *et al.*, 2003), ao material que a constitui e/ou à esterilidade da solução de perfusão (ROS *et al.*, 2001). Torna-se importante aprofundar estes estudos, tendo em conta a minimização do impacto fisiológico indesejado desta técnica e de forma a aumentar a *compliance* para no futuro permitir o desenvolvimento de estruturas de medição contínua (implantes crónicos). Apesar desta desvantagem, provou-se que a sonda mantém os neurónios funcionais (DEL ARCO *et al.*, 2003), já que os neurotransmissores recolhidos provaram ser sensíveis à tetrodotoxina (TTX) e dependentes dos canais de cálcio (com concentrações proporcionais à despolarização verificada) (WESTERINK *et al.*, 1988). Deve no entanto ser assinalado que a menor dimensão dos microssensores poderá conduzir a um menor grau de lesão nas regiões de implantação, o que diretamente irá implicar resultados distintos nas medições (para se ter uma ideia concreta, o “rasto” criado pela inserção de uma sonda de microdiálise é visível a olho nu num corte histológico da região em estudo, ao passo que um microelétrodo apenas cria um “rasto” visível com recurso à microscopia).

## 4. A APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 4.1. CATECOLAMINAS – DOPAMINA

O neurotransmissor dopamina, que pertence à família das catecolaminas, desempenha um papel crucial no funcionamento do cérebro dos seres vivos. Produzida nas glândulas suprarrenais e em diversas áreas do cérebro, é considerada a catecolamina com o papel mais preponderante na integração do funcionamento do SNC com os restantes sistemas de órgãos. Esta molécula tem origem numa reação de descarboxilação do composto L-DOPA e constitui-se como o precursor de outros dois importantes neurotransmissores – adrenalina e noradrenalina. Podemos considerar a dopamina como um potente neuromodulador, uma vez que possui a capacidade de alterar diversos aspetos das redes neuronais, da plasticidade cerebral e da organização e controlo das respostas ao *stress* (perceção dos sentidos da “satisfação” e “prazer”) bem como atuar em funções cognitivas como a aprendizagem e o armazenamento seletivo de memórias. A depleção deste neurotransmissor está implicada na origem de doenças neurológicas graves, como é o caso da esquizofrenia, doença de Parkinson ou Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (ADHD), sendo também objeto de estudo em indivíduos envolvidos em tratamentos para desintoxicação de drogas de abuso (JACKOWSKA e KRYSINSKI, 2013).

Diversos estudos têm sido publicados no que toca à deteção de dopamina. No entanto, a técnica que se tem mostrado mais avançada, com uma boa rapidez na obtenção das medições e adequado custo-efetividade é a deteção por sensores eletroquímicos. Este tipo de sensores pode ser dividido em dois grupos distintos: sensores químicos e biossensores. De acordo com a definição da IUPAC, “um biossensor é um dispositivo integrado capaz de fornecer informação quantitativa específica recorrendo ao uso de um elemento de reconhecimento (recetor bioquímico) quando em contacto espacial com um elemento transdutor eletroquímico” (THEVENOT *et al.*, 2001). Em contraste, os sensores químicos contêm elementos ativos de origem não-biológica, fazendo uso de eléctrodos modificados na base de materiais orgânicos/inorgânicos que possuem boas características no que se refere à condutividade ou às propriedades catalíticas.

Nos últimos anos diversos esforços têm sido concentrados para melhorar as propriedades catalíticas, a sensibilidade e a seletividade dos biossensores, seja pela aplicação de nanopartículas/nanotubos (PUMERA *et al.*, 2007) ou através do uso de materiais

inovadores (compósitos ou filmes de hidrogéis) que permitam a imobilização das enzimas à superfície dos eletrodos (XU *et al.*, 2006). A grande maioria dos biossensores testados para a monitorização da dopamina usam a enzima tirosinase, também designada por polifenol oxidase, como elemento de reconhecimento. Esta enzima é uma oxi-redutase multifuncional (com conteúdo rico em cobre) que desenvolve a sua atividade catalítica na presença de oxigénio de duas formas (SHLEEV *et al.*, 2005):

- 1) Hidroxilação de mono-fenóis a orto-difenóis através da enzima cresolase.
- 2) Oxidação dos di-fenóis a orto-quinonas através da enzima catecolase.

As quinonas resultantes podem sofrer posterior redução eletroquímica à superfície do eletrodo (sem necessidade de intervenção de qualquer mediador). Esta reação constitui a base da deteção amperométrica (a potenciais negativos) da dopamina. A utilização da tirosinase veio eliminar problemas resultantes de consecutivas oxidações da dopamina que iriam dar origem a grandes quantidades de aminocromo, bem como reduzir a interferência nas medições de compostos presentes nos sistemas biológicos, como o AU, o AA ou mesmo outras classes de neurotransmissores (MAJEWSKA *et al.*, 2006).

Refira-se que no presente o ponto crucial no desenvolvimento dos biossensores consiste na imobilização da enzima na superfície do eletrodo (que vai constituir o designado transdutor eletroquímico). Esta imobilização pode ser atingida através de dois métodos: aprisionamento da enzima no núcleo da matriz de revestimento ou à superfície dessa mesma matriz. A enzima é introduzida no núcleo da matriz quando se espera que a atividade enzimática resulte da sua mistura com os componentes da mesma (e. g. pasta de carbono); por outro lado, se a matriz é produzida através de técnicas *layer-by-layer* privilegia-se a adsorção da enzima através de ligações covalentes.

