



CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA

TELMO AGUSTÍN MEJÍA GARCÍA

**ÓXIDO NÍTRICO REGULA A
SOBREVIVÊNCIA DE NEURÔNIOS
DE RETINA EM CULTURA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
NEUROIMUNOLOGIA

Orientador: Roberto Paes de Carvalho

Universidade Federal Fluminense

2004

2004
216



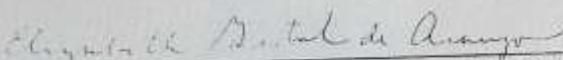
Universidade Federal Fluminense
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia

TELMO AGUSTÍN MEJÍA GARCÍA

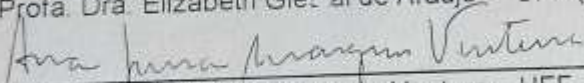
“Óxido Nítrico regula a sobrevivência de Neurônios de retina em cultura”

Dissertação apresentada à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neuroimunologia.

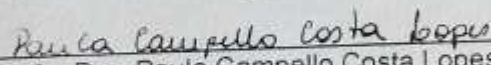
Aprovado por:




Profa. Dra. Elizabeth Gietzal de Araujo – UFF (Revisora e Suplente)




Profa. Dra. Ana Lúcia Marques Ventura – UFF



Profa. Dra. Paula Campello Costa Lopes – UFF



Prof. Dr. Sérgio Teixeira Ferreira – UFRJ



Prof. Dr. Roberto Paes de Carvalho UFF – (Orientador)

MEC-UFF-NDC-DBT-BCV
Serviço de Processamento Técnico

Nº Registro: _____

Nº T Patrimonial: _____

Cod Sistema: 139725

Cod Exemplar: 248079 *xx1*

MEJÍA-GARCÍA, Telmo Agustín.

— *Regulação da sobrevivência celular por óxido nítrico* —
— *na retina de embrião de pinto em cultura.* —

xi, 109 pg

Dissertação: Mestre em Neuroimunologia

1. Neuroproteção; 2. Óxido Nítrico; 3. Retina; 4. SNAP;
5. *Cultura de neurônios*; 6. NBI

I. Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, 2004.
II. Título.

O PRESENTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA CELULAR, DO PROGRAMA DE NEUROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE SOB ORIENTAÇÃO DO PROF. ROBERTO PAES DE CARVALHO COM AUXÍLIOS CONSEDIDOS PELO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ), FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) E COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR (CAPES).

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMENTOS..... | v |
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| ABREVIATURAS..... | x |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1- A retina..... | 3 |
| 1.2- Estrutura da retina..... | 5 |
| 1.3- Histogênese da retina..... | 8 |
| 2. NEUROTRANSMISSORES NA RETINA..... | 8 |
| 3. ÓXIDO NÍTRICO COMO NEUROTRANSMISSOR E NEUROMODULADOR..... | 10 |
| 3.1- Descoberta do NO..... | 14 |
| 3.2- Óxido Nítrico como neurotransmissor..... | 16 |
| 3.3- Biosíntese de Óxido Nítrico..... | 21 |
| 3.4- Propriedades do NO..... | 23 |
| 3.5- Doadores do NO..... | 26 |
| 3.6- Difusão de NO e sua esfera de ação..... | 27 |
| 3.7- O receptor biológico essencial do NO..... | 28 |
| 3.8- Alvos celulares de ação do NO..... | 31 |
| 3.9- Óxido nítrico e neurotransmissão..... | 32 |
| 3.10- Óxido nítrico na retina..... | 34 |
| 3.11- Papel neuroprotetor do NO..... | 38 |
| 4. OBJETIVOS..... | 38 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 5.1- Materiais..... | 39 |
| 5.1-1- Reagentes..... | 39 |
| 5.2- Soluções..... | 40 |
| 5.2- Métodos..... | 41 |
| 5.2.1- Dissecção das retinas..... | 41 |
| 5.2.2- Western blot para NOS na retina intacta..... | 42 |
| 5.2.3- Cultura purificada de células retinianas..... | 45 |
| 6. RESULTADOS..... | 45 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 72 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 84 |

RESUMO

O Óxido Nítrico (NO) não somente funciona como uma importante molécula sinalizadora para estimular a produção de GMPc no cérebro, mas também regula a morte de células neuronais. O mecanismo pelo qual o NO exerce esses efeitos protetores não é conhecido. O presente estudo investiga o mecanismo pelo qual o NO⁺, produzido a partir de um doador de NO (SNAP), exerce esse efeito protetor em cultura purificada de neurônios de retina de pinto e determinar a expressão da Óxido Nítrico Sintase (NOSn) na retina de pinto em vários estágios do desenvolvimento. Nós encontramos que a expressão da proteína foi maior na retina de 8 dias embrionários (E8) e diminuiu em E12 e E15, indicando que a síntese de NO apresenta importantes papéis no desenvolvimento embrionário da retina. As culturas obtidas usando-se retinas de 8 dias embrionários, foram tratadas após 24 horas de incubação (E8C1) com ou sem SNAP (100 μM) e incubadas por mais 72 horas. As culturas de E8C4 foram fixadas e o número de células determinado. Culturas experimentais foram incubadas em paralelo e o meio de cultura trocado depois de 48 horas (E8C3) na presença ou ausência de SNAP e incubadas por mais 24 horas para serem fixadas. Estudos prévios mostraram que a troca de meio promove extensiva morte celular. SNAP bloqueou essa morte de maneira dose e tempo-dependente. Nossos dados revelam que o NO⁺ inibe a morte celular através da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) mas seu efeito bloqueado pelos inibidores da enzima ODQ e LY83583. Interessantemente, o efeito de NO⁺ foi também bloqueado por LY29402, wortmannin, PD98059 e KN93 sugerindo o envolvimento da via de sinalização da PI3K/AKT, ERK(1/2) e CaMKII respectivamente. O NO⁺ também induz um significativo crescimento dos neuritos, um indicativo de diferenciação neuronal. Por outro lado, Ciclosporina A, um inibidor do poro de transição mitocondrial (mPTP), considerado como um importante mediador de apoptose e necrose, também bloqueou o efeito da morte desencadeada pela troca de meio. Esses dados em conjunto demonstram que o NO⁺ inibe a apoptose induzida pela troca de meio dependente da via cGMP/PKG, reforçando a noção de que o NO⁺ apresenta um importante papel como molécula mensageira durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.

“Quem começa com certeza terminará com dúvida, mas quem se contentar em começar com dúvida poderá terminar com certeza”

Sir Francis *Bacon*.

Dedico este trabalho a minha querida família:
meus pais, Anderson e Maria Graciela, e aos
meus irmãos Bulmer e Ericka.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato a DEUS, pela oportunidade de estar aqui no Brasil e conceder-me a vida até estes momentos de desenvolver esta pesquisa.

Ao Prof., Roberto Paes de Carvalho, pela paciência, orientação e pelos ensinamentos em todas as etapas deste trabalho, prezando sempre a minha formação científica.

À minha querida família que ora dia-a-dia para que eu consiga alcançar o alvo desejado e seus bons conselhos através da palavra inspirada.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Celular pela ajuda e as discussões semanais nos seminários.

A todos os companheiros do Programa de Neuroimunologia pela amizade e ótimas conversas.

Aos professores do curso, Luis, Gawri, Tereza, Izabel, Cláudio, Ana e Beth pelo incentivo e conhecimento oferecido.

De la misma forma estoy profundamente agradecido a mis hermanos Bulmer y Ericka, que me ayudaron a salir adelante en momentos difíciles de mi carrera profesional. Por uds dos y juntos a mis padres Anderson y María Graciela, vá este manuscrito para que juntos podamos decir: "Está hecho"

Talvez não possa falar mais do que vocês esperam, mas saibam que foi uma das temporadas maravilhosas da minha vida que me ensinaram a elucidar a complexidade do mundo celular em termos moleculares, dessa forma seria injusto da minha parte falar os nomes de todos vocês pela dedicação, o exemplo como profissionais, amigos e a simplicidade de me oferecer sua cultura. A todos vocês faço extensivos os meus agradecimentos que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento desta teses.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) works not only as an important signaling molecule in the brain by stimulating the production of cGMP, but also regulates neuronal cell death. The mechanism by which NO exerts its protective effects is unclear. The present study explored the mechanism by which NO⁺, produced from the NO donor S-nitroso-Acetyl-D-L-Penicillamine (SNAP), exerts its neuroprotective effect in purified cultures of chick retinal neurons and determined the expression of Nitric Oxide Synthase (NOSn) in chick retina at several stages of development. We found that the protein expression was higher at 8-day-old embryo retina and decreased at 12-15 days, indicating that the synthesis of NO has important functions in early retinal development. Cultures prepared from 8 day-old chick embryo retinas were treated or not after 24 hours of incubation (E8C1) with SNAP (100 μ M) and incubated for further 72 hr. At E8C4 cultures were fixed and the number of cells estimated. Experimental cultures were run in parallel but refed with fresh medium in the absence or presence of SNAP after 48 hr (E8C3), incubated for further 24 hr and then fixed. Previous studies showed that the refeeding procedure promotes extensive cell death. SNAP prevented this death in a concentration and time-dependent manner. Our results did reveal that NO⁺ inhibits cell death through its ability to activate soluble guanylate cyclase, since this protection was significantly reversed by the enzyme inhibitors ODQ or LY83583. Interestingly, the effect of NO⁺ was also suppressed by LY294002, Wortmannin, PD98059 or KN93, respectively indicating the involvement of PI3K/AKT, ERK(1/2) and CaMKII signaling pathways. NO⁺ also induced significant increase of neurite outgrowth, an indicative of neuronal differentiation. Cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) considered as an important mediator of apoptosis and necrosis, also blocked the cell death induced by refeeding the cultures. These findings demonstrate that NO⁺ inhibits the apoptosis induced by refeeding retinal neurons with fresh medium in a cGMP/PKG-dependent way and strengthen the notion that NO⁺ plays a role as a messenger molecule of great importance during development of the central nervous system.

ABREVIATURAS

| SIGLA | DESCRIÇÃO |
|-------------|---|
| GMPC | Guanosina monofosfato cíclico. |
| IP3- | Inositol-trifosfato. |
| NMDA- | N-metil-D-aspartato. |
| AMPC- | Adenosina 3'-5' monofosfato. |
| SNC- | Sistema Nervoso Central. |
| NBI- | Nitrobenziltioinosina. |
| 8Br-GMPC- 8 | Bromoguanosine-3',5' monofosfato cíclico. |
| GTP - | Guanosina trifosfato cíclico. |
| GABA- | Ácido gama aminobutírico. |
| NO- | Óxido nítrico. |
| NOS- | Óxido Nítrico Sintase. |
| LTP- | Long term potentiation. |
| ATP- | Adenosina 5'-trifosfato. |
| E8C3- | Oitavo dia de estágio embrionário cultivado por 3 dias. |
| CMF- | Solução salina balanceada sem cálcio e magnésio. |
| BME- | Meio Básico de Eagle. |
| PKA- | Proteína cinase dependente de AMPC. |
| CaMKII- | Proteína cinase dependente de Ca ²⁺ /Calmodulina |
| PI3K- | Proteína cinase dependente de fosfatos de inositol. |
| SNAP- | S-nitroso-N-acetil-penicilamina. |
| PTIO- | scavenger de NO. |
| KT5823- | Inibidor da PKG. |
| PKG- | Proteína cinase G. |
| ERK1/2- | Proteína cinase regulada por sinal extracelular. |
| MAPK- | Proteína cinase ativada por mitógeno. |

| | |
|-----------|--|
| PKB- | Proteína cinase B (Akt) |
| SRC- | Proteína cinase oriunda de sarcoma de galinha. |
| EDRF- | Fator de relaxamento derivado do endotélio. |
| O_2^- - | Ânion superóxido. |
| $ONOO^-$ | Peroxinitrito. |
| SH- | Radical sulfidríla. |
| ODQ- | 1h-[1,2,4]oxadiazole-[4,3,a] quinoxaline-1. |
| GSNO- | S-nitrosoglutationa. |
| CsA- | Ciclosporina-A. |
| PAGE | Gel de poliacrilamida para eletroforeses. |
| H89- | Inibidor da PKA. |
| LY83583 | Inibidor da sGC . |
| LY294002- | Inibidor da PI3-cinase. |
| PD98059- | Inibidor da MEK |
| NO^- - | Ânion nitroxila. |
| NO^- - | Óxido nítrico radical. |
| NO^+ - | Cation nitrosonio. |
| DTT- | Ditiotreitol. |
| FAD- | Flavina Dinucleotídeo. |
| FMN- | Flavina Mononucleotídeo. |
| NADPH- | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fostato. |
| TH4B- | Tetrahidrobiopterina. |
| TNF - | Fator de Necrose Tumoral Alfa. |

1. INTRODUÇÃO

1.1- A RETINA

O sistema nervoso é composto por um grande número de células que continuamente recebem informação, as elaboram e tomam decisões que no final das contas nem todas dirigirão à percepção. Trinta e oito por cento de fibras cérebro-aférentes pertencem ao sistema visual o que justifica o papel predominante deste sistema sensorial na percepção humana (Gerar e Kirchner, 1997 para revisão).

Embora todas as partes do olho sejam importantes para perceber a informação visual, a retina é certamente a parte mais primordial do sistema. A retina é essencialmente uma porção do sistema nervoso que é projetado externamente do cérebro com o fim de receber os feixes de luz provenientes do mundo externo. Desde as primeiras descrições de Cajal, a retina tem sido utilizada em estudos de arquitetura neuronal, circuitaria sináptica e correlações entre estrutura e função (Spence e Robson, 1989).

Além da sua capacidade de fotorrecepção e devido às inúmeras vantagens experimentais oferecidas por este tecido, a retina tem sido intensamente utilizada como modelo de estudo do Sistema Nervoso Central (SNC). Em decorrência de sua organização celular ser muito bem definida, estudos das funções neuronais neste modelo são muito explorados tanto em períodos precoces quanto tardios do desenvolvimento. A retina é constituída de uma fina camada de tecido nervoso localizada na parte posterior do globo ocular. Uma vantagem importante da retina é a possibilidade de cultivar suas células dissociadas. Por outro lado, os contatos sinápticos e as funções neuroquímicas são restabelecidas "*in vitro*" de forma similar ao que acontece "*in vivo*" (de Mello, 1980).

Apesar de parecer contraditório, é importante encarar a morte celular programada (apoptose), como um mecanismo de sobrevivência ao invés de destruição, já que ela está intimamente envolvida em todo o processo do desenvolvimento embrionário de um organismo. A regulação da morte celular programada inicia-se desde o momento em que um grupo de moléculas sinalizadoras, extrínsecas às células, liga-se aos seus receptores celulares específicos, desencadeando uma cascata sinalizadora intracelular que culminará em uma resposta na expressão gênica da célula (Ashkenazi e Dixit, 1998; Bowen e Bowen, 1990 para revisão). Por outro lado, as caspases são proteases que participam da cascata da sinalização intrínseca que desencadeiam a apoptose em diferentes tipos celulares (Desagher e Martinou, 2000)

A descrição inicial de morte neuronal fisiológica ou natural se deve aos estudos quantitativos de Hamburger e Levi-Montalcini, 1949 em embriões de pinto. Eles demonstraram que nos estágios E5 e E6 do desenvolvimento embrionário do animal se produzia a degeneração de um grande número de neurônios nos gânglios espinhais, cervicais e torácicos do sistema simpático (Hamburger e Levi-Montalcini, 1949, apud Dowling, 1991).

A morte de neurônios ao longo do desenvolvimento embrionário pode servir para uma variedade de funções, dependendo em parte da idade na qual se produz a morte, assim como da espécie, o tipo neuronal e as regiões do sistema nervoso aonde se localiza. Por exemplo, a morte de neurônios pode contribuir à eliminação de células defeituosas, modelar a morfologia grosseira das regiões do sistema nervoso ou criar estruturas morfológicas permissivas para o crescimento do axônio (Lincz, 1998 para revisão).

1.2- ESTRUTURA DA RETINA

A retina é uma estrutura organizada em múltiplas camadas de corpos celulares e de processos sinápticos. No tecido adulto as células podem ser identificadas por sua posição, estrutura, propriedades bioquímicas e função (Farber e Adler, 1986).

A organização celular da retina, é muito bem definida e consiste de 5 camadas principais: três compostas de corpos celulares e duas de prolongamentos (figura 1). Na camada mais externa, isto é, mais próxima ao epitélio pigmentar, estão os segmentos externos dos fotorreceptores, células diferenciadas de forma a captar luz (fótons) e transduzir estímulos eletromagnéticos em variações de potencial de membrana. Os sinais codificados por essas células são transmitidos através das células ganglionares aos centros visuais superiores, onde serão interpretados (Kolb, 1994 para revisão).

Na ausência de luz a membrana do segmento externo dos fotorreceptores está permanentemente despolarizada pela ativação dos canais de Na^+ regulados por GMP-cíclico (GMPc) (Fesenko, et al., 1985). Quando despolarizados, os fotorreceptores liberam glutamato na fenda sináptica. A luz modifica a conformação da rodopsina e a proteína G transducina se isomeriza, ativando a fosfodiesterase do GMPc, que o hidrolisa diminuindo os níveis de GMPc e em consequência, os canais de Na^+ se fecham e a célula hiperpolariza (Stryer, 1986).

Os fotorreceptores se subdividem em cones e bastonetes que diferem em morfologia e em sensibilidade à luz. Os cones são sensíveis à luminosidade mais intensa e têm o segmento externo de forma cônica sendo responsáveis pela visão cromática. Os bastonetes são responsáveis por uma visão noturna e acromática. Além disso, os bastonetes apresentam o segmento externo alongado o que possibilita uma maior absorção de luz.

A propagação de sinais na retina é modulada por interações celulares laterais. Assim, os fotorreceptores transmitem a informação para as células ganglionares, sendo esta via de transmissão mediada pelas células bipolares. A informação é modulada por aferências de células horizontais e amácrinas (Barnstable, 1995).

Limitando inferiormente a camada de fotorreceptores, está localizada a camada plexiforme externa, composta de processos neurais da camada nuclear interna e processos dos fotorreceptores. Na camada nuclear interna estão as células bipolares, que transmitem os sinais dos fotorreceptores até as células ganglionares (verticalmente), células horizontais e amácrinas, que transmitem o sinal neural horizontalmente.

A população de células gliais constitui-se de um tipo predominante chamado de células de Müller. Seus núcleos se encontram na região média da camada nuclear interna. Estas células dispõem-se radialmente, atravessando toda a retina desde a membrana limitante externa até a membrana limitante interna sendo, na verdade, ambas formadas pela expansão da membrana plasmática das células de Müller.

Após a camada nuclear interna está a camada plexiforme interna, contendo processos neurais que se projetam à camada ganglionar. Finalmente, as células ganglionares emitem axônios que saem da retina e formam o nervo óptico, transmitindo os impulsos nervosos em forma de potenciais de ação a centros superiores para um posterior processamento da imagem (Kolb, 1994 para revisão).

1.3- HISTOGÊNESE DA RETINA

A formação da retina tem origem a partir da invaginação da vesícula óptica primária dois ou três dias após a fecundação, formando a vesícula óptica secundária em bicamada (Meller, 1984). A retina neural deriva da camada mais interna deste olho primitivo. A camada mais externa em contato com o mesenquima circunvizinho dá origem à esclera e coróides para constituir o epitélio pigmentar da retina (RPE).

O processo inteiro do desenvolvimento da retina de pinto dura aproximadamente 3 semanas e é completado essencialmente na hora da eclosão (Hamburger e Hamilton, 1951). Embora a atividade elétrica possa ser registrada nos primeiros dias da formação da retina, um eletroretinograma em sua forma madura só é alcançável em E19 (Mey e Thanos, 2000 para revisão). A formação do globo ocular já é visível no primeiro dia após a fecundação (Hamburger e Hamilton, 1951) mas os primeiros estudos a respeito da histogênese da retina só foram desenvolvidos após o terceiro dia de fecundação (Coulombre, 1955, Kahn, 1974; Mishima e Fujita, 1978, Prada et al., 1979).

A retina desenvolve-se nas direções centro-periférica e dorso-ventral. Na retina posterior, próximo às papilas ópticas, estudos feitos por Kahn (1974) indicam que a maioria dos neurônios da retina fazem o ciclo mitótico entre o terceiro e quarto dia de incubação (E3 e E4) e a maioria dos fotorreceptores e células ganglionares começam a se diferenciar entre E3 e E5.