De modo a construir uma ideia real do quão importante se torna a definição da matriz de imobilização, apresentam-se aqui alguns resultados obtidos na monitorização *in vivo* de dopamina com recurso a biossensores:

- NJAGI *et al.* (2010), usando uma matriz de fibra carbono/quitosano/TiO<sub>2</sub>/CeO<sub>2</sub> alcançou um limite de deteção de  $1,1 \times 10^{-9}$  mol/L, ainda que tenha sofrido com interferências de AA, UA, L-DOPA e DOPAC.
- WANG *et al.* (2010), fazendo uso de uma matriz de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/quitosano e da incorporação de tirosinase tanto no núcleo como nas camadas externas da matriz,

atingiu limites de detecção de  $6 \times 10^{-9}$  mol/L mas apenas com as interferências de AA.

- VEDRINE *et al.* (2003) e TEMBE *et al.* (2006) ainda que tenham apenas alcançado um limite de detecção na ordem dos  $1-9 \times 10^{-7}$  mol/L, utilizaram matrizes de poliofenol em gel de biocompósitos de agar-agar e goma de Guam e conseguiram eliminar o efeito dos interferentes nas medições.

Recentemente têm também vindo a ser obtidos resultados interessantes devido à utilização de nanomateriais (DALE *et al.*, 2005; JACKOSWKA *et al.*, 2013; ROSS e VENTON, 2010).

No que se refere ainda ao caso particular da dopamina, foi feita a construção de microelétrodos portadores de elementos de *multiple sensing* (DRESSMAN *et al.*, 2002). Estes sensores incorporam estes elementos em distâncias da ordem dos 10-15  $\mu\text{M}$  e permitiram a monitorização de neurotransmissores a diferentes profundidades na região cerebral. Foi demonstrada a heterogeneidade espacial das concentrações extracelulares de dopamina, ao nível da resolução espacial dos micrómetros, que veio também confirmar a capacidade do transportador desta catecolamina em restringir a difusão da mesma no espaço extracelular (PETERS e MICHAEL, 2000).

No que toca à detecção de catecolaminas com recurso à técnica de microdiálise, 3 diferentes procedimentos foram desenvolvidos nos últimos tempos: a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa mostrou resultados com seletividade e limite de detecção adequados (KOSLOW *et al.*, 1971). No entanto, o seu uso tornou-se limitado e algo obsoleto devido a ser um método oneroso e à necessidade de derivatizar os compostos. Uma segunda técnica foi então implementada, através do uso da enzima COMT e de marcação radioativa, de modo a aumentar a seletividade na detecção das aminas primárias. Esta técnica mostrou melhorias nos limites de detecção comparativamente aos antigos métodos de fluorescência; no entanto acarretou consigo também problemas de segurança (contaminação ambiental) e não se mostrou acessível nos custos de utilização em rotina diária. O método mais utilizado atualmente é a HPLC acoplada a detetores eletroquímicos (KISSINGER *et al.*, 1977). Se por um lado oferece um limite de detecção mais baixo comparativamente às outras técnicas (Figuras 5 e 6), várias considerações não devem ser postas de parte, como por exemplo a presença de ruído nos cromatogramas, a composição da fase móvel (valores de  $pK_a$  dos componentes e efeito da presença de agentes de troca

iónica) e a temperatura do sistema, fatores que devem ser rigorosamente controlados durante todo o processo.

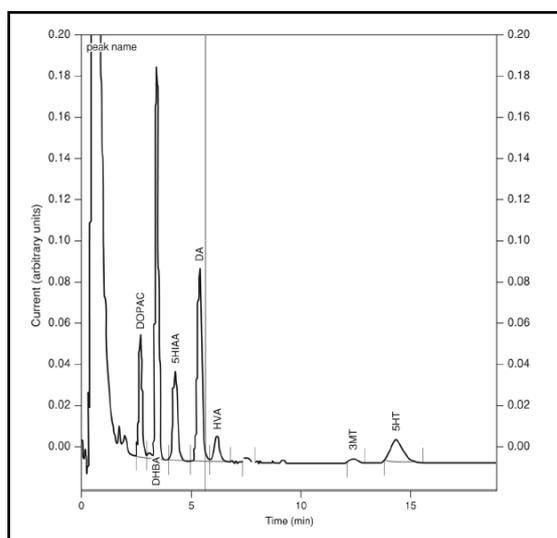


Fig. 5: Cromatograma representativo da separação de catecolaminas e respectivos metabolitos no estriado de rato (ZAPATA *et al.*, 2009).

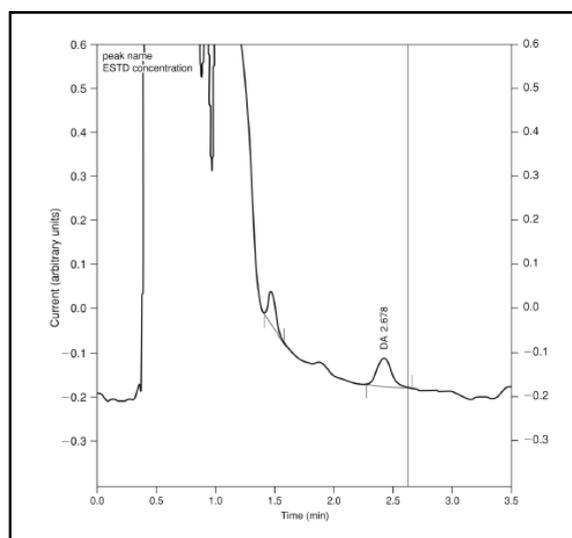


Fig. 6: Cromatograma da separação de dopamina, com origem no núcleo *accumbens* de rato e concentração 2,678nM (ZAPATA *et al.*, 2009).