Entre E3 e E4 a retina neural se invagina e acola ao epitélio pigmentar formando a vesícula óptica com duas camadas. De E4 a E8 a área da retina é aumentada pela disposição de células nas margens da vesícula óptica. O espessamento da retina é feito pela adição de células à camada adjacente ao epitélio pigmentar. Entre E6 e E10 a retina diferencia em todas

as camadas reconhecidas no adulto. Em E6 nenhuma das camadas plexiforme está evidente e a retina é relativamente indiferenciada; mas a camada de fibras ópticas pode ser observada, e dentro do neuroepitélio existem células grandes próximas à camada de fibras ópticas que podem ser células ganglionares pós-mitóticas. As células ganglionares podem ser reconhecidas pelo seu grande tamanho entre E6 e E7, ao mesmo tempo em que o primeiro axônio da célula ganglionar atinge o tectum óptico; mas a camada de células ganglionares e a camada plexiforme interna não podem visualizar-se até E7. A camada plexiforme externa só se torna visível após E9. As primeiras células a iniciarem o processo de diferenciação são as células ganglionares que estão em contato com o humor vítreo (Adler, 1993; Kahn, 1973; Fujita e Horü, 1963;). Logo após, inicia-se a diferenciação das células amácrinas, das células horizontais, fotorreceptores e finalmente das células bipolares (Prada et al., 1979; Mishina e Fujita, 1978; Kahn, 1974,1973).

Na retina em E10 todas as camadas celulares podem ser observadas além de uma espessa camada plexiforme interna e uma delgada camada plexiforme externa. As células de Müller, que formam a glia da retina, já estão presentes na retina em torno de E4 (Coulombre, 1955). As primeiras conexões sinápticas são visualizadas na camada plexiforme interna por volta de E14 e na plexiforme externa por volta de E15 (Hughes e La Velle, 1974; Sheffield e Fischman, 1970; Coulombre, 1955;). Após E15 já são encontrados os cones e bastonetes na superfície da retina neural, ocorrendo a diferenciação estrutural dos segmentos externos dos fotorreceptores até E21 (momento da eclôção) (Mason e Bighouse, 1975; Araki, 1984).

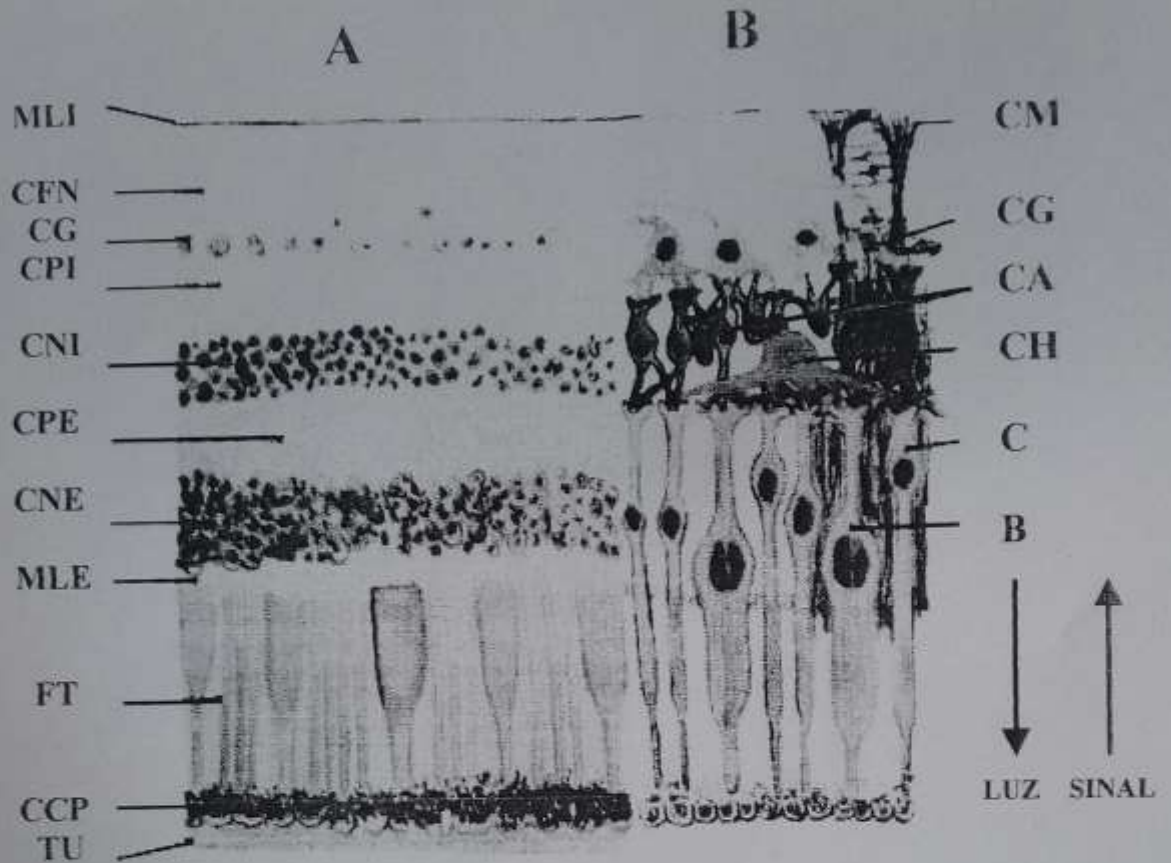


Figura 1. Representação esquemática da retina, mostrando a disposição das camadas (A) MLI: Membrana limitante interna, CFN: Camada de fibras nervosas, CCG: Camada de células ganglionares, CPI: Camada plexiforme interna, CNI: Camada nuclear interna, CPE: camada plexiforme externa, CNE: Camada nuclear externa, MLE: Membrana limitante externa, FT: Fotorreceptores, CCP: Camada de célula pigmentar, TU: Túnica uveal. Tipos celulares (B): CM: Célula de Müller. CG: Células ganglionares. CA: Amácrinas. CH: Horizontais. C: Cones. B: Bastonetes.
(education.vetmed.vt.edu/EYE/RETINA.HTM)

2- NEUROTRANSMISSORES NA RETINA

Estudos farmacológicos identificaram substâncias que atuam como neurotransmissores ou neuromoduladores na retina neural. A resposta à ligação do neurotransmissor e do neuromodulador com seus receptores de membrana nas diferentes células é distinta podendo ocorrer a abertura de canais iônicos seletivos a ions mono ou divalentes, levando a despolarização ou hiperpolarização de membrana plasmática. Por outro lado, a mobilização e ativação de sistema enzimáticos que modificam bioquimicamente a célula alvo são próprios da ação de cada neurotransmissor ou cada neuromodulador.

Na retina de diversas espécies de animais, pelo menos cinco substâncias já foram identificadas como possíveis neurotransmissores (**GABA, glutamato, glicina, acetilcolina, dopamina e serotonina**). Alguns peptídeos, como por exemplo, substância P, encefalinas, somatostatina, neurotensina, neuropeptídeo Y, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina e glucagon (Dowling, 1987; Kelly, 1993),

A presença de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, assim com a descrição de receptores glutamatérgicos na retina de vertebrados (Watkins, 1990), conferem a retina o estatus de um modelo experimental em potencial para o estudo de patologias de origem excitotóxicas que constantemente ocorrem no SNC. Em contrapartida, vários estudos têm mostrado que o controle do componente excitatório é regulado por mecanismos neuromodulatórios, que são ativados em resposta a sinais de injúria tecidual.

Na retina de pinto, a maioria dos fotorreceptores e alguns neurônios acumulam adenosina endógena e podem captar adenosina através de um mecanismo específico de alta afinidade (Paes-de-Carvalho et al 1990). A retina de pinto possui poucos receptores de adenosina na

camada de células ganglionares, enquanto que nas camadas plexiformes externa e interna há uma grande densidade desses receptores (Paes-de-Carvalho et al., 1992)

Nos meados dos anos 80, trouxeram duas novas classes de substâncias químicas como possíveis neurotransmissores ou neuromodulatórios (Gases e D-aminoácidos). Dessa forma, Vincent (1994 e 1995), mostrou que o Óxido Nítrico (NO) se esgota à medida que se difunde e se combina com diferentes substratos.

Alguns critérios para neurotransmissores foram preenchidos pelo NO no Sistema Nervoso Autônomo (Vincent, 1995). Mas as propriedades físico-químicas do NO determinam características peculiares na transmissão nitrérgica (Snyder, 1992; Bredt e Snyder, 1992). Alguns estudos têm mostrado a presença do NO em neurônios retinianos e no epitélio pigmentar (Bredt et al., 1990; Goureau et al 1993) como neurotransmissor das células ganglionares e amácrinas (Dawson et al., 1991; Koistinaho et al., 1993; Yamamoto et al., 1993b), fibras nervosas das camadas plexiformes externa e interna, assim como em fotorreceptores (Yamamoto et al., 1993 a) indicando um possível papel neuromodulador desta molécula durante o desenvolvimento. A definição do óxido nítrico (NO) como mensageiro intercelular (Hibbs et al., 1988), ilustra um destes processos de renovação sobre nossa concepção clássica de transmissão sináptica e da comunicação interneural.

3- ÓXIDO NÍTRICO COMO NEUROTRANSMISSOR E NEUROMODULADOR

3.1- DESCOBERTA DO NO

O NO é uma molécula lipossolúvel, permeável à membrana podendo ativar cadeias metabólicas intracelulares, principalmente por meio da síntese de GMP cíclico (GMPc) (Grutter et al., 1979).

As origens desta história estão no princípio do século XIX, quando se reconheceu o efeito benéfico da nitroglicerina no tratamento da angina de peito (*angor pectoris*), a esta substância atribuiu-se um efeito vasodilatador coronariano e de outros vasos do organismo (Brunton, 1967; Murrel, 1979). Transcorreu mais de um século antes de se conseguir evidenciar experimentalmente que a vasodilatação era causada pela geração de NO, a partir da decomposição da molécula de nitroglicerina, e por sua vez, o NO era capaz de promover a síntese de GMP cíclico (Grutter et al., 1979).

Passado esse tempo, novos achados foram se sucedendo na história, por exemplo: Furchgott em 1984 obteve evidências experimentais da existência de um fator de natureza química desconhecida de origem endotelial que produzia o relaxamento do músculo liso vascular na presença de acetilcolina (ACh), sem que atuasse em receptores específicos da parede do endotélio. Mais tarde demonstrou-se que bradicinina e ATP também induziam relaxamento vascular (Snyder 1992; Moncada, 1991). Essa enigmática substância se denominou provisoriamente “fator de relaxamento derivado do endotélio (Endothelium-Derived Relaxing Factor, EDRF). Do trabalho de Furchgott podemos transcrever:

“ Faz alguns anos descobrimos de forma acidental que o relaxamento observado pela administração de ACh nas fatias de artéria cortadas em forma transversal ou helicoidal, dependia totalmente da presença de células endoteliais. Esta descoberta contribuiu a resolver a questão de que a ACh, um potente vasodilatador arterial, “in vivo” não produziria o relaxamento

muscular esperado. Apparently, in the preparation of tissues "in vitro" no relaxation was obtained, due to the fact that the endothelial cells were accidentally damaged during the dissection of the biological material" (Furchgott, 1984).

A figura 2 mostra um dos experimentos clássicos deste investigador, demonstrando que a presença de ACh de artéria isolado provocou a diminuição da tensão muscular na condição onde o endotélio vascular achava-se intacto. A ACh então não atuaria diretamente sobre o músculo liso vascular e sim seu efeito dilatador se produziria através da produção e liberação de uma molécula, o EDRF.

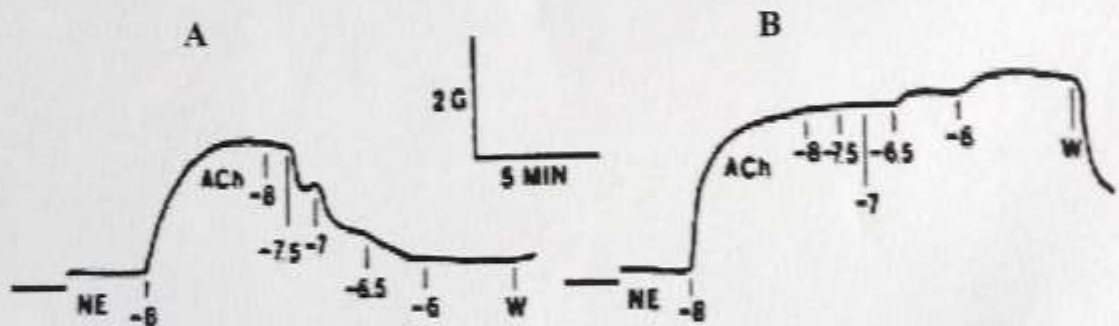


Figura 2. Ação da Acetilcolina (ACh) responsável pelo relaxamento vascular. As linhas (—) correspondem à tensão produzida no isolado de artéria da aorta na presença de norepinefrina (NE). Em (A), Mostra-se o isolado de artéria com o endotélio intacto. Em (B), o endotélio foi removido previamente. A acetilcolina (ACh) produz uma diminuição da tensão dose-dependente só no segmento com o endotélio intacto. (Modificado do trabalho de Furchgott, 1984)

Já em 1979 se havia demonstrado que o NO, em músculo liso, provocava um marcante relaxamento do músculo pré-contraído e que esse efeito era mediado pela enzima guanilato

ciclase solúvel (GCs) (Grutter et al., 1979). Outros estudos mostraram que a nitroglicerina e nitritos orgânicos exerciam seu efeito vasodilatador pela ativação da GCs e a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Ignarro et al. 1981; Arnold et al. 1977)

Por meio de eventos intracelulares interrelacionados, este segundo mensageiro desencadeia o relaxamento vascular. Foi assim que, devido às semelhanças dos efeitos do EDRF e do NO sobre o músculo liso, Furchgott e Ignarro propuseram que o enigmático EDRF era na realidade o NO, o que foi confirmado anos mais tarde (Moncada et al. 1991; Furchgott, 1988; Ignarro et al. 1988; Palmer et al. 1987; 1988). Por seus estudos, estes investigadores receberam junto com F. Murad, o prêmio Nobel de Medicina em 1998.

Na figura 3 está esquematizado como se produz o relaxamento vascular na presença de ACh e com compostos liberadores de NO (nitroglicerina, SNAP, GSNO). De acordo com esse esquema, o NO é sintetizado pela célula endotelial através da ativação de uma enzima conhecida como óxido nítrico sintase (NOS), que cataliza a conversão de L-arginina para L-citrulina e NO. A ligação da ACh com o receptor muscarínico da célula endotelial leva a um mecanismo indireto na ativação da NOS. Tanto o NO sintetizado na célula endotelial como o gerado a partir de um doador de NO atua na célula alvo ativando a enzima GCs e o conseqüente aumento da concentração intracelular de GMP-cíclico. Por sua vez, esse segundo mensageiro intracelular, provoca a abertura de canais de potássio hiperpolarizando a membrana muscular lisa ou estimulando uma bomba de Ca^{+2} na membrana e diminuindo o conteúdo intracelular deste ion. O NO também pode exercer efeito direto sobre canais de potássio (K^+) e Ca^{+2} da célula muscular (Moncada et al. 1991; Furchgott, 1988; Ignarro et al. 1988)

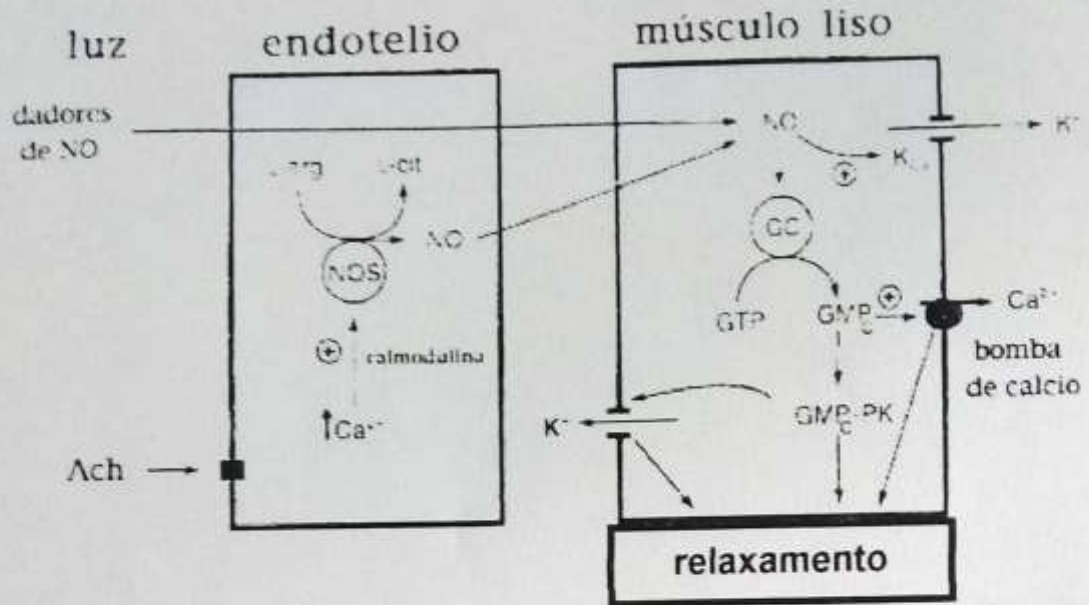


Figura 3. Esquema que resume o mecanismo pelo qual a Acetilcolina (ACh) exerce seu efeito vasodilatador no músculo liso de vaso. GC: Guanilato Ciclase solúvel; GMPc: Monofosfato cíclico de guanina; GTP: Trifosfato de guanosina; L-arg: L-arginina; L-cit: L-citrulina; NOS: Óxido Nitrico Sintase; PK-GMPc: Proteína cinase dependente de GMPc.

Em 1977 Murad e colaboradores mostraram que o NO ativava uma guanilato ciclase cerebral, mas este fato só foi considerado inicialmente como um fenômeno bioquímico sem significado fisiológico evidente. Posteriormente se demonstrou que os aminoácidos excitatórios eram capazes de aumentar os níveis de cGMP em culturas de neurônios de cerebelo a partir de um fator com propriedades similares ao EDRF (Garthwaite et al. 1988).

Uma atividade NADPH diaforase correspondente à NOS, foi detectada em numerosos grupos neuronais no SNC, e logo depois a presença da própria NOS foi demonstrada no sistema nervoso (Förstermann et al., 1990). Esses achados sugeriram que a síntese do NO poderia ocorrer no sistema nervoso, embora sua função fosse ainda motivo de especulação. Foi no Sistema Nervoso Periférico (SNP) que demonstraram pela primeira vez o papel do NO na neurotransmissão. Nesse sistema, amostras experimentais utilizadas permitiram a estimulação de fibras nervosas que inervam as paredes dos diversos órgãos, e o registro do grau de contração do músculo liso. Desta maneira se determinou que alguns componentes do relaxamento da fibra muscular lisa obtidos por estimulação nervosa não podiam ser explicados nem pela noradrenalina nem pela ACh. Esses componentes estariam mediados por outro tipo de neurotransmissão que se denominou “não adrenérgica não-colinérgica” (NANC). A confirmação da hipótese de que o NO era um neurotransmissor NANC se obteve quando, por meio de inibidores da síntese do NO, se conseguia bloquear o relaxamento do músculo liso induzido pela estimulação elétrica do plexo mientérico; uma ação NANC por excelência (Gillespie et al. 1989; Li e Rand, 1989; Gibson et al. 1990).

3.2- ÓXIDO NÍTRICO COMO NEUROTRANSMISSOR

O NO é sintetizado pela enzima NOS e se difunde de seu local de síntese por gradiente de concentração até seus alvos celulares. Ali se combina com seus receptores biológicos, sendo o mais estudado a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Na figura 4 se esquematiza uma sinapse glutamatérgica no SNC rodeada de outros elementos neurais. Neste esquema o glutamato liberado por um terminal celular pré-sináptico atuará na célula pós-sináptica mediando a entrada de ions cálcio (Ca^{+2}). O aumento da concentração de cálcio intracelular

ativa a NOS por um mecanismo dependente de calmodulina (CaM), sintetizando-se o NO na célula pós-sináptica. O NO produzido logo depois da liberação de glutamato pode atuar sobre essas células alvo caso elas possuam a GCs. Portanto, a difusibilidade do NO determina que seus efeitos não sejam restritos ao sítio de síntese. Assim, o NO é capaz de atuar sobre toda a estrutura existente que tenha como centro seu sítio de síntese.

Geralmente para cessar as ações de um neurotransmissor em uma sinapse química, este deve ser ativamente eliminado do espaço sináptico. Por exemplo, a ACh é hidrolizada pela acetilcolinesterase no espaço sináptico e a serotonina é recaptada por terminais sinápticos serotoninérgicos. No entanto, no caso do NO não opera nem o metabolismo nem a recaptação, e o neurotransmissor se esgota à medida que se difunde e combina com diferentes substratos (Vincent, 1995).

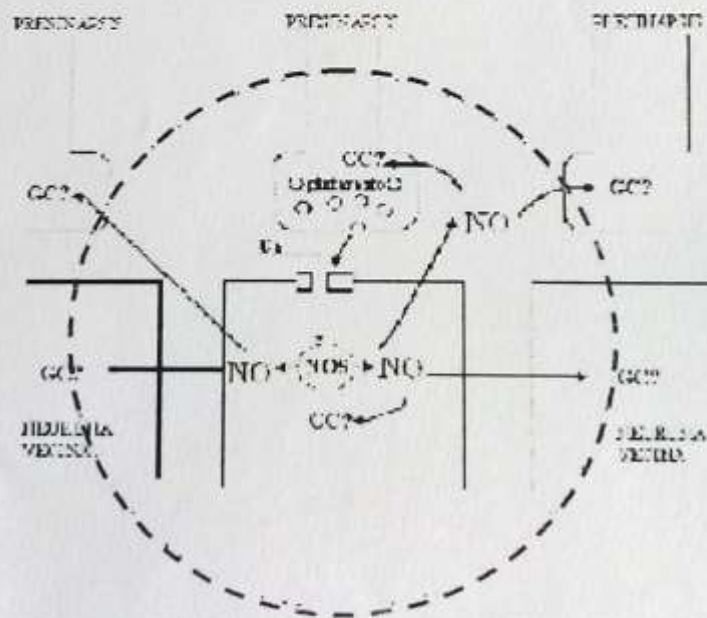
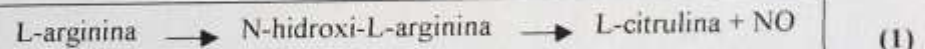


Figura 4: Síntese, difusão e esfera de ação do Óxido Nítrico.

3.3- BIOSÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

A enzima Óxido Nítrico Sintase (EC 1.14.13.9, NOS), cataliza a conversão de L-arginina a L-citrulina e NO, esta reação se esquematiza na figura 5. O NO é quimicamente um gás constituído pela ligação entre oxigênio e nitrogênio, encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades que a torna um agente químico altamente reativo. Quando dissolvido em água, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. O NO liga-se à hemoglobina (Hb) e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando a uma mudança de sua atividade biológica (Bredt e Snyder, 1992). A reação 1 indica a clássica reação química de formação do NO em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e Ca²⁺ sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO (Alderton et al., 2001 para revisão).



A L-arginina é um aminoácido semi-essencial produzido no organismo em quantidades insuficientes para todas as necessidades. Além do ciclo da uréia, a L-arginina é utilizada na síntese de creatinina e fornece ornitina para a síntese de poliaminas (Konturek e Konturek, 1995 para revisão). Como há uma solicitação metabólica continuada da L-arginina, existe uma neo-síntese da L-arginina nos túbulos proximais renais a partir da citrulina. Proteínas ingeridas são degradadas até arginina, que podem ser diretamente absorvidas e utilizadas no ciclo da uréia no tecido hepático, ou transformadas no epitélio intestinal em ornitina que, juntamente com a glutamina secretada como glutamato são convertidas em citrulina. A citrulina absorvida se transforma em arginina no ciclo renal. A citrulina também pode ser

convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e macrófagos (Konturek e Konturek, 1995 para revisão).

A síntese enzimática do NO ou citrulina pode ser inibida por análogos de L-arginina tais como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) e N^G-nitro-L-arginina-metiléster (L-NAME) (Bredt e Snyder, 1992; Rees et al., 1990). Estes inibidores têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, uma vez que a substituição do substrato habitual (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção do NO e seus efeitos conseqüentes.

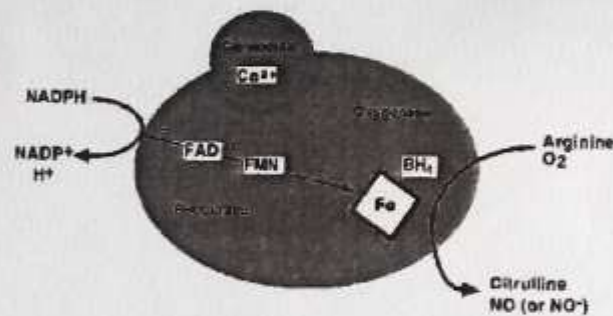


Figura 5: Produção do NO pela NOS em presença dos cofatores e formação do complexo Ca^{+2} /Calmodulina. (Alderton et al., 2001)

A demonstração da produção do NO é ainda difícil, sendo sempre feita de maneira indireta. Todas as pesquisas pioneiras não demonstraram quantificar o NO propriamente dito devido à sua difusibilidade, só foi medida pela concentração de nitrito e nitrato como prova de

sua produção. Outro método indicativo para a detecção de NO, é a substituição do substrato L-arginina, por um análogo (L-NNA, L-NMMA ou L-NAME).

A NOS requer cofatores como NADPH, FAD, FMN e BH4 além de consumir uma molécula de O₂. (NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; FMN: flavina mononucleotídeo; BH4: tetrahydrobiopterina). Três isoenzimas da NOS foram purificadas, clonadas e caracterizadas bioquimicamente (figura 6). Nas células neuronais existe uma NOS (nNOS) constitutiva de ativação rápida, dependente de Ca⁺⁺/calmodulina (Bredt e Snyder, 1990). A nNOS ou isoforma I está presente no cérebro e foi purificada inicialmente no cerebelo de camundongo e do porco (Schmidt et al., 1991). Esta proteína, já clonada a partir de cérebros de humanos, mantém uma seqüência de aminoácidos altamente conservada entre as espécies, ocorrendo 93% de identidade entre a NOS de humanos e camundongos (Konturek e Konturek, 1995).

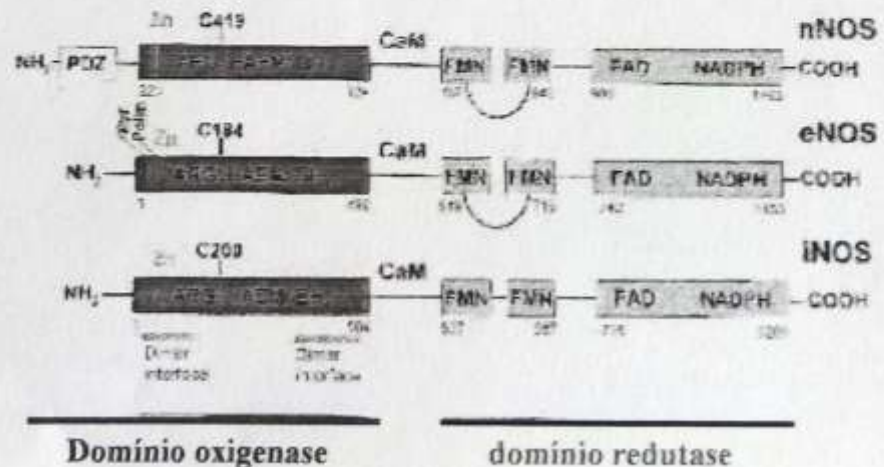


Figura 6: Domínios estruturais da NOS (nNOS, eNOS e iNOS)

(Alderton et al., 2001)

A atividade da nNOS é regulada pela concentração de cálcio intracelular (Bredt e Snyder, 1990). Existem mecanismos adicionais de regulação da nNOS. Por exemplo, esta enzima é sensível às variações na concentração de L-arginina e/ou cofatores como NADPH. Provavelmente, o NO produzido contribua para a inibição da atividade da NOS por um mecanismo de retroalimentação negativa ligando-se ao grupo heme da NOS em forma reversível (Roger & Ignarro, 1992). Outros investigadores sugerem que o NO bloqueia completamente a enzima citocromo P450 numa concentração menor que 70 nM (Mayer 1995). Contudo, estudos com a NOS purificada revelaram que esta não foi apreciavelmente inibida por doadores de NO (Mayer 1995).

Tem-se identificado em várias espécies uma Proteína Inibitória da nNOS (PIN) que ao ligar-se à nNOS impede sua dimerização inibindo sua atividade (Jaffrey e Snyder, 1996). Recentemente determinou-se a distribuição da PIN no cérebro de rato (Greenwood et al., 1997).

A iNOS ou isoforma II não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente no citoplasma de modo habitual, sendo induzida *de novo* na presença de agentes agressores como ocorre nos macrófagos e/ou outras células por lipopolisacarídeos bacterianos e/ou citocinas (Stuehr et al., 1991). Vários grupos clonaram a iNOS também em músculo liso (Teng et al., 1998), hepatócitos de camundongo (Stuehr et al., 1991) e em hepatócitos de humanos (Geller et al., 1993). Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos ou outras células ativadas, que são tóxicos para as bactérias, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis

vizinhas, sendo este mecanismo responsável por grande número de processos inflamatórios (Nathan e Xie, 1994).

A eNOS ou isoforma III é expressa constitutivamente nas células endoteliais e também é ativada por um mecanismo dependente de Ca^{2+} /calmodulina, podendo ser chamada também de cNOS ou EC-NOS (NOS endotelial-constitutiva). O gen responsável pela isoforma III foi clonado a partir de células endoteliais de boi e de humanos, confirmando o local preferencial de produção e ação (Pollock et al., 19991).

O Ca^{2+} é um importante sinalizador citoplasmático, atuando a partir de ligações com proteínas receptoras intracelulares específicas. Uma destas proteínas citoplasmáticas (Ca^{2+} -receptoras) é a calmodulina, encontrada em praticamente todas as células. Quando o Ca^{2+} se liga à calmodulina forma-se o complexo Ca^{2+} /calmodulina. Quando a concentração de Ca^{2+} intracelular diminui, desfaz-se o complexo da Ca^{2+} /calmodulina e a atividade enzimática é desativada.

| Nome | Abreviaturas | Classificação | Dependencia de Ca^{2+} |
|----------------|------------------------|---------------|--------------------------|
| NOS neuronal | bNOS (brain-NOS) | Isoforma I | sim |
| | nNOS (Neural-NOS) | Isoenzima I | |
| NOS induzível | iNOS (induceble-NOS) | Isoforma II | não |
| | macNOS (macrophageNOS) | Isoenzima II | |
| NOS endotelial | eNOS (endothelial-NOS) | Isoforma III | sim |

Tabela 1: classificação das NOS como dependentes e independentes de Ca^{2+}

3.4- PROPRIEDADES DO NO

O NO é uma molécula pequena, sem carga e com um elétron não emparelhado, que apresenta um caráter fortemente hidrofóbico. Devido a sua condição de radical livre, o NO reage rapidamente com outras moléculas que contêm elétrons não emparelhados, como são os outros radicais livres e metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} do grupo heme). O NO pode oxidar-se parcialmente, perder o único elétron e transformar-se no cation nitrosônio $[NO^+]$, que é mais estável que o NO (Stamler et al., 1992; Butler et al. 1995). Também pode reduzir-se ganhando um elétron e formar o ion nitroxila $[NO^-]$. Este intermediário reativo pode aparecer em solução aquosa nos estados singlete (HNO) e triplete (NOH) e apresentar diversas propriedades químicas. Se em determinadas situações *in vivo* ocorre esse intercâmbio de formas singlete e triplete é matéria de debate (Miranda et al., 2000, 2003).

Embora o radical livre formado por espécies oxidativas de nitrogênio, poder ter estados de oxidação +1, +2 ou +3, a forma mais conhecida é o NO^+ com um número de oxidação de +2. Se o estado de oxidação for +1 é representado por $[NO]$, e se for +3 o cation nitrosônio $[NO^+]$ (Pagliaro, 2003 para revisão).

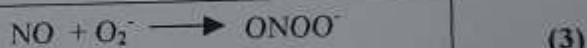
O $[NO^-]$, $[NO]$ e outros produtos de oxidação do NO podem atuar sobre outras moléculas através de reações de nitração (via $ONOO^-$, pela reação de $NO + O_2^-$) ou nitrosilação (adição de um grupo NO^+ a um grupamento heme, formando um produto nitrosil-heme). Tendo em conta que cada uma destas espécies químicas apresenta uma reatividade característica, acredita-se que a reatividade e o metabolismo do NO são influenciados pelas características do meio e as espécies químicas formadas.

Uma das reações mais conhecida do NO é sua oxidação com uma molécula de oxigênio (reação 2). Esta é uma reação trimolecular, que envolve duas moléculas do NO e uma de O_2 .

sendo lenta nas concentração fisiológica de NO. Desse modo, a velocidade de reação é linear respeito à concentração do NO. Portanto, esta oxidação pode adquirir importância nas condições fisiopatológicas em que a produção do NO aumenta. A reação se produz através de vários intermediários como o N_2O_3 , e o último produto principal, na ausência de alvos biológicos, é o nitrito (Pagliaro, 2003 para revisão).



A reação do NO com o ânion superóxido (O_2^-) forma o ion peroxinitrito [$ONOO^-$] (reação 3). A velocidade desta reação é muito alta, limitada pela difusão. O $ONOO^-$ e sua forma protonada, o ácido peroxinitroso, são por sua vez moléculas altamente reativas e capazes de oxidar irreversivelmente todas as biomoléculas. Outras reações podem levar à nitração de proteínas sobre anéis aromáticos (Gow e Ischiripoulos, 2001 para revisão).



A interação fisiológica mais importante do NO é sua ligação ao grupamento heme da sGC contendo o ion Fe^{2+} . Além disso, o NO pode unir-se a outras proteínas com grupamento heme como a hemoglobina, mioglobina e o citocromo P450. Sua ligação à hemoglobina e mioglobina provoca a transformação do NO em nitrito, sendo ambas proteínas consideradas “sequestradores ou scavengers” do NO. Outro exemplo de nitrosilação é a ligação do NO com a citocromo C oxidase (complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial). Do mesmo modo que a sGC, esta enzima é muito sensível ao NO em baixas concentrações. A ligação do NO se produz por competição com o O_2 no sítio ativo da enzima e como resultado, há uma inibição

reversível da enzima. Postula-se que mediante este mecanismo o NO regule o consumo de oxigênio celular e permita sua adaptação as mudanças do ambiente (Clementi et al., 1995).

A ligação entre uma proteína e NO através de um grupo tiól (RS-NO) pode derivar da formação de uma ligação dissulfeto (RS-SR) ou formação de um ácido sulfênico (RS-OH). Os três tipos de ligação são reversíveis mediante uma reação de oxido-redução (Stamler et al., 1992).

A interação do NO com grupos tióis pode ter várias funções fisiológicas na célula. Por um lado, vários autores consideram que a nitrosilação/desnitrosilação pode significar um mecanismo fisiológico de regulação da função protéica (Simon et al., 1996). De fato vários autores substituíram o termo S-nitrosilação por S-nitrosilação por analogia a outros termos de modificação pós-translacional de proteínas (por exemplo: fosforilação, miristoilação) (Simon et al., 1996). Outro exemplo de agente antioxidante capaz de S-nitrosilar-se é a glutathiona. Demonstrou-se que a produção intracelular aumentada de glutathiona em neurônios bloqueia a toxicidade produzida pelo NO (Hermann, 2003 para revisão). Um terceiro papel da formação de compostos S-nitrosilados é o aumento da meia vida do NO pois evita a oxidação com o O₂. Os nitrosotióis poderiam, portanto, atuar como "armazenadores" e sistemas de transporte do NO (Gaston et al., 1993; Kluge et al., 1997).

3.5- DOADORES DO NO

A maior apreciação dos papéis do NO em numerosos processos fisiológicos tem ocorrido com a utilização de doadores de NO e sua aplicação em estudos farmacológicos. Quando se aplicam os doadores do NO em sistemas biológicos, mimetiza-se as respostas do NO endógeno. No entanto, em função da espécie química de NO que é liberado (NO⁺, NO⁻ e NO[•])

se produz importantes diferenças na reatividade dos doadores do NO e o tipo de produto secundário formado (Vidwans et al., 1999)

Existe diferentes classes de doadores do NO, e suas ações sobre sistemas biológicos variam muito em função das características de cada composto:

- i) A via de liberação do NO (enzimática ou não enzimática)
- ii) A velocidade de liberação do NO.
- iii) A espécie química de NO liberado.
- iv) As susceptibilidades às condições do tratamento (pH, aerobioses, estados de óxido-redução, luz, temperatura, etc)
- v) Além disso, já que a reação do NO com o O₂ depende de sua concentração, as mesmas quantidades absolutas do NO liberado em um período de tempo podem gerar espécies oxidadas de NO em graus distintos.
- vi) O número de reações paralelas como a nitração ou nitrosilação de moléculas pode variar.

O nitroprusiato de sódio (SNP) é um complexo inorgânico no qual o NO liberado é a forma NO⁻. Seu uso está limitado na clínica pelo fato de que a decomposição para liberar a molécula de NO produz como metabolito o cianeto, que é citotóxico (Feelisch, 1998). O mecanismo de liberação do NO por este doador é todavia desconhecido. Sua decomposição não é espontânea e requer a irradiação com luz ou a perda de um elétron. Em sistemas biológicos, a liberação do NO é dependente de seu contato com os tecidos e parece ser mediado por proteínas ligadas à membrana (Kowaluk et al., 1992). A presença de nucleófilos e agentes redutores (tióis, aminas, ascorbato) podem afetar de forma considerável a cinética

de liberação do NO a partir do SNP. De modo geral, sua decomposição aumenta em presença de tióis, mas esse efeito não é linear e em presença de concentrações altas de tióis, a liberação do NO diminui (Feelisch e Stamler, 1996 para revisão).

O doador de NO S-nitroso-N-acetilpenicilamida (SNAP), pertence à família dos S-nitrosotióis. Compostos desta família têm sido detectados *in vivo* (exemplo: S-nitrosoglutationa) e pode mediar as respostas atribuídas ao NO. Em solução fisiológica, a liberação do NO a partir do (SNAP) é relativamente rápida e espontânea. Sua estabilidade em solução varia em função da temperatura, pressão de oxigênio, presença de nucleófilos, espécies oxido-redutoras e metais. Demonstrou-se que sua decomposição é catalizada por Cu^{2+} e Fe^{2+} e diferenças na concentração destes cátions podem ser responsáveis por grandes variações na estabilidade destes compostos (Feelisch e Stamler, 1996 para revisão). A exposição à luz, especialmente UV, ativa a sua decomposição. Dependendo das condições de oxido-redução do meio, os nitrosotióis liberam $[\text{NO}^\cdot]$, $[\text{NO}^-]$ ou $[\text{NO}^+]$. Uma reação importante entre os nitrosotióis é a transnitrosilação, isto é, a transferência do grupo nitro do nitrosotiol para outra molécula com grupos tióis. O intercâmbio de grupos NO entre várias biomoléculas (cisteína, albumina, glutatona) tem sido demonstrado por diferentes pesquisadores (Meyer et al., 1994). A reação de transnitrosilação acontece entre o SNAP e o glutatona, com uma constante de equilíbrio que favorece a S-nitrosoglutationa (Singh et al., 1996).