Torna-se importante referir as conclusões obtidas por BORLAND *et al.* (2005), em que foram inseridos em simultâneo uma sonda de microdialise e microsensores: o aumento nas concentrações de dopamina como resposta a estímulos elétricos foi detetado nos sensores implantados a uma maior distância das sondas, mas tal não se verificou naqueles que estavam na vizinhança das sondas de microdialise; por outro lado, sempre que o estímulo proveio da presença de inibidores da recaptção da dopamina as variações nas concentrações foram detetáveis em todos os eléctrodos, independentemente da distância dos mesmos às sondas de microdialise. Foi possível deste modo inferir que a lesão neuronal imposta pelas sondas de microdialise levou à diminuição drástica da libertação de dopamina dependente de despolarização eléctrica, ao limitar a fisiologia regular das células neuronais – um dialisado de dopamina tem origem apenas nos terminais que sobreviveram às lesões da implantação da sonda e portanto ainda são capazes de realizar as suas funções normais de transporte; torna-se evidente que os *ratios* de recolha de dopamina vêm afetados pela cinética alterada deste neurotransmissor no espaço extracelular.

O contraste entre as lesões pode dar-nos uma explicação plausível para as diferentes concentrações *in vivo* de dopamina alcançadas pela microdiálise vs. microssensores. De acordo com vários estudos (BORLAND *et al.*, 2005; KULAGINA *et al.*, 2001, QIAN *et al.*, 1999), fica a ideia que os microelétrodos, pelo facto de provocarem menores disrupções aquando da sua inserção, conseguem alcançar os terminais de dopamina e estabelecer um contacto mais próximo em relação às sondas de microdiálise. A importância desta menor distância alcançada assenta em dois pressupostos: por um lado, assim que as moléculas de dopamina são libertadas no espaço extracelular, o espaço nas quais elas se podem movimentar é altamente reduzido graças a um ativo processo de recaptção. Por outro lado, se cada terminal de dopamina for considerado como uma pequena fonte de libertação de dopamina, então a concentração do neurotransmissor sofre uma diluição proporcional à medida que nos afastamos desse mesmo terminal e mergulhamos no tortuoso espaço extracelular. Estes dois efeitos contribuem de certa maneira para criar a chamada “esfera de difusão” em redor de cada terminal deste neurotransmissor (JAQUINS-GERSTL *et al.*, 2009). Posicionando o elétrodo o mais próximo possível do terminal para que este atinja esta esfera é uma das grandes premissas dos microssensores, tentando evitar posições em que os efeitos de recaptção e diluição se fazem já sentir. Podemos então afirmar que é a capacidade dos microssensores em penetrar na esfera de difusão da dopamina que explica as concentrações mais elevadas monitorizadas num mesmo organismo e nas mesmas condições experimentais em relação às concentrações atingidas pelas sondas de microdiálise.

## **4.2. AMINOÁCIDOS – GABA E GLUTAMATO**

De um conjunto alargado de aminoácidos conhecidos, o GABA e o glutamato são os principais neurotransmissores inibitórios e excitatórios, respetivamente, que se encontram presentes no SNC (ZEYDEN *et al.*, 2008). Ambos os compostos desempenham não só um importante papel na fisiologia cerebral, como também na definição de diversos conceitos fisiopatológicos como a depressão, esquizofrenia e epilepsia. Para além disso, encontram-se envolvidos diretamente no mecanismo de ação de vários fármacos no cérebro.

O aminoácido glutamato, desde a sua classificação como neurotransmissor em 1970, tem visto serem-lhe descobertas diversas funções no cérebro: intermediário no metabolismo celular; aminoácido importante na síntese de proteínas e péptidos, como a glutatona; envolvido na formação de ácidos gordos, é ainda um precursor do aminoácido GABA. Elevadas concentrações no fluido extracelular, causadas por excessiva libertação de

glutamato, são frequentemente associadas com disfunções neuronais e consequentes patologias neurodegenerativas e psicóticas: Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Esclerose amiotrófica lateral ou Doença de Huntington, bem como esquizofrenia e Transtorno Bipolar de Humor (DANBOLT, 2001).

Por sua vez, o GABA resulta da alfa-descarboxilação do ácido L-glutâmico e é atualmente o neurotransmissor inibitório mais estudado no SNC dos mamíferos. Distribuído heterogeneamente por toda a região cerebral, é responsável pela regulação de diversos processos neuronais (RAITERI *et al.*, 2002). Tem a capacidade de ativar os canais de cloreto ligados aos recetores GABA<sub>A</sub>, bem como de despoletar respostas metabotrópicas nos recetores GABA<sub>B</sub> mediados por proteínas-G. Os recetores GABA<sub>A</sub> desempenham também um importante papel no que toca a aplicações terapêuticas, constituindo alvos de fármacos como benzodiazepinas, barbitúricos e anestésicos.