Os NONOatos são compostos formados pela ligação de um dímero de NO a um nucleófilo através de um átomo de nitrogênio do nucleófilo. Esta família de doadores compreende vários compostos, entre os que se encontram dietilaminaNONOato (DEA/NO), esperminaNONOato (SPER/NO) e dietilenetriaminaNONOato (DETA/NO). Ao decompor-se, estes compostos liberam até dois radicais de NO por molécula e o nucleófilo original. A

geração de NO a partir destes compostos é espontânea e influenciada pelo tipo do nucleófilo que forma o NONOato, o pH e a temperatura. No entanto, a sua decomposição não é catalizada pelas biomoléculas presentes no meio (tióis, albumina). Estas características fazem que, diferentemente de outros doadores do NO, a eficácia biológica dos NONOatos seja previsível a partir de sua taxa de decomposição *in vitro*. Em condições fisiológicas, a sua estabilidade depende de sua estrutura, podem desenhar-se NONOatos de acordo com o perfil de liberação desejado e com vários tempos de decomposição variáveis entre 1 minuto e vários dias. Assim, a meia vida a pH e temperatura fisiológica de DEA/NO, SPER/NO e DETA/NO são 2 min., 39 min. e 20 horas, respectivamente (Feelisch e Stamler, 1996 Para revisão).

3.6- DIFUSÃO DO NO E SUA ESFERA DE AÇÃO

Em solução tampão a pH fisiológico e em condições normais a vida média do NO é de 30 segundos e sua distância de difusão radial é de 540 μm . No entanto, no sangue, estes valores diminuem respectivamente a 1 segundo e 100 μm (Kelm e Schrader, 1988). Estas distâncias são consideráveis se temos em conta as dimensões do neurônio e demais elementos nervosos do cérebro; de fato, uma distância de 100-150 μm em um neurônio abrangeria numerosas sinapses e fibras.

É possível que o NO se mantenha mais tempo no espaço ou nos processos sinápticos que um neurotransmissor clássico porque: a) Não é removido do espaço sináptico por ação de enzimas b) a vida média do NO nos sistemas biológicos (6 a 8 segundos em solução tampão pH 7.4 equilibrado com O₂ 95% e CO₂ 5% é relativamente prolongada, sobretudo se comparado com a duração da corrente sináptica mediada pelos receptores ionotrópicos que são do ordem de décimos de mili-segundos. (Gryglewski et al. 1986).

3.7- O RECEPTOR BIOLÓGICO ESSENCIAL DO NO: A GUANILATO CICLASE SOLÚVEL.

O receptor biológico para o NO mais estudado é a Guanilato Ciclase solúvel (sGC). No SNC, esta enzima apresenta uma distribuição diferencial, sendo relativamente abundante no estriato, núcleo accumbens, substância negra (Hoffman et al., 1977), neocórtex, cérebro (Ariano et al., 1982), bulbo olfatório e algumas zonas do tronco encefálico (Furuyama et al., 1993).

A ativação da sGC pelo NO causa um aumento da concentração intracelular de GMPc a partir de GTP (Schmidt et al. 1993). O monóxido de carbono (CO) pode ter um efeito semelhante ao NO em ativar a sGC, mas são necessários mais estudos para esta caracterização (Schmidt et al. 1992, Pineda et al., 1996).

Tem-se descrito três ligantes específicos para o GMPc com importância neurobiológica: a) Ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) (Wang e Robinson, 1997); b) Fosfodiesterases ativadas ou inibidas por GMPc e c) canais iônicos da membrana plasmática (Vincent, 1994).

Com as ferramentas farmacológicas de hoje é possível atuar em diversos níveis do mecanismo celular da ação do NO. A administração de NO puro em tecidos biológicos é difícil, sendo por isso utilizados doadores de NO (SNAP, GSNO, DETA/NO, etc). Da mesma forma a ação dos doadores de NO pode modificar-se ao serem aplicadas substâncias inibitórias da cascata de GMPc. Assim, foram sintetizadas moléculas que inibem de forma específica a sGC bloqueando a ação do NO, como por exemplo o ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-alquinoxalina-1-one), (Wu e Dun, 1996). No entanto, análogos de cGMP permeáveis à membrana como 8-Br-cGMP mimetizam as ações do NO (Pineda et al., 1996).

3.8- ALVOS CELULARES DE AÇÃO DO NO

É relevante que muitos dos compostos com os quais o NO se combina tenham ações na regulação das funções celulares. A capacidade de reação do NO com diversas moléculas confere a importância de participar em uma grande variedade de processos biológicos.

3.8.A- HEMOPROTEINAS:

Uma propriedade química destacável do NO é sua capacidade de reação rapidamente e de forma reversível com o íon Fe^{2+} do grupamento prostético heme de distintas metalproteínas (Radi, 1996a). Este é o mecanismo de ação do NO sobre a sGC (Arnold, 1977; Miki, 1977). Interessantemente, o NO reage com os grupos heme da oxihemoglobina e mioglobina mas de forma irreversível (Kelm e Schrader, 1990; Butler et al., 1995). Estas substâncias funcionam maioritariamente como "scavengers" ou sequestradores do NO (Gillespie e Sheng, 1989b). O fenómeno também ocorre na autoregulação do NO, ao ligar-se ao grupo heme da NOS inibindo sua atividade em condições experimentais (ver 3) (Rogers e Ignarro, 1992; Mayer et al., 1994).

3.8.B- GRUPOS Fe-S:

O NO tem muita afinidade por grupos que contêm ligações Fe-S na sua estrutura, formando Fe-S-NO de forma irreversível, ou da mesma forma com as enzimas proteases da mitocôndria que são inibidas (Radi et al., 1994; Cassina e Radi, 1996), este é o mecanismo subjacente proposto para o efeito citotóxico do NO sobre as células tumorais. De maneira similar, é um inibidor de várias oxidases, oxigenases e citocromo C (Butler et al. 1995). Este mesmo tipo de atividade química regula a proliferação celular, causando efeito citostático em células tumorais, ao atuar sobre a síntese de DNA através da inibição da ribonucleotídeo redutase (Butler et al. 1995; Gross and Wolin, 1995).

3.8.C- NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS:

O NO tem a potencialidade de reagir com grupos tióis (SH) de moléculas proteicas de diferentes funções celulares, tais como receptores e/ou enzimas (Stamler et al., 1992), Montague et al. 1994). Por exemplo, a nitrosilação de grupos tióis do receptor tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) dessensibiliza o receptor e inibe a excitotoxicidade celular (Lei et al. 1992).

A ligação entre uma proteína e NO através de um grupo tiól (RS-NO) pode derivar da formação de uma ligação disulfeto (RS-SR) ou formação de um ácido sulfênico (RS-OH). Os três tipos de ligação são reversíveis mediante uma reação de óxido-redução (Hogg, 2000). Outros alvos susceptíveis de S-nitrosilação são as proteínas P21 Ras e caspase-3, o receptor de rianodina e a proteína G (Gow and Ischiropoulos, 2001 para revisão). Outra função atribuída às reações de S-nitrosilação é a eliminação do excesso do NO no meio intracelular. Por exemplo, a ligação do NO à metalotioneína, proteína com um alto conteúdo de resíduos cisteína, é considerada um possível mecanismo de sequestro do NO, que poderia evitar seus possíveis efeitos neurotóxicos (Hogg, 2002).

3.8.D- ADP-RIBOSILAÇÃO:

NO é capaz, por sua vez, de ativar a ADP-ribosilação de proteínas solúveis usando como cofactor o NADPH. Esta ativação é independente da sGC, já que nem o dibutilil nem o 8-Br-GMPc (análogos de GMP-cíclico) são efetivos para ativar a ADP-ribosilação (Brüne e Lapetina, 1989; Brüne et al., 1994). A Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase é o principal alvo de ADP-ribosilação induzida pelo nitroprussiato de sódio (Kots et al., 1992). Ao nível

neuronal, esta reação é neurotóxica *in vitro*, por envolverem mecanismos de redução dos depósitos energéticos da célula (Dawson e Dawson, 1995a)

3.8.E- ÂNION SUPERÓXIDO:

A reação do NO com o ânion superóxido forma peroxinitrito (ONOO^-), uma molécula reativa e tóxica para a célula. Demonstrou-se que ONOO^- pode se decompor em radicais livres tóxicos e em dióxido de nitrogênio (N_2O_2) (Alvarez et al., 1995; Radi, 1996b; Denicola et al., 1995, 1996). A enzima superóxido dismutase (SOD) ao converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio prolonga a meia vida do NO em sistemas biológicos (Gryglewski et al., 1986) o que possibilita a utilização desta moléculas nos trabalhos experimentais como reguladores do ânion superóxido (Bredt e Snyder, 1989).

3.8.F- NITRAÇÃO:

Por último, a formação de nitrotirosina tem sido demonstrada em algumas doenças inflamatórias, neurodegenerativas e arterioescleróticas (Beckman., 1996). Embora a nitração de proteínas tenha sido usada como indicativo da produção de peroxinitrito, também pode ocorrer por outras vias independentes de peroxinitrito, por exemplo na formação de clorureto de nitrila (NOCl) pela ação da mieloperoxidase em processos inflamatórios (Eiserich et al., 1998).

A nitração de proteínas pode alterar a conformação e estrutura das proteínas, sua atividade catalítica e/ou sua susceptibilidade para a digestão (Castro et al., 1994). Demonstrou-se também que a nitração dos anéis de tirosina na proteína pode diminuir a efetividade das proteínas como substrato das tirosina cinases (Wink et al., 1997). Portanto, através da nitração de proteínas pode-se efetivar o efeito tóxico do NO, que participa na interrupção dos

processos de sinalização celular e que tem caráter aparentemente irreversível, embora já se tenha descrito recentemente atividade desnitrase em alguns tecidos. (Kamisaki et al., 1998).

3.9 ÓXIDO NÍTRICO E NEUROTRANSMISSÃO

A descoberta do NO como mensageiro intercelular gerou novos conceitos a respeito de como se pode induzir a plasticidade sináptica no SNC (Hölscher, 1997). Existem evidências experimentais de que o NO pode modificar a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos a um determinado neurotransmissor. Por exemplo, em experimentos *in vitro* a adição de SNP ou DETA-NO provocou uma diminuição da resposta pós-sináptica ao glutamato em neurônios mesopontinos (Leonard et al., 1995). Isto é conhecido pela nitrosilação de grupos tióis das moléculas que constituem o canal ionotrópico do receptor NMDA (Lei et al., 1992). Na mesma sinapse, o NO determina uma diminuição da liberação do neurotransmissor que se evidencia por uma diminuição na probabilidade de ocorrência de potenciais pós-sinápticos excitatórios únicos e maiores (Bredt et al. 1991).

No sistema oculomotor, a inibição da NOS no núcleo hipoglosso, resulta em um severo nistagmo contralateral (Moreno-Lopez et al., 1996). O aumento local de NO ou GMPc produz nistagmo ipsilateral, indicando que um sistema nitrérgico estaria envolvido no controle dos movimentos oculares. Abudara e colaboradores em 1998, mostraram evidências morfológicas da existência de fibras nitrérgicas que inervam os núcleos motores do tronco cerebral. No núcleo motor do trigêmeo, a presença destas fibras sugere uma transmissão direta entre terminais pré-sinápticos nitrérgicos e motoneurônios pós-sinápticos, nas quais não se vê detecção da NOS. A partir dessa evidência morfológica, surgiu a pergunta de se o NO atuaria como neurotransmissor anterógrado. Estudos *in vitro* das propriedades elétricas dos

motoneurônios do nervo trigêmio após adição de distintos doadores de NO mostraram que o NO determina um aumento da excitabilidade dos motoneurônios (Abudara et al., 1998). Estes dados são importantes porque sugerem que o NO tem um efeito excitatório no neurônio pós-sináptico.

Além dos dados descritos anteriormente, existem também evidências de efeitos nitrérgicos pós-sinápticos excitatórios em neurônios do locus coeruleus. A aplicação de doadores de NO produz um aumento na frequência de descarga, associada a um aumento de uma corrente de tipo I_h (Pineda et al, 1996).

Na atualidade, o NO está envolvido em processos de plasticidade sináptica como a potenciação e a depressão de longo termo (LTP e LTD respectivamente) (Bohme et al., 1991; Shibuki e Okada, 1991). A LTP consiste em um aumento prolongado na eficácia sináptica que se produz após um estímulo de alta frequência (estimulação tetânica) na via pré-sináptica. Quando se administra inibidores da NOS em fatias de hipocampo, tentativa de induzir a LTP foram bloqueadas (Bohme et al., 1991). A administração de hemoglobina que sequestra o NO atenua a LTP (Schuman e Madison, 1994).

3.10- ÓXIDO NÍTRICO NA RETINA

Na retina de vertebrados, foram descritas células responsivas ao NO endógeno, sugerindo que o NO reforçaria os efeitos dos estímulos visuais (Koistinaho e Sagar, 1995).

Na retina de coelho, foram identificados por imunohistoquímica a NOS e 5HT nas populações de células amácrinas, na margem interna da INL, e seus prolongamentos dendríticos na subcamada mais externa da IPL (Koistinaho et al., 1993). Na retina de peixe, a NOS foi detectada no segmento externo do cone, células horizontais H1 e na camada de células gliais (Weiler e Kewitz, 1993). Na espécie *Columbia livia* (pomba) Sato em 1990,

relatou uma imunomarcção positiva para células amácrinas na camada INL, que mostrou-se densamente marcada para atividade de NADPH-d.

Evidências recentes mostraram que a atividade de NADPH-d coexpressa com outros neurotransmissores em neurônios do SNC, como por exemplo, na retina de coelho, onde GABA e NADPH-d colocalizam em células amácrinas (Koistinaho e Sagar, 1995), e na retina de peixe onde GABA e NADPH-d colocalizam nas células horizontais H1 (Weiler e Kewitz, 1993). Nos neurônios espinhais de rato, NADPH-d coexpressa com GABA, Acetilcolina e Glicina (Spike et al., 1993).

A identificação de NOS em duas subpopulações distintas de células amácrinas na retina de rato sugeriu sua interação com sinapses gabaérgicas em células ganglionares, pois essas células expressam canais iônicos regulados por GMP cíclico (Chun et al., 1998).

O NO está envolvido na eliminação de sinapses retinotectais no sistema visual de pinto, pois sua redução em um período crítico para o refinamento dessas sinapses resultou em persistência das sinapses ipsolaterais (Wu et al., 1994). Na retina, a enzima se localiza em vários tipos celulares incluindo células do epitélio pigmentar (Bredt et al., 1990; Goureau et al., 1993), células amácrinas, ganglionares (Dawson et al., 1991; Koistinaho et al., 1993; Yamamoto et al., 1993a) e fotorreceptores (Yamamoto et al., 1993b). As células de Müller expressam no rato a forma de NOS induzida após tratamento com LPS bacteriano, interferon- γ ou fator de necrose tumoral (Dighiero et al., 1994).

A presença da NOS-neuronal e caracterização do sistema do NO foi previamente demonstrada na retina de pinto, tanto pela medida da NADPH-d (De Faria, et al., 1996) quanto pela medida da conversão de ^3H -arginina em ^3H -citrulina (Paes de carvalho e Mattos, 1997).

Vários análogos de L-arginina, ou substratos da NOS-neuronal, demonstraram diferentes graus de inibição da NADPHd em homogenados de retina de pinto (de Faria et al., 1996)

Em trabalhos posteriores do nosso laboratório mostrou-se que a conversão de L-arginina em L-citrulina estimulada pelo glutamato era inibida por análogos de L-arginina e antagonistas do receptor NMDA (Paes de Carvalho e Mattos, 1997).

Dados recentes mostram um fortalecimento do sistema de sinalização do NO através da disponibilização de L-arginina pela glia aos neurônios que contêm a NOS-neuronal, mostrando um sistema de transporte de L-arginina dependente de sódio e cálcio em células gliais em cultura (Cossenza e Paes-de-carvalho, 2000).

3.11- PAPEL NEUROPROTETOR DO NO

Em muitos estados patológicos, o NO pode ser considerado como um mediador importante. Assim, como o oxigênio molecular (O_2), o NO se comporta como uma faca de dois gumes, provê vida mais também mata. Este efeito paradoxal foi relatado no SNC por seus papéis tanto citotóxico (Hibb et al., 1988, Radi et al., 1994), como neuroprotetor (Ha et al., 2003).

O NO pode nitrosilar diretamente proteínas G monoméricas, como a $P21^{Ras}$, por uma modificação pós-tradução a sua função e trocando o GDP pelo GTP, com a conseqüente ativação da via das MAP cinases (Lander et al., 1995; Deora et al., 2000), que são proteínas chaves envolvidas na proliferação, crescimento e diferenciação celular.

Além dos proeminentes papéis na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e a modulação da comunicação célula-célula no cérebro, estudos recentes *in vivo* demonstraram que o NO é um importante antioxidante. O NO bloqueia a geração de radicais hidroxila (OH^{\cdot}), produzido

pelo estresse oxidativo em combina com o ion ferro via reação Fenton (Kanner et al., 1991), ou inibindo os residuos cisteina das proteases (Kim et al., 2000)

Em suma, a reatividade basal do NO, inibe fortemente a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 e OH^{\cdot} convertendo-os em formas menos reativas como nitrito ($NO^{\cdot} + O_2^{\cdot-} \Rightarrow ONOO^{\cdot} \quad NO_3^-$) e nitratos ($OH^{\cdot} + HO^{\cdot} \Rightarrow HONO \quad NO_2^-$) (Pagliaro, 2003 para revisão). Transportadores aniônicos no cérebro rapidamente eliminam estes metabólitos mas, em concentrações milimolares, esses radicais são altamente tóxicos em cultura de células (Hogg, 2002 para revisão).

O NO pode proteger da morte por apoptose induzidas por estresse oxidativo em alguns tipos celulares (Kim et al., 1999), através de diversos estímulos como TNF- α (Know et al., 2000), e por privação ou retirada de fatores tróficos ou glucose (Kim et al., 1999).

O mecanismo bioquímico dos efeitos neuroprotetores do NO pode depender do tipo celular e das vias de sinalização envolvidas na interação (figura 8). Por exemplo, a via clássica NO/GMP cíclico bloqueia a apoptose em hepatócitos (Kim et al., 1999), células PC12 neuronais (Ha et al., 2003), neurônios motores embrionários (Estevez et al., 1998), linfócitos B (Genaro et al., 1995), eosinófilos (Hebestreit et al., 1998) e foliculo ovariano (Chun et al., 1995). No entanto, alguns estudos mostram uma via de neuroproteção independente do sistema NO/GMP cíclico (Sata et al., 2000).

Em hepatócitos, células PC12 neuronais e na linhagem celular U937, os efeitos neuroprotetores do NO estão associados com a produção de GMP cíclico, bloqueando a liberação de citocromo-c da mitocondria (Ha et al., 2003), geração de ceramida e a ativação de caspases (De Nadai et al., 2000).

NO e GMP cíclico protegem da morte por apoptose em linfócitos B de baço aumentando a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Genaro et al., 1995) e também em células ganglionares corticais de rato (Ciani et al., 2002). A ativação da via PI3 cinase/ AKT, por sua vez, induz a fosforilação de Bad e procaspase-9, assim como a expressão de genes neuroprotetores através de ativação da NF- κ B e CREB (Ciani et al., 2002; Li et al., 1995).