A microdiálise é de momento a técnica mais reprodutível e fiável de quantificação de GABA no espaço extracelular cerebral. As amostras de dialisado são primariamente derivatizadas através do uso de reagentes fluorogénicos como o OPA, fluoresceína ou 2,3-naftaleno dicarboxaldeído e posteriormente analisadas com recurso a um sistema de HPLC acoplado a um detetor de fluorescência (REA *et al.*, 2005). Mesmo após a publicação de diversos estudos que localizam as concentrações basais detetadas pela microdiálise num intervalo de 1,6 a 300 fmol/μl de amostra (colhida em diversas zonas, como o hipocampo, o núcleo estriado e o córtex pré-frontal), como resultado de uma limitada resposta do GABA à TTX, à remoção de cálcio e à introdução de agentes farmacológicos seletivos como o baclofeno, diversos investigadores têm questionado a origem neuronal dos dialisados recolhidos. Deste modo tem sido sugerido que os níveis de GABA medidos pela microdiálise derivam de uma forma não-tradicional de transmissão como o *reverse-uptake* mediado por proteínas transportadoras (BERNATH e ZIGMOND, 1988) ou por fontes não-neuronais (citoplasmáticas) como as células da glia (TIMMERMAN e WESTERINK, 1997). Estas considerações explicam o porquê das sondas de microdiálise apenas conseguirem detetar indiretamente a libertação sináptica de GABA, uma vez que as células da glia atuam como um tampão de equilíbrio das concentrações deste neurotransmissor no espaço extracelular (este fato é também a razão pela qual uma alteração induzida no ambiente cerebral pode significar um *delay* nos níveis de GABA nos dialisados recolhidos, uma vez que as células da glia estão a reequilibrar as concentrações através de transferências de massa do neurotransmissor).

Se o objetivo passa pela monitorização das concentrações de glutamato no espaço extracelular cerebral de animais acordados, a técnica de microdiálise é em tudo semelhante à usada na determinação do GABA. O glutamato presente nos dialisados é primariamente derivatizado com recurso aos mesmos reagentes fluorogénicos e subsequentemente analisado por HPLC com deteção eletroquímica ou por fluorescência. Estudos quantitativos têm demonstrado concentrações deste neurotransmissor num intervalo de 1-5  $\mu\text{M}$  (ZHANG *et al.*, 2004). Uma vez que os transportadores de glutamato não estão distribuídos de forma uniforme ao longo das diversas membranas gliais, é expectável uma concentração heterogénea do composto nos diversos pontos do espaço extracelular. Para além deste facto, a evidência de que os astrócitos desempenham um papel ativo na libertação de glutamato tem explicado o porquê de em certas localizações a libertação deste neurotransmissor dominar sobre a sua recaptação. É também um pressuposto que os valores basais de glutamato nas amostras recolhidas pela microdiálise não se alteram na presença de TTX ou por remoção de cálcio extracelular, o que aliado à dificuldade em detetar glutamato de origem sináptica (o *spill-over* das moléculas libertadas é limitado mesmo observando que a fenda sináptica se encontra na continuidade do espaço extra-sináptico – a elevada atividade dos transportadores específicos pode explicar este mecanismo) resulta num pico médio de concentrações detetáveis de apenas 1  $\mu\text{M}$ , decrescendo de forma constante a cada milissegundo (porque o glutamato irá apenas difundir para parte do domínio de amostragem da sonda de microdiálise).

Compreende-se deste modo que a monitorização por microdiálise apenas nos fornece informação limitada acerca dos acontecimentos sinápticos que envolvem o glutamato. Por conseguinte, foram desenvolvidos microbiossensores que representam uma alternativa promissora, já que o seu funcionamento mostrou possuir um tempo de resposta otimizado (na ordem dos segundos vs. minutos na microdiálise). Deste modo, os microssensores com base em fibra de carbono (diâmetros entre 7-30  $\mu\text{m}$ ) têm sido implementados com sucesso no estudo de neurotransmissores (STUBER *et al.*, 2005). Infelizmente o glutamato não é passível de ser determinado diretamente por este método, uma vez que não apresenta uma natureza eletroquímica ativa. No entanto este obstáculo já foi ultrapassado, ao adicionar enzimas específicas (glutamato oxidase, GluOx) ao sensor, resultando na conversão do glutamato em  $\text{H}_2\text{O}_2$  que é posteriormente detetado por amperometria a +0,7 V vs. Ag/AgCl.

Uma segunda geração de microssensores foi desenvolvida por KULAGINA *et al.* (1999), baseada no revestimento da superfície do sensor com um hidrogel capaz de detetar glutamato de forma sensível a TTX; o revestimento continha L-glutamato oxidase,

peroxidase de rábano e ascorbato oxidase interligadas através de um éter di-glicil de polietilenoglicol, que por sua vez é incorporado num polímero *redox* contendo ósmio revestido a *Nafion*. A deteção passa assim a ocorrer numa rede tridimensional, o que aumenta a sensibilidade do método. No entanto problemas relacionados com interferências de compostos estranhos presentes no espaço extracelular, que irão sofrer oxidação no lugar do glutamato, ainda são uma realidade (o que leva a uma sobrestimação das reais concentrações do neurotransmissor), mas que tem vindo a ser parcialmente ultrapassada com estudos sobre o uso concomitante de microsensores “nulos” (sem enzima) próximos aos locais de inserção dos sensores de medição do glutamato. Deste modo, RUTHERFORD *et al.* (2007) conseguiram detetar concentrações deste neurotransmissor *in vivo* de cerca de  $18,2 \pm 9,3 \mu\text{M}$ .

### **4.3. PRODUTOS METABÓLICOS - GLUCOSE E LACTATO**

A glucose é uma das principais fontes de energia do nosso organismo, sendo que cerca de 25% do consumo deste composto em todo o organismo resulta da atividade cerebral. Ao longo dos anos esta foi mesmo considerada a única fonte de energia usada pelo cérebro e, em particular, a única forma de energia que garantia a manutenção da atividade neuronal. No entanto, estudos recentes vieram demonstrar que os neurónios não utilizam apenas a glucose e que podem fazer uso preferencial de lactato (PELLERIN, 2010). Estas conclusões vêm suportar a ideia de que são as células da glia que usam maioritariamente a glucose. De facto, um dos principais processos com elevado consumo energético é o transporte e a biossíntese de neurotransmissores, em especial o glutamato. Este neurotransmissor em particular é constantemente removido do fluido extracelular pelos astrócitos, que transformam a glucose em lactato de forma a obterem a energia necessária às suas funções. Serão posteriormente os neurónios a aproveitar este lactato remanescente como fonte de energia. GJEDDE *et al.* (2002) conseguiram demonstrar que pelo menos 75% do metabolismo oxidativo dos neurónios é suportado pelo consumo de lactato.

Obter uma melhor perceção acerca do metabolismo energético do cérebro e das regulações específicas que ocorrem em função das diferentes condições fisiológicas ou patológicas torna-se imperativo. De facto, diversas patologias neurodegenerativas exibem alterações metabólicas primariamente aos primeiros sintomas clínicos (como é o caso da doença de Alzheimer), o que nos oferece a oportunidade de, detetando estas alterações em

primeiro lugar, proceder a um diagnóstico precoce mais preciso e iniciar um tratamento em fases iniciais da doença (VASYLIEVA, 2012).

A monitorização de glucose e lactato através da microdiálise é distinta do método usado para outros compostos, já que a técnica mais adequada provou ser a análise *on-line* sem armazenamento de amostras: através de um processo contínuo, o dialisado atravessa assim um “filtro reativo” (Figura 7), que não é mais do que uma matriz com enzimas reativas aprisionadas (em que a peroxidase mediada pelo ferroceno mostrou ser a melhor combinação no que se refere à estabilidade, intervalo dinâmico e sensibilidade, segundo o trabalho de OBRENOVITCH e ZILKHA, 2001), sendo posteriormente avaliadas as variações de corrente com recurso a potenciostatos.

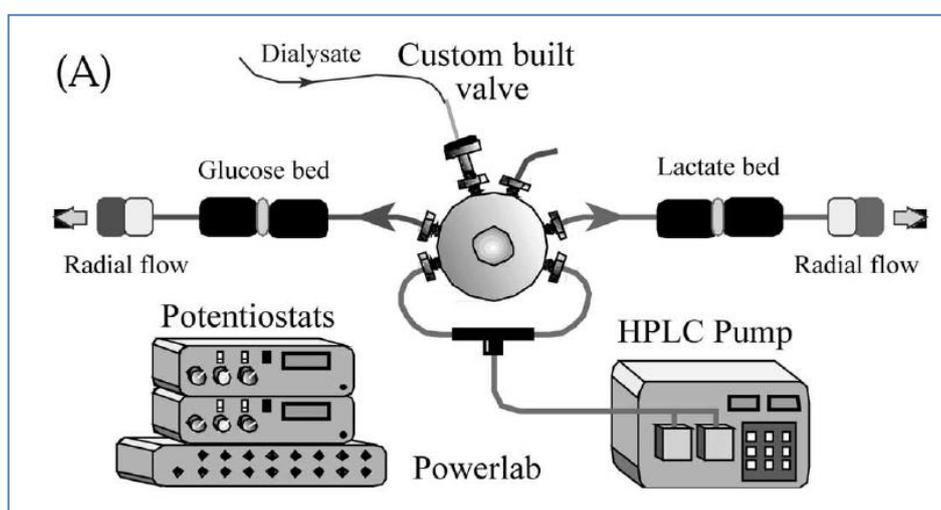


Fig. 7: Esquematização do modelo de trabalho de microdiálise *on-line* para a detecção de glucose e/ou lactato (PARKIN *et al.*, 2003).

No que se refere aos microelétrodos, estes requerem invariavelmente o uso de enzimas como elementos seletivos de um biossensor. De acordo com o trabalho de CESPUGLIO *et al.* (2013), biossensores de glucose podem ser preparados através da imobilização da enzima glucose oxidase em microelétrodos de fibra de carbono, usando mecanismos de *cross-linking* com glutaraldeído vaporizado ou através da incorporação da enzima em filmes de m-fenilenodiamina ou resorcinol. Esta camada enzimática reativa foi depois recoberta com uma membrana à base de *Nafion* ou acetato de celulose. Fazendo uso de uma técnica eletroquímica de impulso diferencial e de polissonografia foram traçadas curvas de calibração que demonstraram uma resposta linear do sensor no intervalo 0,3 a 6,5 mM (nos ratos utilizados na experiência, a concentração no fluido cérebroespinal fixou-se em média nos  $0,59 \pm 0,3$  mM). No que se refere ao biossensor de lactato, este foi preparado através do