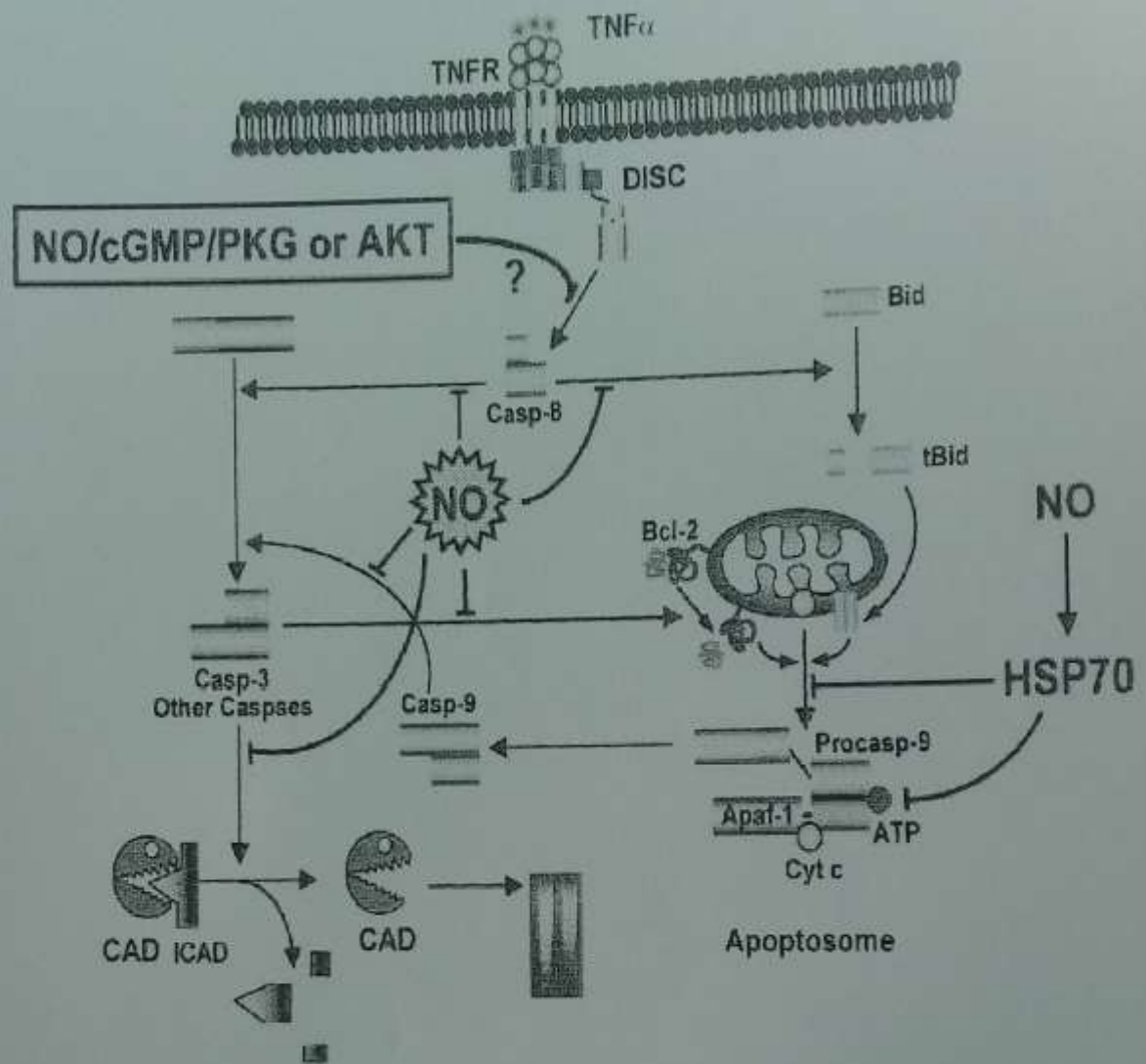


Figura 8: Modelo esquemático demonstrando o envolvimento da via NO/GMPc/PKG na inibição da apoptose. Note a participação direta ou indireta do NO na inibição das caspases. (\vdash). (Chung, et al., 2001).

4. OBJETIVOS

Em trabalhos anteriores do laboratório mostrou-se que a atividade da NOS-neuronal é mais alta em estágios precoces do desenvolvimento da retina de embrião de pinto, sendo que o pico de ativação corresponde a E8 e diminui proporcionalmente com o desenvolvimento (Paes de Carvalho e Mattos, 1997). Outros trabalhos mais recentes haviam também mostrado que neurônios de retina em cultura sofrem morte celular após a troca de meio ou à exposição ao glutamato (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001). Embora o meio BME não possua glutamato em sua composição, a troca de meio produz o mesmo efeito de morte celular, na ausência de glutamato (1mM), em cultura purificada de neurônios, sendo ambos efeitos tóxicos bloqueados por tratamentos com adenosina (Ferreira et al., 2003). Uma explicação para o efeito da troca de meio seria a produção de um tipo de estresse celular com concomitante produção de radicais livres que por sua vez levariam a um desbalanço de proteínas e ativação de cascatas intracelulares envolvidas na sobrevivência celular.

Assim, os objetivos principais se concentraram em:

- Estudar a expressão da proteína Óxido Nítrico Sintase neuronal (NOS-neuronal) durante o desenvolvimento da retina.
- Caracterizar a ação neuroprotetora do óxido nítrico (NO) sobre a morte celular induzida pela troca do meio das culturas purificadas de neurônio.
- Investigar o mecanismo pelo qual o NO estaria exercendo esse efeito neuroprotetor sobre as células neuronais.
- Estudar o tipo de morte celular desencadeada nos neurônios pela troca de meio.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- MATERIAIS

5.1.A- MATERIAL BIOLÓGICO:

Neste trabalho foram utilizados ovos de galinha fertilizados da espécie *White Leghorn* de oito dias embrionários (E8), os quais eram obtidos de uma granja local e incubados a 38° C em uma atmosfera úmida até sua utilização.

5.1.B- REAGENTES

* MATERIAIS DE CULTURA:

O meio Basal de Eagle (BME), tripsina e Poli-L-oritina foram obtidos da Sigma. Soro fetal Bovino (SFB) da Life Technologies. Placas de cultivo de 40 mm da TPP (Suíça). Sulfato de estreptomicina, Penicilina G e L-glutamina da Sigma. Os meios e as soluções eram preparados com água Milli-Q (Millipore) e foram esterilizados por filtração utilizando filtros de acetato de celulose de 0.2 µm de tamanho do poro (Whatman).

* DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO:

Os doadores de óxido nítrico (NO⁺) (SNAP e GSNO) foram obtidos da SIGMA/RBI Chem. CO (St. Louis, Mo, USA). As soluções dos doadores foram preparadas imediatamente antes de serem utilizadas. SNAP e GSNO foram dissolvidas em água e protegidas da luz para evitar sua decomposição.

* OUTROS REAGENTES:

S-Nitrobenzil-6-tioinosina (NBI), DMSO, 1h-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3,a] quinoxalina-1 (ODQ), wortmannin, nifedipina, PD98059, zaprinast, LY83583 foram obtidos da SIGMA/ RBI Chem. Co. (St. Louis MO USA). KT5823, PTIO e LY294002 da Calbiochem (San Diego, Ca. USA), o anticorpo policlonal contra a NOS-neuronal pelo Dr. V. Riveros-Moreno (Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, U.K.). Este anticorpo reconhece a sequência de aminoácidos 519-540 (LPLLLQANGNDPELFQIPPELC), da enzima NOS-n de rato). O padrão de peso molecular (10-220 Kd) foi obtido de Life Technology (Invitrogen). O anticorpo HRP-conjugado secundário da Amersham. Os demais reagentes para tampões e outras soluções eram de pureza analítica.

5.2- MÉTODOS

5.2.1 DISSECCÃO E PREPARAÇÃO DE HOMOGENEIZADOS DE RETINA

Embrões de galinha em diversos estágios de desenvolvimento foram transferidos do interior dos ovos para placas de Petri, à temperatura ambiente, onde sofriam o processo de decapitação. Após a decapitação, promovia-se a retirada dos olhos através da ruptura do nervo óptico, e os mesmos eram colocados em outra placa de Petri contendo salina sem Ca^{+2} e Mg^{+2} (CMF) gelada. Em seguida era feito um corte na parte superior do olho, retirava-se o cristalino e o vítreo com o auxílio de uma pinça; seguidamente eram feitos dois cortes na parte posterior do olho e então a retina se deslocava do epitélio pigmentar, sendo promovida sua retirada.

Em estágios embrionários de E8 até por volta de E15, as retinas eram facilmente removidas; em estágios mais avançados como por exemplo E17 e E19, era necessário pinças

muito delicadas para remover o epitélio pigmentar que se encontrava fortemente aderido à retina. Em animais do período pós-eclosão, o deslocamento do epitélio pigmentar era facilitado por um artifício técnico muito simples, que consistia em deixar a cabeça do pinto em repouso por 5 ou 8 minutos em CMF após a decapitação, antes de ser feita a remoção dos olhos. As retinas eram então lavadas em CMF gelado, transferidas para um homogeneizador de vidro contendo o meio de homogeneização, imerso sempre em gelo na proporção de 4 retinas/mililitro. A homogeneização mecânica se processava através do atrito de um pistilo de vidro contra as paredes do homogeneizador por cerca de 20 vezes. A seguir, as amostras assim obtidas eram fervidas por 10 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 15.000 RPM a 4°C em centrífuga Eppendorf.

5.2.2- DOSAGEM DE PROTEINA:

A quantidade de proteína total presente no homogeneizado era medida pela execução do método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão a Albumina de Soro Bovino (BSA).

5.2.3- IMUNOBLOT DA NOS-n

As amostras eram submetidas a eletroforese em gel SDS/PAGE 90%. Após a separação das proteínas o gel era justaposto a uma de membrana PVDF e as proteínas transferidas à 96 Volts durante 1 hora, em tampão de transferência contendo 10% de metanol.

Depois da transferência, as membranas eram coradas com solução de Ponceau para visualização das proteínas. Em seguida, eram lavadas com TBS e submetidas ao procedimento de imunomarcagem contra a NOS-neuronal.

Para imunomarcação, as membranas eram submetidas a um bloqueio de sítios inespecíficos com solução TBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico), por 1 hora. Seguidamente as membranas eram lavadas em TBS-T e incubadas com anticorpo policlonal (de rato) na diluição de 1:1000 em solução TBS-T, 5% de leite, por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens por 10 minutos com TBS-T, as membranas eram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG Horseradish-conjugado peroxidase na diluição de 1:5000 em TBS-T 5% de leite. A marcação do anticorpo nas membranas era visualizada através de ensaio de quimioluminescência (ECL-plus da Amersham) utilizando revelador e fixador GBX da Kodak.

5.2.4- CULTURA PURIFICADA DE NEURÔNIOS:

Retinas de embrião de pinto no oitavo dia de desenvolvimento embrionário (E8) foram preparadas como descrito anteriormente (Stenkamp et al., 1994). Resumidamente, as retinas eram dissecadas livres de outros tecidos em uma solução salina de CMF a 37 °C, e incubadas por 10 minutos em tripsina 0.2%. A dissociação das células era feita em solução de BME (1mL) contendo 5% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina, utilizando uma pipeta Pasteur previamente afilada por 20 vezes. À suspensão de células se acrescentava 7.5 mL de BME sem soro e procedia-se à contagem das células. A densidade celular foi de aproximadamente 8×10^5 células/ placa. As células foram semeadas em placas de cultivo de 40 mm de diâmetro, contendo 1.3 mL de BME 5 %, as quais eram previamente tratadas com Poli-L-ornitina em tampão borato pH 8.4. Seguidamente as placas de culturas foram mantidas pelo período desejado dentro do dessecador a 37 °C em uma atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de ar.

5.2.5- TRATAMENTO DAS CULTURAS PURIFICADAS:

As drogas eram adicionadas 24 horas após o plaqueamento das células. A troca do meio era feita depois de 48 horas de tratadas e as mesmas drogas eram readicionadas ao meio. Após 72 horas as culturas eram fixadas com glutaraldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.2 M, pH 7.4 por 1 hora. Culturas controle eram incubadas em paralelo sem a troca do meio e/ou na ausência ou presença das drogas. Em alguns experimentos, utilizando-se o tratamento de inibidores, estes foram pré-incubadas 30 minutos antes de serem tratados com SNAP (100 μ M) ou 0.5 μ M de NBI (como controle positivo).

No entanto, para captação de adenosina as células foram pré-incubadas em conjunto [3 H]adenosina+SNAP ou [3 H]adenosina+NBI para serem utilizadas em E8C4, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito acima com ou sem troca de meio e controles corridas em paralelo. Depois desse tempo, as células foram lavadas e lisadas e em seguida foi determinada a radioatividade intracelular por cintilação líquida.

5.2.6- MEDIDA DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Para calcularmos o número total de células/campo, para cada situação, utilizamos um microscópio invertido de contraste de fase. A sobrevivência celular era avaliada através da contagem do número de células com neuritos ou sem neuritos o dobro do corpo celular/campo de 0.114 mm², em 5 campos escolhidos aleatoriamente.

5.2.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística dos dados foi feita com o auxílio do programa GRAPH Pad Prism. Os resultados eram apresentados como a média \pm EPM, indicando N como o número de experimentos realizados. A significância dos dados apresentados foi obtida através da análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de BONFERRONI.

6 RESULTADOS

6.1. TESTE DA FUNCIONALIDADE DO ANTICORPO POLICLONAL CONTRA A NOS- NEURONAL

Vários estudos relacionam a expressão da NOS-neuronal diretamente com o desenvolvimento pós-embriônico em modelos murinos nos quais atinge-se um pico máximo no dia pós-natal de P14 (Zhang et al., 2002). Da mesma forma, outros investigadores têm mostrado que em ratos de 4 meses de idade na região CA1 do hipocampo, a expressão da NOS-neuronal é também máxima (Liu et al., 2003). Nesse contexto, resolvemos investigar primeiramente a funcionalidade do anticorpo policlonal contra a NOS-neuronal, em amostras de cerebelo de rato de 21 dias pós-embriônico da linhagem Lister Hooded.

A sequência de aminoácidos (519-540) do anticorpo policlonal que reconhece ao domínio oxigenase da proteína NOS-neuronal apresentou uma única banda imunoreativa entre 220-130 kDa nos homogenados de cerebelo de ratos de 21 dias (figura 9). Nós observamos a imunomarcagem da NOS-neuronal ainda em concentrações menores de proteína (5µg/canaleta). Sabendo que o peso molecular da NOS-neuronal é de 155 kDa (Gwon et al., 2001), estes dados sugerem que o anticorpo policlonal reconhece especificamente a proteína NOS-neuronal em homogenados de cerebelo de rato e a técnica utilizada é adequada para a preparação e obtenção de extratos de tecido intacto para a separação de proteínas segundo seu peso molecular pela técnica de Western Blot.

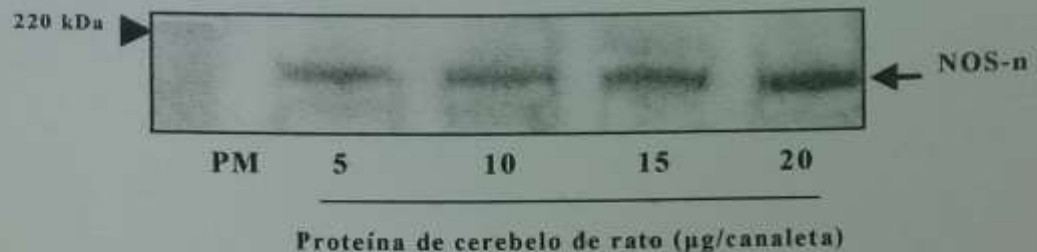


Figura 9. Funcionalidade do anticorpo policlonal contra a NOS-neuronal no homogenado de cerebello de rato P21. A diluição do anticorpo foi 1:1000; PM: Padrão de peso molecular (220 kDa).

6.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NOS-NEURONAL NA RETINA INTACTA DE EMBRIÃO DE GALINHA

Como dito anteriormente, dados do nosso laboratório demonstraram uma ativação da NOS-neuronal máxima em E-8 em retina de embrião de pinto (Paes de Carvalho e Mattos, 1997). Desse modo, utilizamos o mesmo protocolo experimental desenvolvido na primeira parte com o objetivo de caracterizar a expressão da proteína NOS-neuronal na retina intacta de embrião de pinto em diferentes estágios embrionários através da técnica de Western Blot.

A imunomarcagem do anticorpo policlonal foi também reconhecida pelas amostras de retina intacta em estágios embrionários diferentes (figura 10). A análise qualitativa das bandas mostra que os homogenados das retinas no período E8 apresentam maior marcação do que os de E-12 e E-15 respectivamente. No entanto, nenhuma diferença foi observada

entre E-8 e E-9. Além disso, observamos que a quantidade de proteína expressa da NOS-neuronal é muito menor na retina do que no cerebelo (CR).

Os dados sugerem que o anticorpo reconhece o sítio ativo da enzima NOS-neuronal em homogenizados de retina intacta. Consistente com essas observações o NO sintetizado pela NOS-neuronal apresenta importantes papéis em fases precoces do desenvolvimento embrionário da retina de embrião de pinto, pois a maior quantidade de proteína foi encontrada em E-8.

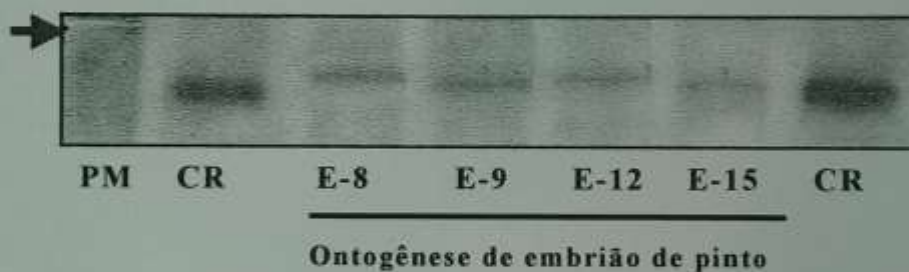


Figura 10: Expressão da proteína NOS-neuronal na retina intacta de embrião de pinto. A seta (→) assinala um peso de 220 kDa obtido a partir do padrão de peso molecular (PM). CR: controle positivo de cerebelo de rato P21(20 µg/canaleta). Da 3ª até a 6ª linha, amostras de retina intacta de embrião de pinto em estágios embrionários diferentes (80 µg/canaleta). Diluição do anticorpo: 1:1000.

6.3 EFEITO NEUROPROTETOR DE NO EM CULTURA PURIFICADA DE NEURÓNIOS

Vários trabalhos na literatura têm mostrado que o estresse oxidativo por privação de soro (24 horas) produz extensa morte celular tanto em culturas de neuroblastoma humano (Andoh et al., 2000) como em células neuronais (Ha et al., 2003). Nossos trabalhos prévios mostram que a troca de meio (um tipo de estresse celular) desencadeia morte celular em cultura purificada de 4 dias. No entanto, o pré-tratamento com adenosina bloqueia esta morte (Ferreira et al., 2001 e 2003).

Para avaliarmos melhor o papel do NO como molécula reguladora importante durante o desenvolvimento do SNC, resolvemos verificar os efeitos do NO na sobrevivência de neurônios em cultura purificada livre de células gliais. Culturas em E8C1 (24 horas após plaqueadas) foram tratadas com ou sem doadores de NO (SNAP e GSNO) nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M respectivamente, e incubadas por mais 48 horas quando o meio era trocado em presença de SNAP ou GSNO. Como mostrado na figura 11, a troca de meio das culturas E8C3 que foram tratadas com um dos dois doadores de NO e avaliadas 24 horas após da troca de meio inibiu a morte neuronal desencadeada pelo troca de meio a diferença das culturas que não foram tratadas. A degradação de SNAP em sua forma química correspondente NAP através da exposição prolongada à luz não apresenta nenhum efeito protetor em nossas culturas (NAPdegrad.). A morte neuronal desencadeada pela troca de meio foi de aproximadamente 50% em relação ao controle. Por sua vez, uma pequena morte celular foi observada ao longo dos 4 dias na situação controle, mas esta também foi bloqueada quando pré-tratadas com SNAP ou GSNO. Importante ressaltar, que nesta

condição experimental os doadores não aumentam o número celular mais sim matam o número celular plaqueadas originalmente conservando da morte natural ao longo dos 4 dias.

Embora apresentem estruturas químicas diferentes e capacidade de liberação do NO também diferentes, nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois doadores de NO.

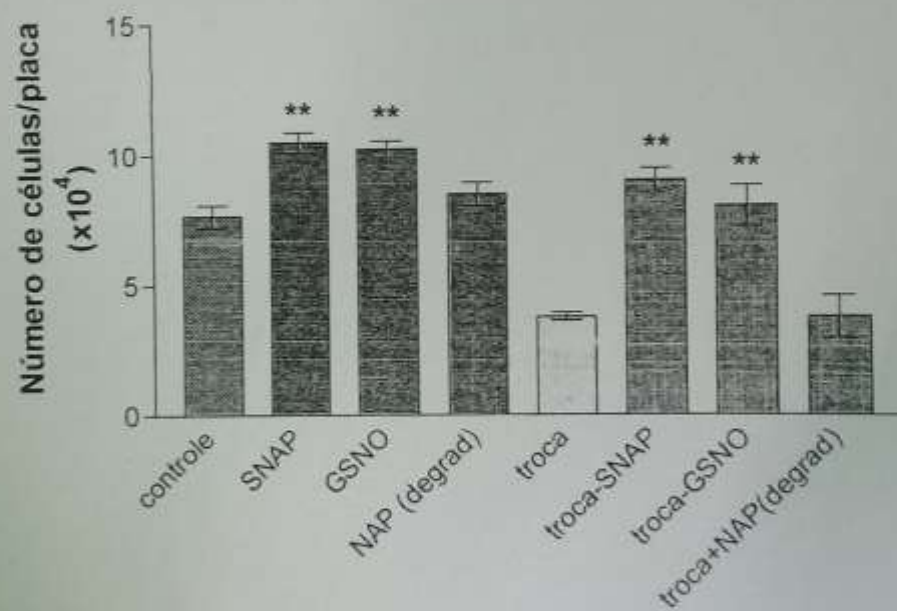


Figura 11: Efeito neuroprotetor de NO em cultura purificada de neurônios em E8C4. Culturas tratadas com 100 μ M de SNAP e 300 μ M de GSNO protegem da morte neuronal produzida pela troca de meio. Nenhuma diferença foi observada entre a morte desencadeada pela troca de meio (troca) e a troca em cultura pré-tratada com NAP(degradado). O número de células por placa ($\times 10^4$) foi determinado pela contagem aleatória num microscópio de contraste de fase invertido. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * $P \leq 0.05$ quando comparados às culturas controle. ** $P \leq 0.001$, comparados às culturas em que somente foi trocado o meio.