revestimento de microelétrodos de fibra de carbono com a enzima lactato oxidase. Utilizando a mesma técnica analítica de detecção dos sensores de glucose, foi conseguida uma resposta linear na gama 0,1 a 2 mM, com uma concentração média de lactato do espaço extracelular de  $0,41 \pm 0,02$  mM. Este estudo fez também uso simultâneo da técnica referida anteriormente (microdiálise *on-line*) e, ainda que não refira os valores das suas medições, concluiu que, em resposta a estímulos externos (por exemplo, alterações nos ritmos circadianos de cobaias), os biossensores mostraram uma resposta mais rápida a estas alterações, ainda que sem diferenças significativas nas concentrações médias aferidas entre as duas técnicas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A monitorização *in vivo* da libertação e recaptção de substâncias neuroquímicas do espaço extracelular tem-se mostrado uma opção atrativa no que se refere ao estudo das funções cerebrais. Ao contrário das técnicas não-invasivas, envolve a implantação de sensores ou sondas de amostragem diretamente no tecido cerebral. No entanto, tem a capacidade de oferecer especificidade química e elevada resolução temporal e espacial. Ainda que largamente aceites como ferramentas analíticas importantes no estudo da atividade neuronal, os microssores merecem um estudo continuado ao nível da sua robustez como técnica analítica. Basta por exemplo considerar que, durante a atividade catalítica das enzimas, alterações de pH na vizinhança do eletrodo vão afetar a resposta do sensor, conduzindo a leituras erradas e equívocos na interpretação dos eventos biológicos. Por outro lado, a microdiálise ainda é afetada pela relação entre as concentrações nos dialisados e as concentrações no espaço extracelular. Fatores críticos como o dano tecidual nas zonas circundantes à sonda não devem ser desprezados. Se as diferenças entre as concentrações determinadas não assumem grande discrepância na detecção de metabolitos energéticos, como a glucose ou o lactato, as diferenças acentuam-se no caso dos neurotransmissores, como é o caso do glutamato. Pode concluir-se assim que ambas as técnicas ainda têm espaço para melhoramentos e otimização e serão sempre mais eficazes quando utilizadas complementarmente ou em associação com outras técnicas.

## 6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDERZHANOVA, E., WOTJAK, C. T. – Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry, *Cell Tissue Research* (2013) 354:27-39.

ANDRUS, L. P., UNRUH, R., WISNIEWSKI, N. A., MCSHANE, M. J. – Characterization of Lactate Sensors based on Lactate Oxidase and Palladium Benzoporphyrin Immobilized in Hydrogels, *Biosensors* (2015) 5:398-416.

BÉLANGER, M., ALLAMAN, I., MAGISTRETTI, P. J. – Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation, *Cell Metabolism* (2011) 14.

BERNATH, S., ZIGMOND, M. J. – Dopamine may influence striatal GABA release via three separate mechanisms, *Brain Research* (1988) 476:373-6.

BERT, L., PARROT, S., ROBERT, F., DESVIGNES, C., DENOROY, L., SUAUD-CHAGNY, M. F., RENAUD, B. – In vivo temporal sequence of rat striatal glutamate, aspartate and dopamine efflux during apomorphine, nomifensine, NMDA and PDC in situ administration, *Neuropharmacology* (2002) 43, 825-835.

BLEDSE, J. M., KIMBLE, C. J., COVEY, D. P., BLAHA, C. D., AGNESI, F., MOHSENI, P., *et al.* – Development of the Wireless Instantaneous Neurotransmitter Concentration System for intraoperative neurochemical monitoring using fast-scan cyclic voltammetry, *Journal of Neurosurgery* (2009) 111:712-723.

BORLAND, L. M., MICHAEL A. C., SHI, G., YANG, H. – Voltammetric study of extracellular dopamine near microdialysis probes acutely implanted in the striatum of the anesthetized rat, *Journal Neurochemistry Methods* (2005) 146, 149-158.

BUZSÁKI, G. – Rhythms of the brain, 1<sup>st</sup> Ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN-13 978-0-19-530106-9.

CARPENTER, K. L. H., JALLOH, I., HUTCHINSON, P. J. – Glycolysis and the significance of lactate in traumatic brain injury, *Frontiers of Neuroscience* (2015) 9:112.

CESPUGLIO, R., NETCHIPOROUK, L., SHRAM, N. – Glucose and Lactate Monitoring Across the Rat Sleep-Wake Cycle, *Microelectrode Biosensors, Neuromethods* (2013) vol. 80 chapter 11.

CHEFER, V. I., THOMPSON, A. C., ZAPATA, A., SHIPPENBERG, T. S. – Overview of brain microdialysis, *Current Protocols of Neuroscience* (2009) chapter 7:unit 7.1.

CHEN, K. C. – Evidence on extracellular dopamine level in rat striatum: implications for the validity of quantitative microdialysis, *Journal of Neurochemistry* (2005) 92:46-58.

- CHENG, G. W., HSU, K. C., LEE, C. F., WU, H. L., HUANG, Y. L. – On-line Microdialysis couples with Liquid Chromatography for Biomedical Analysis, *Journal of Chromatographic Science* (2009) Vol. 47.
- DALE, N., HATZ, S., TIAN, F., LLAUDET, E. – Listening to the brain: microelectrode biosensors for neurochemicals, *Trends in Biotechnology* (2005) Vol.23 No.8.
- DANBOLT, N. C. – Glutamate uptake, *Progress in Neurobiology* (2001) 65:1-105.
- DEL ARCO, A., SEGOVIA, G., FUXE, K., MORA, F. – Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions?, *Journal of Neurochemistry* (2003) 85, 23-33.
- DRESSMAN, S., PETERS, J. L., MICHAEL, A. C. – Carbon fiber microelectrodes with multiples sensing elements for in vivo voltammetry, *Journal of Neuroscience Methods* (2002) 119:75-81.
- ELIASSON, A. – Microdialysis - principles of recovery, *Application note CMA/Microdialysis AB* (1991).
- GJEDDE, A., MARRETT, S., VAFAEE, M. – Oxidative and non-oxidative metabolism of excited neurons and astrocytes, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (2002) 22, 1-14.
- GRATTON, A., HOFFER, B. J., GERHARDT, G. A. – Effects of Electrical Stimulation of brain reward sites on release of dopamine in rat: an *in vivo* electrochemical study, *Brain Research Bulletin* (1988) 21:319-324.
- HEIEN, M., JOHNSON, M. A., WIGHTMAN, R. M. – Resolving Neurotransmitters Detected by Fast-Scan Cyclic Voltammetry, *Analytical Chemistry* (2004) 76, 5697-5704.
- JACKOWSKA, K., KRYSINSKI, P. – New trends in the electrochemical sensing of dopamine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2013) 405:3753-3771.
- JAQUINS-GERSTL, A., MICHAEL, A. C. – Comparison of the brain penetration injury associated with microdialysis and voltammetry, *Journal of Neuroscience Methods* (2009) 183:127-135.
- JIN, G., CHENG, Q., FENG, J., LI, F. – On-line Microdialysis coupled to Analytical Systems, *Journal of Chromatographic Science* (2008) Vol. 46.
- JUSTICE, J. B. Jr. – Quantitative microdialysis of neurotransmitters, *Journal of Neuroscience Methods* (1993) 48:263-276.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. – *Principles of Neural Science*, 4<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, New York, 2000.
- KENDRICK, K. M. – Use of microdialysis in neuroendocrinology, *Methods in Enzymology* (1989) 168:182-205.

- KISSINGER, P. T., BRUNTLETT, C. S., DAVIS, G. L., FELICE, L. J., RIGGIN, R. M., SHOUP, R. E. – Recent developments in the clinical assessment of the metabolism of aromatics by high-performance, reversed-phase chromatography with amperometric detection, *Clinical Chemistry* (1977) 23:1449-1455.
- KITA, J. M., WIGHTMAN, R. M. – Microelectrodes for studying neurobiology, *Current Opinion in Chemical Biology* (2008) 12:491-496.
- KOSLOW, S. H., RACAGNI, G., COSTA, E. – Mass fragmentographic measurement of norepinephrine, dopamine, serotonin and acetylcholine in seven discrete nuclei of rat diencephalon, *Neuropharmacology* (1971) 13:1123-1130.
- KULAGINA, N. V., SHANKAR, L., MICHAEL, A. C. – Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microensors, *Analytical Chemistry* (1999) 71:5093-100.
- KULAGINA, N. V., ZIGMOND M. J., MICHAEL, A. C. – Glutamate regulates the spontaneous and evoked release of dopamine in the rat striatum, *Neuroscience* (2001) 102:121-8.
- LAMA, R., CHARLSON, K., ANANTHARAM, A., HASHEMI, P. – Ultrafast Detection and Quantification of Brain Signaling Molecules with Carbon Fiber Microelectrodes, *ACS Publications* (2012) 8096-8101.
- LIN, Y., TROUILLON, R., SVENSSON, M. L., KEIGHRON, J. D., CANS, A. S., EWING, A. G. – Carbon-Ring Microelectrode Arrays for Electrochemical Imaging of Single Cell Exocytosis: Fabrication and Characterization, *Analytical Chemistry* (2012) 84:2949-2954.
- MAJEWSKA, U. E., CHMURSKI, K., BIESAGE, K., OLSZYNA, A. R., BILEWICZ, R. – Dopamine oxidation at per(6-deoxy-6-thio)- $\alpha$ -cyclodextrin monolayer modified gold electrodes, *Electroanalysis* (2006) 18:1463-1470.
- MALDONADO, S., MORIN, S., STEVENSON, K. J. – Electrochemical oxidation of catecholamines and catechols at carbon nanotube electrodes, *The Analyst* (2006) 131, 262-267.
- MCCARTHY, P. T., OTTO, K. J., MASARU, P. R. – Robust penetrating microelectrodes for neural interfaces realized by titanium micromachining, *Biomedical Microdevices* (2011) 13:503-515.
- MOQUIN, K. F., MICHAEL, A. C. – An inverse correlation between the apparent rate of dopamine clearance and tonic autoinhibition in subdomains of the rat striatum: a possible role of transporter-mediated dopamine efflux, *Journal of Neurochemistry* (2011) 117:133-142.
- NJAGI, J., CHERNOV, M. M., LEITER, J. C., ANDREESCU, S. – Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor, *Analytical Chemistry* (2010) 82:989-996.

- OBRENOVITCH, T. P., ZILKHA, E. – Microdialysis coupled to online enzymatic assays, *Methods* (2001) 23(1):63-71.
- PARK, J., TAKMAKOV, P., WIGHTMAN, R. M. – *In vivo* comparison of norepinephrine and dopamine release in rat brain by simultaneous measurements with fast-scan cyclic voltammetry, *Journal of Neurochemistry* (2011) 119:932-944.
- PARKIN, M. C., HOPWOOD, S. E., STRONG, A. J., BOUTELLE, M. G. – Resolving dynamic changes in brain metabolism using biosensors and on-line microdialysis, *Trends in Analytical Chemistry* (2003) Vol. 22, No. 9.
- PELLERIN, L. (2010) Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity, *Diabetes & metabolism* (2010) 36 Supplement 3:S59-63.
- PETERS, J. L., MICHAEL, A. C. – Changes in the kinetics of dopamine release and uptake have differential effects on the spatial heterogeneity of extracellular dopamine concentration in rat striatum, *Journal of Neurochemistry* (2000) 74:1563-73.
- PIERRE, K., PELLERIN, L. – Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function, *Journal of Neurochemistry* (2005) 94, 1-14.
- PUMERA, M., SANCHEZ, S., ICHINOSE, I., TANG, J. – Electrochemical nanobiosensors, *Sens Actuators B* (2007) 123:1195.
- QIAN, J. WU, Y., YANG, H., MICHAEL, A. C. – An integrated decoupler for capillary electrophoresis with electrochemical detection: application to analysis of brain microdialysate, *Analytical Chemistry* (1999) 71:4486-92.
- RAITERI, L., RAITERI, M., BONANNO, G. – Coexistence and function of different neurotransmitter transporters in the plasma membrane of CNS neurons, *Progress in Neurobiology* (2002) 68:287-309.
- REA, K., CREMERS, T. I. F. H., WESTERINK, B. H. C. – HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis, *Journal of Neurochemistry* (2005) 94:672-9.
- ROBINSON, D. L., HERMANS, A., SEIPEL, A. T., WIGHTMAN, R. M. – Monitoring rapid chemical communication in the brain, *Chemical Reviews* (2008) 108:2554-2584.
- ROS, J., PECINSKA, N., ALESSANDRI, B., LANDOLT, H., FILLENZ, M. – Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex, *Journal of Neuroscience Research* (2001) 66: 790-794.
- ROSS, A. E., VENTON, B. J. – Nafion-CNT Coated Carbon-Fiber Microelectrodes for Enhanced Detection of Adenosine, *ACS Chemical Neuroscience* (2010) 3045-3051.
- RUTHERFORD, E. C., POMERLEAU, F., HUETTL, P., STROMBERG, I., GERHARDT, G. A. – Chronic second-by-second measures of L-glutamate in the central nervous system of freely moving rats, *Journal of Neurochemistry* (2007) 102:712-22.