6.4. EFEITO DE CONCENTRAÇÃO DE NO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Com o objetivo de verificar o efeito neuroprotetor máximo do NO sobre as culturas de neurônios submetidas à troca de meio, realizamos experimentos de dose-resposta em nossas culturas (figura 12). Culturas de um dia foram tratadas com diferentes concentrações de SNAP (70, 90, 100, 120, 150, 170 e 200 μM). Observamos que na concentração de 70 μM a troca de meio não mostrou efeito significativo comparado com a troca de meio que não apresentou tratamento. Por sua vez, 100 e 120 μM de SNAP produziram bloqueio da morte celular mas não mostraram diferenças significativas entre os dois. No entanto, para uma concentração de 90 μM de SNAP, o efeito neuroprotetor foi parcial. Uma diminuição do efeito de aproximadamente 20% e 30% foi observada quando as culturas foram tratadas com concentrações de 170 e 200 μM respectivamente. Este decréscimo permaneceu ainda mais acentuado em concentrações superiores a 250 μM de SNAP (dados não mostrados). Estes dados sugerem que o NO protege da morte celular pela troca de meio a uma concentração máxima de 100 μM . Para os experimentos seguintes utilizamos tratamentos de 100 μM de SNAP.

Em seguida, investigamos a cinética temporal do NO necessário para mediar a neuroproteção. Observamos um bloqueio da morte neuronal em culturas pré-tratadas com SNAP por 24 ou 48 horas (figura 13). A pré-incubação por 12 horas promoveu um bloqueio parcial, enquanto por 6 horas ou quando o SNAP era colocada na hora da troca de meio não mostraram nenhum efeito neuroprotetor.

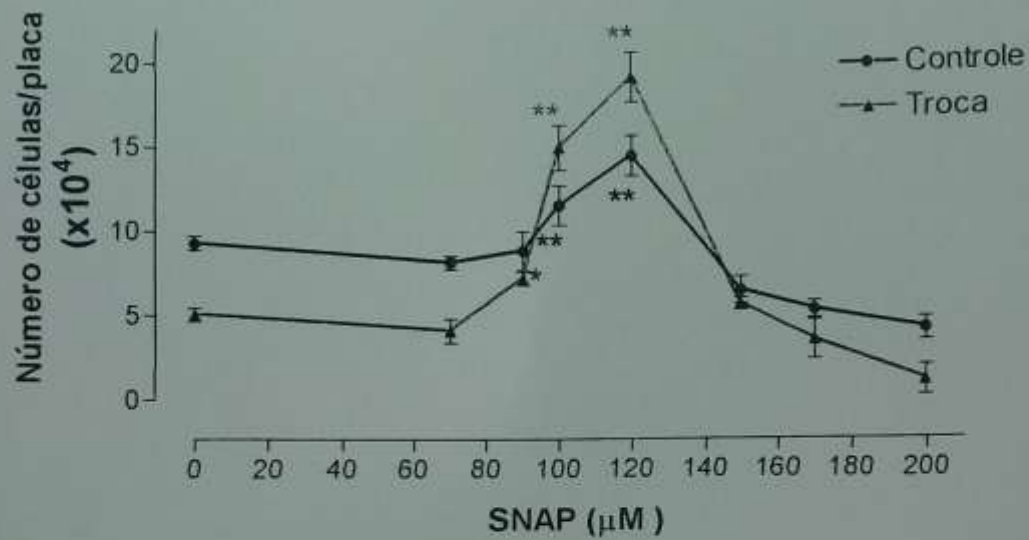


Figura 12: Curva dose-resposta de NO sobre a sobrevivência celular em cultura purificada de neurônios. Culturas de E8C1 foram incubadas com concentrações de 70, 90, 100, 120 150, 170 e 200 μM de SNAP e avaliadas em E8C4 através da contagem do número de células por placa. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. ** $P \leq 0.05$ P ** $P \leq 0.001$ quando comparados às culturas controle ou às culturas em que foi trocado o meio respectivamente e * $P \leq 0.05$ comparados com culturas em que foi trocado o meio.

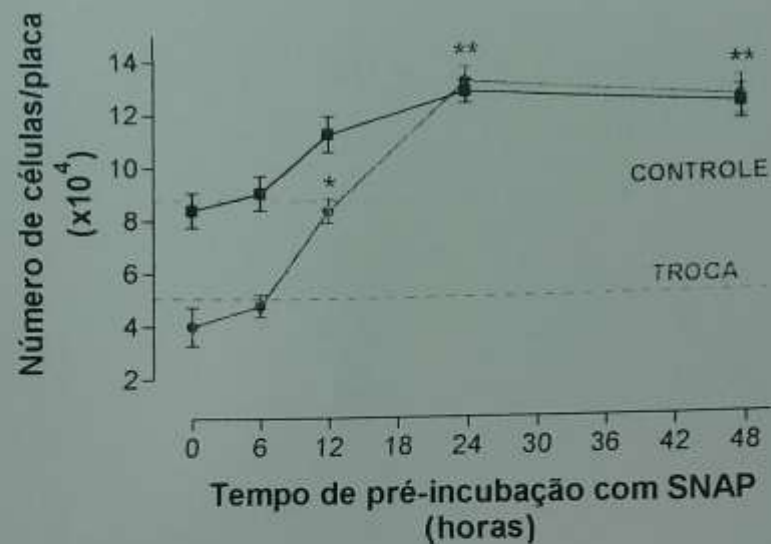


Figura 13: Curva temporal do SNAP sobre a sobrevivência celular em cultura purificada de neurônio. Culturas de E8C1 foram pré-incubadas com SNAP ($100 \mu\text{M}$) nos tempos indicados antes da troca de meio. 48 e 24 horas foram significativos em proteger da morte pela troca de meio. O número de células por placa ($\times 10^4$) foi determinado pela contagem aleatória num microscópio de contraste de fase invertido. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Os asteriscos denotam $P \leq 0.001$ comparados às culturas em que foi somente trocado o meio.

6.5. O EFEITO NEUROPROTETOR EM CELULAS NEURONAIS É EXCLUSIVO DE NO

Tem sido demonstrado que a excessiva produção de NO (estresse nitrosativo) induz a formação de peroxinitrito (ONOO^-) pela reação entre NO e ânion superóxido (O_2^-). Por sua vez, ONOO^- é reconhecido por oxidar moléculas-chave através da nitração de proteínas e produzir lesão celular ou por outro lado, mostrar um efeito neuroprotetor (Garcia Nogales et al., 2003). Para verificar a participação direta do NO em nossas culturas purificadas e descartar a participação de peroxinitrito como neuroprotetor, resolvemos investigar o efeito de ácido úrico, um "scavenger" de ONOO^- , ou PTIO, um scavenger de NO. Culturas purificadas de células neuronais foram incubadas com $0.5 \mu\text{M}$ de ácido úrico (AU) ou $50 \mu\text{M}$ de PTIO, concentrações que não produzem morte celular, 30 minutos antes de serem tratadas com SNAP ($100 \mu\text{M}$). Como observado anteriormente, NO bloqueou a morte pela troca de meio e o seu seqüestro com PTIO inibiu este efeito na sobrevivência (figura 14).

Em contraste, o ácido úrico não bloqueou o efeito neuroprotetor de NO em nossas culturas, sugerindo que o NO liberado pelo SNAP na forma (NO^+), uma forma muito conhecida do cátion nitrosonio liberada pelo SNAP (Vidwans et al., 1999) é a molécula chave em induzir bloqueio da morte pela troca de meio. Por outro lado, o estresse celular deveria produzir radicais livres como peroxinitrito, radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mas o AU sozinho a concentrações maiores ($2 \mu\text{M}$) não protegeu a morte desencadeada pela troca de meio (dados não mostrados). O que sugere mais ainda um papel

antioxidante do NO na regulação da morte celular em nossas culturas e provavelmente o ONOO não esteja envolvido neste tipo de morte celular produzida pela troca de meio.

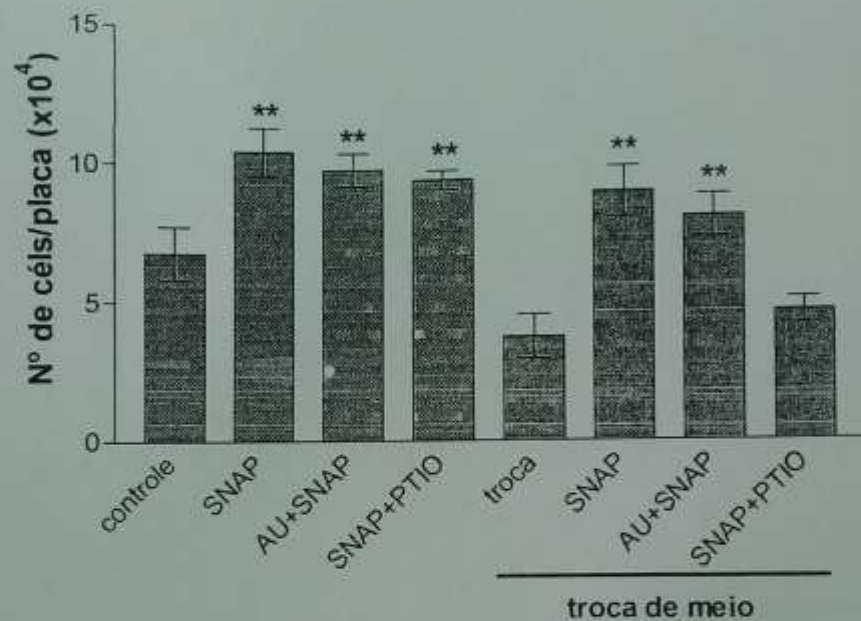


Figura 14: A regulação da sobrevivência celular é exclusiva do NO⁻. Culturas de 1 dia foram pré-incubadas com PTIO (50 μM), “scavenger” de NO, 30 minutos antes de serem tratadas com SNAP (100 μM) ou 0.5 μM de Acido úrico (AU), “scavenger” de peroxinitrito (ONOO). Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ** P ≤ 0.01 comparados com culturas controle e ** P ≤ 0.001 comparados com culturas com somente troca de meio.

6.6. EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO NO^+ INDUZ NEURITOGÊNESE

Diversos estudos utilizando células PC12 têm demonstrado que o NO e a enzima NOS-neuronal são importantes para induzir diferenciação celular em resposta ao NGF(Peunova e Enikolopov, 1995; Phung et al., 1999) e também através da despolarização da membrana celular por tratamentos com KCl em células neuronais PC12K (Nakagawa et al. 2000). O crescimento dos neuritos (um marcador morfológico de diferenciação) está associado com mudanças eletrofisiológicas e morfológicas das células neuronais em processos de conexão e plasticidade (Phung et al., 1999). Portanto, resolvemos avaliar o efeito neuritogênico do NO^+ através da contagem do número de células com neuritos que mediam pelo menos o dobro do corpo celular em nosso modelo experimental. Culturas de células neuronais foram pré-incubadas em E8C1 com SNAP (100 μM) ou NBI (5 μM), um inibidor do transportador de adenosina, como controle positivo (figura 15). Embora a troca de meio induza a morte de células neuronais, o número de células com neuritos diminuiu e a morfologia também foi alterada pela retração dos neuritos. No entanto, o pré-tratamento com SNAP ou NBI possibilitou a formação de neuritos (figura 15A).

Tendo em vista que a exposição prolongada com NBI (bloqueador da captação de adenosina) também regula a morte produzida pela troca de meio (Ferreira et al., 2003), resolvemos investigar se de alguma maneira o NO^+ estaria envolvido na regulação da captação de adenosina e por sua vez, tentar verificar a existência de algum tipo de vínculo entre esses dois efeitos na proteção da morte desencadeada pela troca de meio.

Culturas de E8C1 foram incubadas com ou sem [^3H]adenosina 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ mais SNAP (100 μM) ou NBI (5 μM). Após 48 horas, o meio era trocado por um meio novo contendo as respectivas drogas. Em E8C4 as células eram lisadas e o conteúdo intracelular radioativo

determinado por cintilação líquida. Como se mostra na figura 15B, SNAP não bloqueia a captação de adenosina, ao contrário do observado com NBI. Estes dados em conjunto sugerem que a neuroproteção desencadeada pelo NO não se relaciona com o bloqueio da captação de adenosina como observado pelo NBI, sugerindo que a sobrevivência produzida pelo NBI ocorre através de uma via diferente.

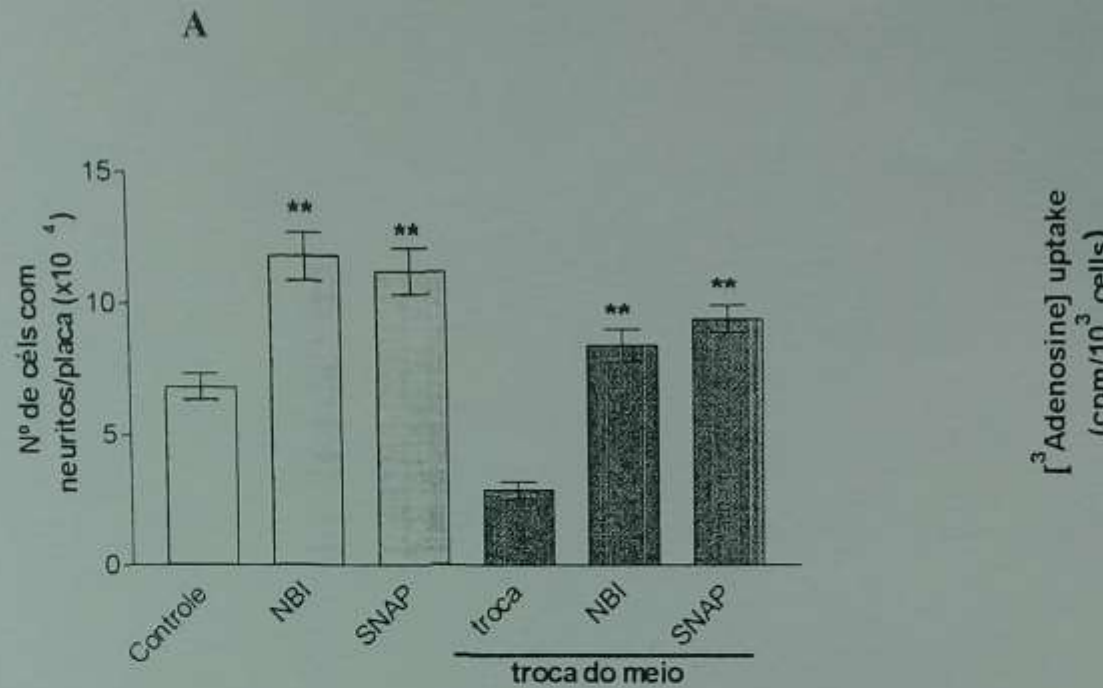


Figura 15: Efeitos neuritogênicos e na regulação da captação de adenosina por neuritos. NBI e SNAP envolvem vias diferentes. (A) Culturas de E8C1 foram pré-incubadas com NBI (5 μ M) e SNAP (100 μ M) e determinadas o N^o de céls/placa ($\times 10^4$) como de controle após 72 horas. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes duplicata. ** $P \leq 0.001$ quando comparados com controle ou troca do meio, respectivamente. (B) Culturas pré-incubadas com [³H]adenosina foram incubadas com NBI e SNAP (100 μ M). Em C4, as culturas foram lavadas e determinadas a captação de adenosina. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos independentes duplicata quando comparados com controle. Os pontos (•) sem barras representam valores muito pequeno para ser representado.

6.7 O EFEITO NEUROPROTETOR DO NO^+ ESTÁ ASSOCIADO COM A PRODUÇÃO DE GMP CÍCLICO

Trabalhos utilizando doadores de NO^+ mostram o crescimento dos neuritos via ativação da GC solúvel e PKG em células PC12 (Hindley et al., 1997). Com o intuito de caracterizar o papel do sistema do NO/GMP cíclico, incubamos culturas de 1 dia com zaprinast (10 μM), um inibidor seletivo de fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) que degrada o GMP cíclico.

A pré-incubação por 96 horas com zaprinast bloqueia a morte celular e induz crescimento dos neuritos de modo semelhante ao SNAP (figura 16). Esse dado sugere que o NO^+ induz a sobrevivência e diferenciação sobre as células submetidas à troca de meio via produção de GMP cíclico e ativação da GC solúvel.

Para corroborar a possibilidade dos efeitos do NO^+ serem desencadeados pela ativação da GC solúvel e produção de GMP cíclico, investigamos o efeito de dois inibidores da GC solúvel, ODQ e LY83583. A figura 17 mostra que a neuroproteção induzida pelo NO^+ é inibida tanto pela pré-incubação com 1 μM de ODQ ou 1 μM de LY83583. Por outro lado, o tratamento com zaprinast mais SNAP não mostrou resultados aditivos, o que sugere a hipótese de que o efeito do NO^+ já é máximo independente da inibição da PDE5. Estas observações levam a sugerir que a ativação da GC solúvel e a concomitante produção de GMP cíclico estão associadas com o efeito neuroprotetor do NO^+ .

Para caracterizar melhor o envolvimento da ativação do sistema NO/GMP cíclico observada em cultura purificada de neurônios expostas ao NO^+ , culturas de E8C1 foram pré-incubadas com ou sem KT5823 (400 nM), um inibidor da proteína serina-treonina cinase dependente de GMP-cíclico (PKG). Nestes experimentos como esperado, a pré-incubação com KT5823, 30 minutos antes do tratamento com SNAP, resultou numa diminuição de

aproximadamente 55% da neuroproteção induzida pelo NO (figura 18), sugerindo que a via intracelular neuroprotetora desencadeada pelo NO realmente compromete a ativação da via clássica do NO.

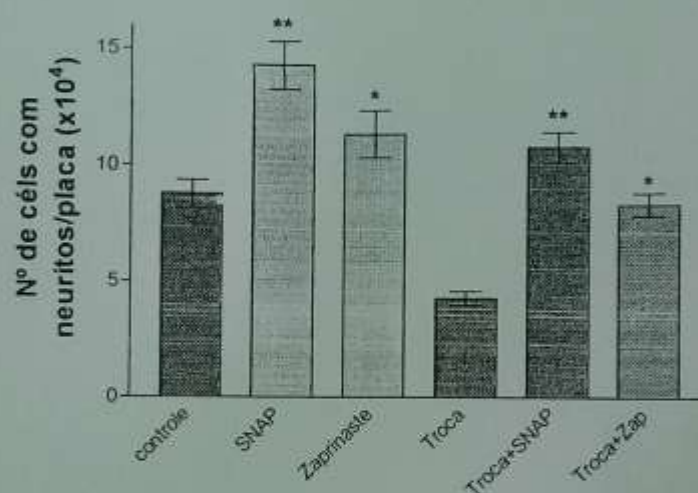


Figura 16: Efeito da produção de GMP cíclico sobre o crescimento dos neuritos. Cultura de E8C1 foram pré-incubadas com SNAP (100 μ M) ou 10 μ M zaprinast e mantidas até E8C4 nas mesmas condições de troca de meio, quando o número de células com neuritos/placa ($\times 10^4$) foi determinado em Materiais e Métodos. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ** $P \leq 0.001$ e * $P \leq 0.05$ quando comparados com o controle. ** $P \leq 0.001$ e * $P \leq 0.05$ quando comparados com culturas em que somente foi trocado o meio.