- SHLEEV, S. S., TKAC, J., CHRISTENSON, A., RUZGAS, T., YAROLOV, A. L., STUBER, G. D., ROITMAN, M. F., PHILLIPS, P. E., CARELLI, R. M., WIGHTMAN, R. M. – Rapid dopamine signaling in the nucleus accumbens during contingent and noncontingent cocaine administration, *Neuropsychopharmacology* (2005) 30:853-63.
- SZAROWSKI, D. H., ANDERSEN, M. D., RETTERER, S., SPENCE, A. J., ISAACSON, M., CRAIGHEAD, H. G., TURNER, J. N., SHAIN, W. – Brain responses to micro-machined silicon devices, *Brain Research* (2003) 983, 23-35.
- TEMBE, S., KARVE, M., INAMDAR, S., HARAM, S., MELO, J., SOUZA, S. F. – Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film, *Analytical Biochemistry* (2006) 349:72-77.
- THEVENOT, D. T., TOTH, K., DURST R. A., WILSON, G. S. – Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics* (2001) 16:121-131.
- TIMMERMAN, W., WESTERINK, B. H. C. – Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Sinapse* (1997) 27:242-61.
- VASYLIEVA, N. – Implantable microelectrode biosensors for neurochemical monitoring of brain functioning, *L'institut national des sciences appliquées de Lyon* (2012).
- VEDRINE, C., FABIANO, S., TRAN-MINH, C. – Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support, *Talanta* (2003) 59:535-544.
- WANG, Y., ZHANG, X., CHEN, Y., XU, H., TAN, Y., WANG, S. – Detection of dopamine based tyrosinase-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles chitosan nanocomposite biosensor, *American Journal of Biomedical Sciences* (2010) 2:209-216.
- WATSON, C. J., VENTON, B. J., KENNEDY, R. T. – In vivo Measurements of Neurotransmitters by Microdialysis Sampling, *American Chemical Society* (2006) 1391-1399.
- WESTERHOUT, J., PLOEGER, B., SMEETS, J., DANHOF, M., DE LANGE, E. C. – Physiologically based pharmacokinetic modeling to investigate regional brain distribution kinetics in rats, *AAPS Journal* (2012) 14:543-553.
- WESTERINK, B. H. C., DE VRIES, J. B. – Characterization of In Vivo Dopamine Release as Determined by Brain Microdialysis After Acute and Subchronic Implantations: Methodological Aspects, *Journal of Neurochemistry* (1988) 51:683-687.
- WHITTAKER, J. W., GORTON, L. – Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors and Bioelectronics* (2005) 20:2517-2554.
- WIGHTMAN, R. M. – Monitoring Molecules: Insights and Progress, *ACS Chemical Neuroscience* (2015) 6, 5-7.

- XU, Z., CHEN, X., DONG, S. – Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices, *Trends in Analytical Chemistry* (2006) 9:899.
- ZAPATA, A., CHEFER, V. I., SHIPPENBERG, T. S. – Microdialysis in Rodents, *Current Protocols Neuroscience* (2009) chapter/unit 7.2.
- ZAPATA, A., CHEFER, V. I., SHIPPENBERG, T. S., DENOROY, L. – Detection and Quantification of Neurotransmitters in Dialysates, *Current Protocols Neuroscience* (2009) 7.430.
- ZEYDEN, M. V. D., OLDENZIEL, W. H., REA, K., CREMERS, T. I., WESTERINK, B. H. – Microdialysis of GABA and glutamate: Analysis, interpretation and comparison with microsensors, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (2008) 90:135-147.
- ZHANG, F. F., WAN, Q., LI, C. X., WANG, X. L., ZHU, Z. Q., XIAN, Y. Z. *et al.* – Simultaneous assay of glucose, lactate, L-glutamate and hypoxanthine levels in rat striatum using enzyme electrodes based on neutral red-doped silica nanoparticles, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2004) 380:637-43.
- ZHOU, F., BRADDOCK, J. F., HU, Y., ZHU, X., CASTELLANI, R. J., SMITH, M. A., DREW, K. L. – Microbial origin of glutamate, hibernation and tissue trauma: an in vivo microdialysis study, *Journal of Neuroscience Methods* (2002) 119:121-128.