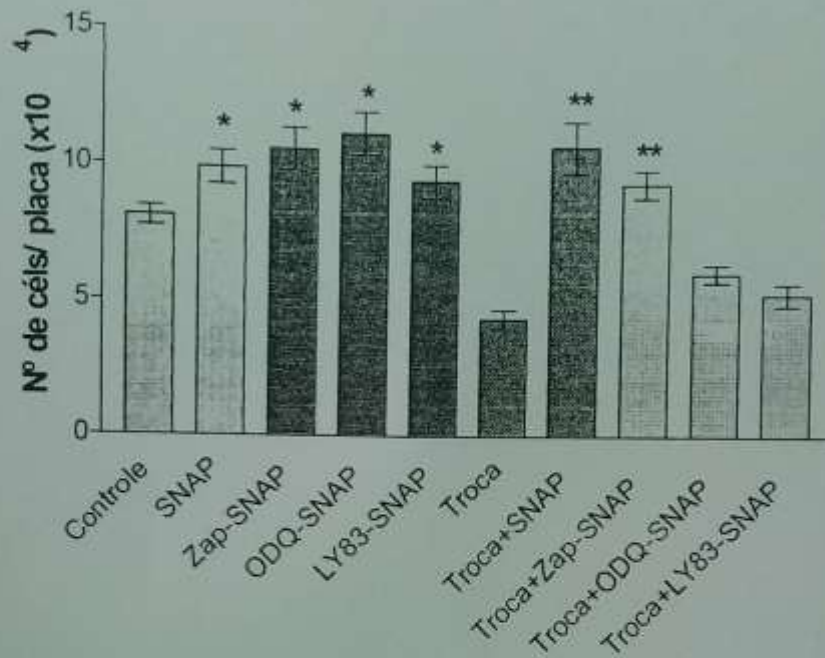


Figura 17: A inibição do sistema NO/GC-solúvel bloqueia a neuroproteção mediado pelo NO. Culturas após 24 horas de plaquetas foram pré-incubadas com ODQ (1 μ M) ou LY83583 (1 μ M), 30 minutos antes do tratamento com SNAP (100 μ M). Os dados representam a média \pm EPM de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0.01$ quando comparadas com controle e ** $P \leq 0.001$ quando comparadas com culturas em que somente o meio foi trocado.

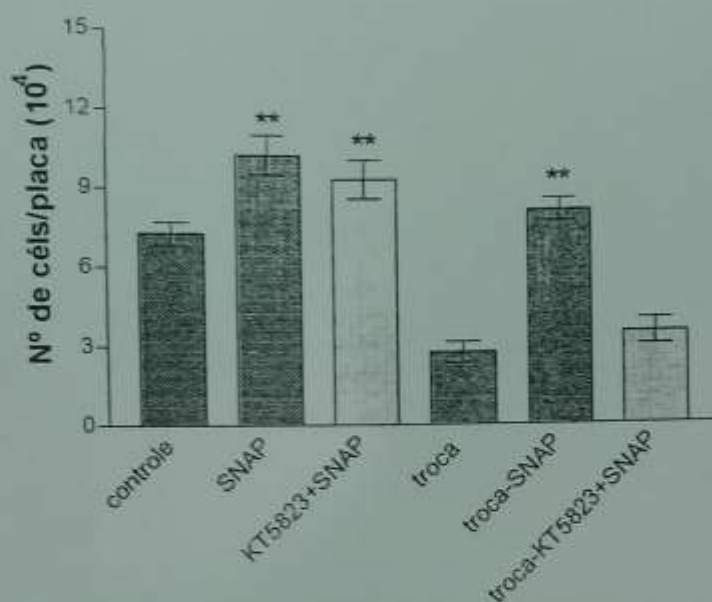


Figura 18: Envolvimento da PKG na sobrevivência celular de neurônios de retina em cultura. Culturas de E8C1 foram incubadas com 400 nM de KT5823 (inibidor da PKG), 30 minutos antes de serem tratadas com SNAP (100 μ M). Após 72 horas, o número de células/placa ($\times 10^4$) foi determinado. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ** $P \leq 0.01$ quando comparados com o controle e ** $P \leq 0.001$ quando comparados com culturas em que somente o meio foi trocado.

6.8 PI3K PARTICIPA DA REGULAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DE NO^+

Várias evidências da literatura indicam a participação de processos de fosforilação da PI3K e seu efetor downstream a AKT, na regulação da morte por apoptose e em regular a divisão, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em diferentes tipos celulares (Datta et al., 1997). Para investigar a participação da proteína cinase PI3K no processo neuroprotetor do NO^+ em células retinianas em cultura, resolvemos estudar a influência de dois inibidores da PI3K sobre a diminuição da morte desencadeada pela troca de meio em função do tratamento com NO^+ .

A figura 19 mostra os resultados obtidos com os inibidores da PI3K. Culturas purificadas de neurônios de 1 dia foram incubadas com SNAP 100 μM na presença ou não de LY294002 (1 μM) ou Wortmannin (0.8 μM), dois inibidores potentes desta cinase, 30 minutos antes de serem tratados com SNAP. O tratamento com os dois inibidores da PI3K bloqueou completamente o efeito neuroprotetor do NO^+ , sugerindo que a PI3K tem um papel relevante na sobrevivência celular induzido pelo NO^+ em células de retina mantidas em cultura.

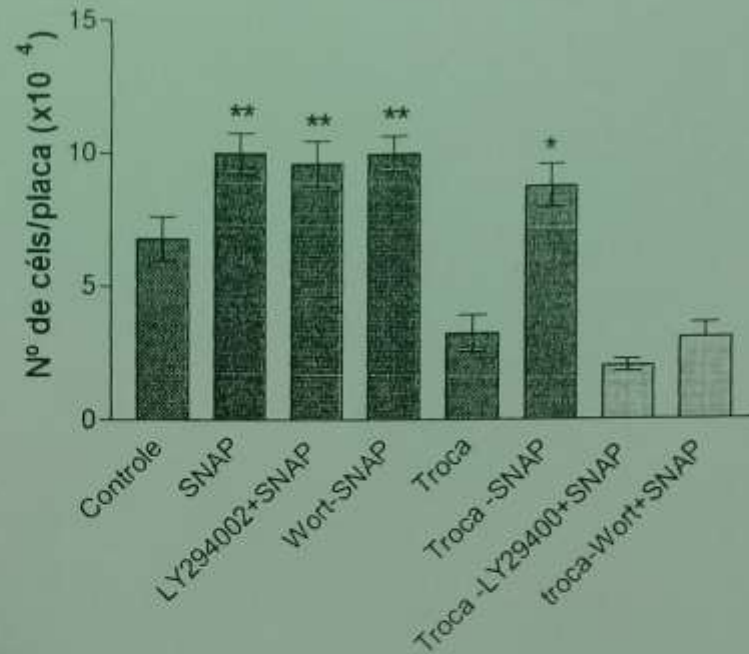


Figura 19: Inibição da PI3K bloqueia a sobrevivência celular induzido pelo NO em cultura purificada de neurônios. Culturas de E8C1 foram pré-incubadas com LY294002 (1 μ M) ou Wortmannin (0.8 μ M) 30 minutos antes de serem tratadas com SNAP (100 μ M). Em culturas de E8C4 (após 72 horas de tratadas), o número de células/placa ($\times 10^4$) foi determinado. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ** $P \leq 0.01$ comparados com controle e * $P \leq 0.001$ comparados com culturas em que somente foi trocado o meio.

6.9- ENZIMAS CINASES PARTICIPAM DA NEUROPROTEÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO NO⁺

As vias de sinalização celular das ERKs e CaMKs estão presentes de maneira ubíqua na célula neuronal. Trabalhos da literatura têm sugerido que a cascata das MAPKs são alvos “downstream” da ativação da NOS em vários sistemas (Yamazaki et al., 2001, 2003). Por outro lado, o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ induz inúmeras vias de sinalização incluindo a ativação da via da ERK e da CaMK II (Schmitt et al., 2004).

Com o intuito de verificar a possibilidade das proteínas cinases ERK e CaMKII de estarem envolvidas na regulação da sobrevivência desencadeada pelo NO, resolvemos estudar a influência de inibidores sobre estas duas proteínas cinases (figura 20). Culturas purificadas de neurônios de E8C1 foram pré-incubadas com 10 µM de PD98059, um inibidor da MEK, ou 1 µM de KN93, um inibidor da CaMKII, 30 minutos antes de serem tratadas com SNAP (100 µM). Nestes experimentos, como controle dos inibidores não observamos bloqueio da morte nas condições sem troca de meio quando adicionados individualmente (dados não mostrados). No entanto, foi observada uma inibição completa do efeito protetor do SNAP. Estes resultados sugerem que a ERK e CaMKII apresentem papéis importantes na regulação da sobrevivência celular induzido pelo NO em neurônios de retina mantidos em cultura.

Não há limite para o jovem que confia no Senhor

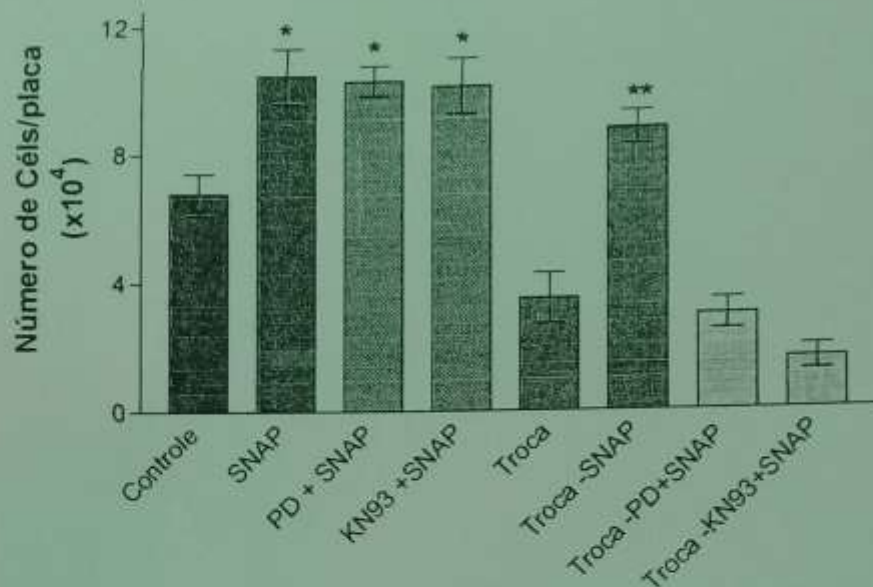


Figura 20: Participação da MAPK/ERK e CaMKII na neuroproteção induzida pelo NO^+ em cultura purificada de neurônios. Culturas de E8C1 foram pré-incubadas com PD98059 ($10 \mu\text{M}$) ou KN93 ($1 \mu\text{M}$) 30 minutos antes de serem tratadas com SNAP ($100 \mu\text{M}$). Após 72 horas, o número de células/placa ($\times 10^4$) foi determinado. Os dados representam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0.01$ quando comparados com controle e ** $P \leq 0.001$ quando comparados com culturas em que somente foi trocado o meio.

6.10- INIBIÇÃO DA PKA BLOQUEIA O EFEITO NEUROPROTETOR DE NO^+

Dados do nosso laboratório mostraram que adenosina bloqueia a morte desencadeada pela excitotoxicidade do glutamato (1 mM), e tratamento com adenosina inibiu a morte celular através da ativação direta do receptor de adenosina A2a (Ferreira et al., 2003, 2001). Por outro lado, fica aberta a possibilidade do envolvimento da PKA por estar modulando a via das MAPK/ERK. No entanto, trabalhos publicados pelo grupo do Cheng em 2002, mostram a fosforilação da AKT/PKB depende da produção de AMP cíclico e fosforilação da PKA (Mei et al., 2002).

Dessa forma, com o intuito de verificar o envolvimento da PKA na regulação da sobrevivência celular induzida pelo NO^+ , resolvemos caracterizar o efeito do inibidor da PKA em células de retina em cultura. Culturas de E8C1 foram pré- incubadas com 1 μM de H89, um inibidor da proteína cinase dependente de AMP-cíclico (PKA). O histograma dos resultados é mostrado na figura 21. H89 bloqueou o efeito neuroprotetor do NO^+ quando as culturas foram trocadas o meio. No entanto, o tratamento com inibidor mais SNAP sem a troca de meio não mostrou nenhuma alteração. Os dados sugerem que a regulação da sobrevivência celular induzido pelo NO^+ depende também da participação da PKA.

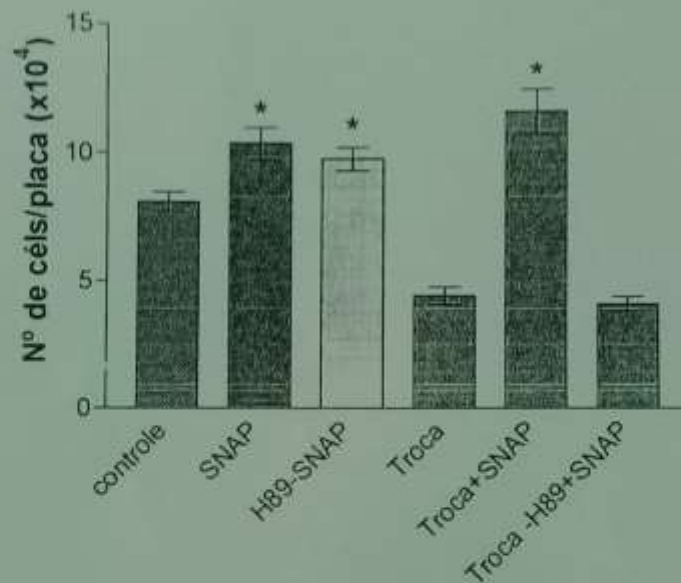


Figura 21. Inibidor da PKA bloqueia a neuroproteção mediado pelo NO[•]. Culturas em E8C1 foram pré-incubadas com H89 (1 μ M) 30 minutos antes do tratamento com SNAP (100 μ M). O número de células por placa ($\times 10^4$) foi determinado em E8C4. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0.05$ representa quando comparados com o controle e ** $P \leq 0.001$, culturas em que somente foi trocado o meio.

6.11- A MORTE PRODUZIDA PELA TROCA DE MEIO ENVOLVE UM MECANISMO APOPTÓTICO

A morte celular por apoptose envolve ativação de proteínas caspases induzida por estresse oxidativo ou por diversos estímulos como TNF- α , retirada de fatores neurotróficos ou de privação de glicose (Kim et al., 1999; Know et al., 2000). Com o objetivo de caracterizar o tipo de morte celular desencadeada pela troca de meio, nós resolvemos investigar se o tratamento com H₂O₂ (100 μ M), um tipo de estresse oxidativo que desencadeia morte por apoptose (Lin et al., 2004) (controle positivo), seria regulado pelo NO. Pois vale a pena ressaltar, quando tratamos com ácido úrico (scavenger de peroxinitrito) não houve bloqueio da morte celular em nossos experimentos (fig. 14), ficando a possibilidade de H₂O₂ ser nossa próxima molécula tóxica envolvida na morte dos neurônios, pelo fato de que o estresse oxidativo gera ânion superóxido para formar peroxinitrito que por sua vez poderia estar formando H₂O₂ em nossas culturas experimentais. Culturas em E8C1 foram pré-incubadas com ou sem SNAP (100 μ M). As culturas foram mantidas até C3 onde de um grupo o meio era retirado e colocadas as mesmas drogas como descrito em Materiais e Métodos. No entanto, outro grupo de culturas corridas em paralelo também pré-incubadas com SNAP (100 μ M) foram tratadas com ou sem H₂O₂ (100 μ M) por 1 hora, em seguida eram fixadas para contagem do número de células por placa (figura 22). A curva de concentração feita para H₂O₂ possibilitou tomar uma concentração ótima de 100 μ M, que induziu uma morte de mais de 85% dos neurônios (dados não mostrados). O pré-tratamento com NO⁻ bloqueou a morte induzida pelo H₂O₂.

Estas observações sugerem que o efeito neuroprotetor do NO envolve um mecanismo de regulação da morte celular por apoptose produzida pela troca de meio ou pela produção de radicais livres tóxicos para as células e que H_2O_2 é fundamental para desencadear morte celular em nossas culturas.

Diversos estudos sobre mecanismos apoptóticos têm demonstrado que a principal organela envolvida nas decisões de vida ou morte é a mitocôndria em situações de estresse oxidativo, pois a partir dela são liberadas moléculas pró-apoptóticas tais como citocromo c e Bad (Hansson et al., 2003). Por outro lado, o mecanismo de liberação de citocromo c depende da formação de um canal mitocondrial chamado Poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPT) (Hansson et al., 2003).

Com a finalidade de corroborar a hipótese de que o NO^- bloqueia um mecanismo apoptótico produzido pela troca de meio, resolvemos caracterizar o efeito da Ciclosporina-A (Csp-A), um reconhecido agente imunossupressivo que bloqueia a formação do mPT, sobre as nossas culturas purificadas de retina.

Culturas de E8C1 foram pré-incubadas com Ciclosporina-A ($0.3 \mu M$) ou tratadas em conjunto com $70 \mu M$ de DTT (um antioxidante) e Csp-A. Os resultados estão mostrados na figura 23. O tratamento com Csp-A bloqueou parcialmente a morte pela troca de meio. Por sua vez, a formação de moléculas lesivas produzidas pelo estresse oxidativo é também inibida pelo tratamento em conjunto com DTT e Csp-A. Esses dados nos sugerem que a troca de meio desencadeia morte celular por apoptose, comprometimento da membrana mitocondrial e formação de espécies radicais tóxicas. Por outro lado, nenhum efeito aditivo foi observado quando culturas foram tratadas em conjunto com Csp-A e SNAP (dados não mostrados). Neste contexto, o NO estaria comprometido com a preservação da integridade

da membrana mitocondrial e a regulação de radicais livres que são lesivos para as nossas células retinianas

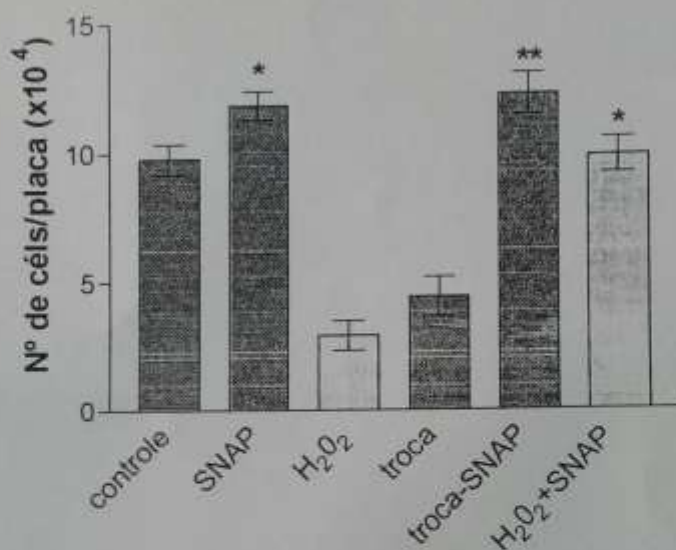


Figura 22. Provável mecanismo apoptótico induzido pela troca de meio em células retinianas em cultura. Culturas E8C1 foram pré-incubadas com SNAP (100 μ M). Após 48 horas, o meio era retirado e tratadas com ou sem H₂O₂ 100 μ M, por 1 hora. Seguidamente fixadas e estimadas o número de células/placa como descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média \pm EPM de n=3 experimentos independentes. * $P \leq 0.05$ representam culturas comparados com controle e **/* $P \leq 0.001$ e $P \leq 0.05$ comparados com culturas que foram trocadas o meio e tratadas com H₂O₂ respectivamente.

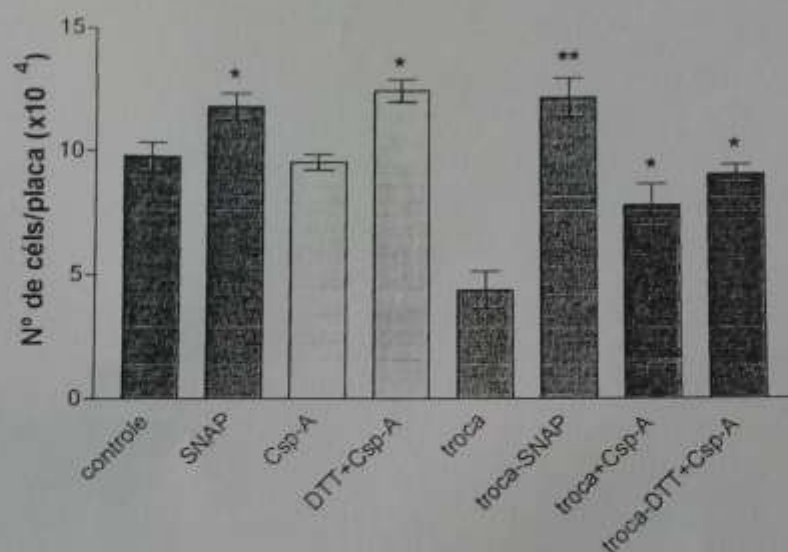


Figura 23. Morte por apoptose induzida pela troca de meio em células retinianas em cultura. Culturas E8C1 foram pré-incubadas com SNAP (100 μ M), Csp-A (0.3 μ M) ou DTT (70 μ M)+ Csp-A (0.3 μ M). Após 48 horas, o meio era trocado e tratadas com as mesmas drogas por mais 24 horas. Seguidamente fixadas e estimadas o número de células/placa como descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média \pm EPM de $n=3$ experimentos independentes. * $P \leq 0.05$ representam culturas comparados com controle e **/* $P \leq 0.001$ e $P \leq 0.05$ comparados com culturas que foram trocadas o meio respectivamente.

7. DISCUSSÃO

O propósito do presente estudo foi investigar o papel regulatório do óxido nítrico (NO) na sobrevivência de neurônios de retina em cultura e determinar o padrão da expressão basal da NOS-neuronal no desenvolvimento da retina de embrião de pinto.

No início deste trabalho realizamos ensaios preliminares objetivando estabelecer a funcionalidade do anticorpo e o estabelecimento de um protocolo inicial que nos permitisse reconhecer a proteína NOS-neuronal. Tendo em vista a atividade e localização desta enzima ter sido demonstrada em retina de vertebrados (Gwon et al., 2001; Venturini et al., 1991), necessitávamos avaliar a quantidade ótima de homogenizado que apresentasse um teor apreciável de proteína presente nas amostras de cerebelo de rato. Observamos que à medida que aumentávamos a quantidade de proteína, havia um aumento proporcional da imunomarcação para a NOS-neuronal (figura 9).

Para experimentos posteriores fomos estabelecer se o anticorpo policlonal desenvolvido para rato, também reconheceria as amostras de retina intacta de pinto em vários estágios do desenvolvimento. A expressão da NOS-neuronal revelou-se presente em estágios tão precoces como E8 e diminuíram em E12 e E15 respectivamente (figura 10).

A atividade da NOS-neuronal demonstrada em retina de pinto em desenvolvimento (Paes de Carvalho e Mattos, 1997), reforçam os nossos dados da expressão da proteína NOS-neuronal e correlacionam uma expressão direta e maior em estágios precoces (E8) que vá diminuindo em função do desenvolvimento do embrião de pinto (E12 e E15). Por outro lado, dados na literatura demonstraram que

a expressão da proteína NOS-neuronal ou NOS endotelial não se correlaciona com a atividade total da NOS. No entanto, outros estudos mostram a expressão ou síntese da proteína NOS pode ser regulada independente de sua atividade (Zhang e Snyder, 1995; Liu et al., 2003) ou através de uma regulação pós-tradução na expressão da NOS-neuronal (Endoh et al., 1994).

Conhecendo a ampla distribuição da NOS-neuronal (Bredt et al., 1990, 1991a), nossos resultados preliminares sugerem que a produção de NO pela NOS-neuronal em estágios precoces do desenvolvimento tem funções importantes como mensageiro biológico na retina de embrião de pinto.

Por outro lado, utilizando culturas purificada de neurônios de embriões de oito dias (E8) fomos avaliar o papel do óxido nítrico na regulação da sobrevivência celular. Os dados revelam que após a pré-incubação das culturas com doadores de NO (SNAP ou GSNO), que são nitrosotíois conhecidos em liberar NO⁺ (Vidwans et al., 1999; Pagliaro, 2003 para revisão), ocorreu um bloqueio da morte celular desencadeada pela troca de meio.

Dito bloqueio não foram observados quando a forma oxidada do SNAP (NAP degradado) foi exposto à luz por 24 horas (figura 11). Esse dado parece sugerir que, o NAP, possa exacerbar ligeiramente o efeito da morte comparado com o controle. De acordo com isso, dados descritos pelo grupo de (Kashiba e Inoue, 2000), mostraram que doadores de NO medeiam efeitos independentes da liberação de NO na regulação do balanço energético de ATP em eritrócitos.

Por outro lado, a curva temporal e cinética realizada para o NO⁺, mostrou claramente que se precisa de uma pré-incubação por 48 horas e uma concentração de 100 μ M para atingir o efeito máximo na inibição da morte celular. Dados na

literatura, também mostram que o efeito de SNAP depende da pré-incubação e da concentração de 100 μM para bloquear a morte por apoptose induzida pela 6-OHDA (Ha et al., 2003)

Utilizando células neuronais em cultura o grupo de Juan Bolaños em 2003, mostraram que o peroxinitrito bloqueia a apoptose induzida pelo NO. Esses achados levantaram a suspeita de que o feito de NO \cdot não seja provavelmente o candidato a bloquear a morte celular em nossas culturas. Os dados que foram descritos na figura 14 sugerem que o NO \cdot é a molécula importante em desencadear a neuroproteção em nossas culturas purificadas, pelo fato de que o scavenger de NO \cdot (PTIO), um agente que sequestra o NO \cdot , bloqueou significativamente a neuroproteção. No entanto, o ácido úrico, scavenger de peroxinitrito não bloqueou o efeito de NO \cdot . Podemos sugerir também que o controle de ácido úrico sozinho não bloqueou a morte induzida pela troca de meio (dados não mostrados), talvez deva-se a uma produção de outros radicais livres, além de peroxinitrito, que envolvam direta ou indiretamente com os mecanismos da morte celular. Pois o grupo de Chock e colaboradores (2003), utilizando uma linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y, mostraram que a privação de soro por 24 horas induz estresse oxidativo e concomitante produção de radicais livres como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido, malondialdeído, H_2O_2 e peróxidos orgânicos pela mitocôndria, como resultado final, uma morte por apoptose.

A via de sinalização NO/GMP cíclico foi previamente demonstrada por induzir crescimento dos neuritos em células PC12 (Yamazaki et al., 2004). Nossos experimentos subsequentes tiveram como objetivo caracterizar o número de células com neuritos apresentando pelo menos o dobro de comprimento do corpo celular.

Os resultados foram descritos na figura 15A onde revelam que a exposição por 48 horas com SNAP antes da troca de meio induz um significativo crescimento dos neuritos (um marcador morfológico de diferenciação), sugerindo que, nas condições experimentais de troca de meio e pré-incubação com SNAP tenha facilitado a diferenciação. Um exemplo deste tipo de efeito, foram estudos utilizando células PC12 onde mostram que o NO e a enzima NOS-neuronal são importantes para induzir diferenciação celular em resposta ao NGF (Peunova e Enikolopov, 1995; Phung et al., 1999). Outros estudos identificaram o papel direto do NO na diferenciação celular de células corticais e de retina em cultura (Arnhold et al., 2002). Com esses dados, sugerimos que além da neuroproteção o NO⁺ facilita a diferenciação em neurônios retinianos submetidas ao longo de 4 dias em cultura (ESC4).

Por outro lado, dados anteriores do nosso laboratório mostraram que o tratamento com NBI, um bloqueador do transportador de adenosina, também inibe a morte pela troca de meio em culturas purificadas. Com o intuito de verificar a correlação neuroprotetora entre os efeitos do NBI e NO⁺, caracterizamos o padrão de bloqueio da captação de adenosina (figura 15B). Os dados sugerem que as duas vias neuroprotetoras foram diferentes, pelo fato de o NO⁺ não interferir com a captação de adenosina da forma como foi bloqueada pelo NBI. Aliado a isso, tratamentos em conjunto com inibidores da PKA (H89) ou MEK (PD98059) não interferiu com a neuroproteção induzido pelo NBI (dados não mostrados).

Um número de evidências têm sugerido uma co-localização funcional entre o sistema purinérgico P2 e NO/NOS-neuronal (Yao et al., 2003). Por exemplo, Jurányi et al., (1999) demonstraram que o NO⁺ ativa o receptor P2X mas diminui o

efluxo de purinas incluindo ATP em fatias de hipocampo, o que sugere que o NO tenha um papel regulatório de feedback negativo na liberação de purinas, através da ativação de receptores purinérgicos P2X. Por outro lado, tratamento com ATP no glomérulo pre-contraído induziram um relaxamento significativo. Sob estas condições experimentais L-NAME e ODO inibiram o efeito de ATP (Jansson et al., 1999). Embora esses dados sugere que de fato ambos os sistemas podem correlacionar-se no SNC muito pouco se conhece a esse respeito (Jurányi et al., 1999; Reiser, 1995).

Tendo em vista que o efeito neuroprotetor e neuritogênico de NO⁺ protege da morte pela troca de meio, fomos caracterizar se zaprinast, um inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo V (PDEV) que degrada GMP cíclico, poderia mimetizar o mesmo efeito neuritogênico induzido pelo NO⁺. Na figura 16, descrevemos que um aumento na concentração de GMP cíclico também possibilitou o crescimento dos processos de modo semelhante ao NO⁺.

Por outro lado, alguns dos efeitos de zaprinast parecem envolver a liberação de glutamato e conseqüente aumento da concentração de GMPc, em retina isolada de rato (Barabás et al., 2002, 2003). O que abre a possibilidade de um envolvimento bastante conhecido de receptores de glutamato e óxido nítrico em nosso modelo experimental.

Esses dados em conjunto revelam que o bloqueio da morte celular induzida pela troca de meio parece dever-se à produção de GMP-cíclico.

No sistema vascular, está bem documentado que o NO⁺ ativa as GCs para promover o acúmulo dos níveis de GMPc e conseqüente ativação de proteína cinase dependente de GMPc (PKG) (Rooij e Bos, 1997). Nesse contexto, resolvemos

investigar a participação de inibidores da GCs. A figuras 17 mostra que os dois inibidores da GCs, ODO e ILY83583 bloqueam o efeito neuroprotetor de NO[•]. Mais ainda, o tratamento das culturas com KT5823, inibidor da PKG, promove o mesmo efeito no bloqueio da sobrevivência mediado pelo NO[•] (figura 18). Os resultados indicam que NO /GMP cíclico e a ativação da PKG participam da neuroproteção celular em nossas culturas purificadas de retina. Em concordância com nossas observações, Ha et al., (2003) mostraram que o sistema GMPc/PKG bloqueia o efeito apoptótico induzido pelo estresse oxidativo em células PC12 (Ha et al., 2003).

Um número crescente de evidências experimentais têm demonstrado a participação de óxido nítrico na liberação de neurotransmissores no SNC (Ohkuma e Katsura, 2001 para revisão). Por outro lado, os resultados descritos por Clementi et al., (1995), mostraram que o NO modula os sinais enviados por receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina cinase através de uma via de sinalização constituída de GMPc/PKG. Outros estudos identificaram que o NO promove a ativação de P21^{Ras}, recrutamento do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e de Raf-1 cinase (Lander et al., 1996; Deora et al., 2000).

Para explorar o mecanismo pelo qual a via NO/GMPc e PKG modula a morte produzida pela troca de meio, testamos dois inibidores da PI3K. Pois foi mostrado que a ativação da PI3K fosforila a AKT, uma proteína serina treonina cinase envolvida na regulação da morte por apoptose através da ativação do fator NF-kB e conseqüente incremento da expressão de genes anti-apoptóticos (Ozes et al., 1999).

Em nosso modelo experimental observamos que o efeito neuroprotetor do NO é bloqueado pelo tratamento com inibidores da PI3K (LY294002 e Wortmannin), sugerindo que a regulação da morte pela troca de meio envolve a ativação da via

PI3K e AKT. Esses dados abrem a possibilidade de que GMPc ou PKG estejam modulando a AKT por um mecanismo ainda não conhecido. Pois a liberação de neurotransmissores induzida pelo NO possa ativar um receptor tirosina cinase na membrana celular portanto, mediando a neuroproteção por uma via de ativação da Akt dependente de PI3K. Nesse contexto, Kim e colaboradores (2003), demonstraram uma ativação direta da AKT através de GMPc/PKG. Outros dados, mostram a dependência de receptores tirosina cinase como BDNF potencializando os efeitos de NO (Cheng et al., 2003).

Trabalhos na literatura têm demonstrado que BDNF apresenta importantes papéis na regulação da diferenciação, sobrevivência e plasticidade em várias populações de neurônios (Lewin e Barde, 1996).

Os sinais que regulam a produção de NO durante o desenvolvimento não são muito conhecidos. Trabalhos na literatura têm mostrado que BDNF regula positivamente a expressão da NOS-neuronal durante o desenvolvimento do SNC o que sugere um importante papel para esse fator neurotrófico. (Cellerino et al., 1999; Klóker et al., 1999). Por um lado sabe-se que o NO endógeno regula a produção de BDNF e, por sua vez, BDNF induz a expressão do gene da NOS-neuronal em neurônios pós-mitóticos (Cheng et al., 2003).

Estas observações nos levaram a sugerir que o NO⁺ pode desencadear efeito protetor através de receptores tirosina cinases (BDNF) e ativar a via da PI3K/Akt, ou diretamente através da PKG.

Sob as nossas condições experimentais intentamos avaliar se o efeito neuroprotetor promovido pelo NO⁺ dependia da liberação de fatores neurotróficos. O tratamento das culturas com K252a (0.3 µM) revelou um resultado não muito

convicente (dados não mostrados). Porém, nós não nos detemos na investigação desta hipótese em nossos estudos.

Por outro lado, as vias de sinalização através de receptores tirosina cinase envolvem também a ativação da via das ERK1/2. Por exemplo, Monteiro e colaboradores mostraram que em fibroblastos de camundongo, o par NO/GMPc promove a fosforilação em tirosina de um grupo de proteínas, posteriormente identificadas como cinase de adesão focal (FAK), Src cinase e MAP cinase ERK1/2 (Peranovich et al., 1995; Schlessinger e Ulrich 2000, Oliveira et al., 2003 para revisão).

Evidências experimentais descritas pela literatura têm demonstrado a participação de P21^{Ras} como um ponto de convergência entre diferentes cascatas de sinalização (Kolch, 2000).

A base estrutural para a interação entre NO[•] e P21^{Ras} foi inicialmente proposta como sendo através da S-nitrosilação de um único resíduo de cisteína, Cys 118, presente em P21^{Ras} (Oliveira et al., 2003). Nesse contexto, Lander et al., 1993, 1995) em uma série de estudos sugeriram que este seria um mecanismo de sinalização iniciado por NO[•] porém independente da mediação por GMPc.

Entretanto, a pré-incubação das nossas culturas com inibidor da MEK, PD98059, bloqueou o efeito neuroprotetor do NO[•]. Os dados sugerem que a via GMPc/PKG parece trabalhar em conjunto para mediar a ativação da via das ERK1/2 e assim desencadear a neuroproteção. De fato foi identificada recentemente uma nova proteína ativadora de P21^{Ras} a proteína CNRasGEF, cuja atividade estimuladora de troca de nucleotídeos guanina é modulada pela oferta de GMPc/APMc (Pham et al., 2000).

Em nossos experimentos, o pré-tratamento com o inibidor da PKA (H89) foi também observado um efeito inibitório da neuroproteção induzido pelo NO⁺. A possibilidade do NO⁺ liberar neurotransmissores e bloqueiar o efluxo de purinas e provavelmente também AMPc já sugerido, possa ativar PI3K via o complexo $\beta\gamma$ da proteína G. A existência de um vínculo entre estas vias foram sugeridas por Mei e colaboradores (2002) demonstrando que a produção de AMPc e ativação da PKA possa aumentar ou diminuir a fosforilação da AKT (Mei et al., 2002).

Por outro lado, trabalhos na literatura mostram que a despolarização da célula com alta concentração de KCl desencadeia a ativação das vias da CaMKII e PI3K (Ikegami e Koike, 2000). Nesse contexto, foram encontrados outros elementos da cascata de sinalização iniciados pelo par GMPc/PKG na ativação de canais da Ca²⁺ tipo L (Chen et al., 2002).

Estes achados forneceram a possibilidade de que o NO⁺ estaria induzindo um influxo de Ca²⁺ através desse canal iônico, levaria a formação do complexo Ca²⁺/calmodulina e por sua vez ativar a CaMKII. Prováveis domínios de ligação do complexo Ca²⁺/calmodulina foram identificados na subunidade catalítica P110 e regulatória P85 da PI3K (Ikegami e Koike, 2000 para revisão). Desse modo, o pré-tratamento com o inibidor da CaMKII (KN93) também revela um efeito inibitório da neuroproteção induzido pelo NO⁺.

Estas observações em conjunto nos sugere o envolvimento da vias da MAPK-PI3K-CaMKII e PKA na sobrevivência induzida pelo NO⁺.

Por outro lado, dados da literatura mostram que o estresse oxidativo por privação de soro produz morte por apoptose mediada pela produção de radicais livres pela mitocôndria Andoh et al. (2003)

Trabalhos prévios do laboratório mostram que a troca de meio desencadeia morte celular em cultura purificada de neurônios mas é bloqueada pelo tratamento com adenosina (Ferreira et al., 2003). Nossos dados também mostram que a morte celular também pode ser regulada pela pré-incubação com NO^+ . Por outro lado, com o objetivo de verificar se a troca de meio induz apoptose, resolvemos investigar primeiramente a possibilidade do efeito anti-apoptótico do NO^+ em culturas tratadas com H_2O_2 . Nossos dados revelam que o NO^+ bloqueia o efeito apoptótico maciço produzido pelo H_2O_2 em comparação com a troca de meio (figura 22). Esses dados sugerem um efeito anti-apoptótico do NO^+ na sobrevivência de neurônios de retina em cultura. Por outro lado, tem-se mostrado a mitocôndria e o poro mPTP como elementos importantes em processos de apoptose. Para confirmar o envolvimento da morte por apoptose, resolvemos investigar o efeito de ciclosporina-A nas condições experimentais de troca de meio. O efeito do pré-incubação com ciclosporina-A, descrito na figura 23, nos sugere que a morte desencadeada pela troca de meio foi inibido através do bloqueio da abertura do poro mPTP e conseqüente diminuição da morte dos neurônios. Esse dados nos sugerem que a troca de meio mata por apoptose, comprometimento da integridade da membrana mitocondrial e abertura do mPTP.

O tratamento com NO^+ nos levaram a sugerir que o efeito regulatório da morte por apoptose induzida pela troca de meio envolve a via GCs/GMPc e ativação da PKG por sua vez, a ativação em conjunto das cascatas de sinalização da MAPK,

PI3K, CaMKII e PKA para desencadear a sobrevivência e diferenciação em culturas purificadas de neurônios.

A representação esquemática da possível integração entre estas vias de sinalização mediadas por NO[•] está mostrada na figura 24.

O desencadear destas vias de sinalização por NO[•] estaria relacionada com estímulos de sobrevivência e diferenciação de células retinianas em cultura. O par GMPc/PKG poderia ativar a via das MAPK dependente da ativação da P21^{Ras} por S-nitrosilação. O par GMPc/PKG poderiam desempenhar um papel relevante na ativação de canais de Ca²⁺ tipo L ou P/Q e na liberação de fatores neurotróficos.

O influxo de Ca²⁺, levaria a ativação de proteínas dependentes de Ca²⁺/Calmodulina (CaMKII). Os fatores neurotróficos, ativariam cascatas de sinalização como a PK3K e MAPK/ERK. Finalmente, um ponto de convergência das proteínas cinase seria a CREB que por sua vez induziria transcrição de genes anti-apoptóticos. O NO[•] regularia o efeito apoptótico através da bloqueio do mPTP na mitocôndria inibindo a liberação de citocromo c.

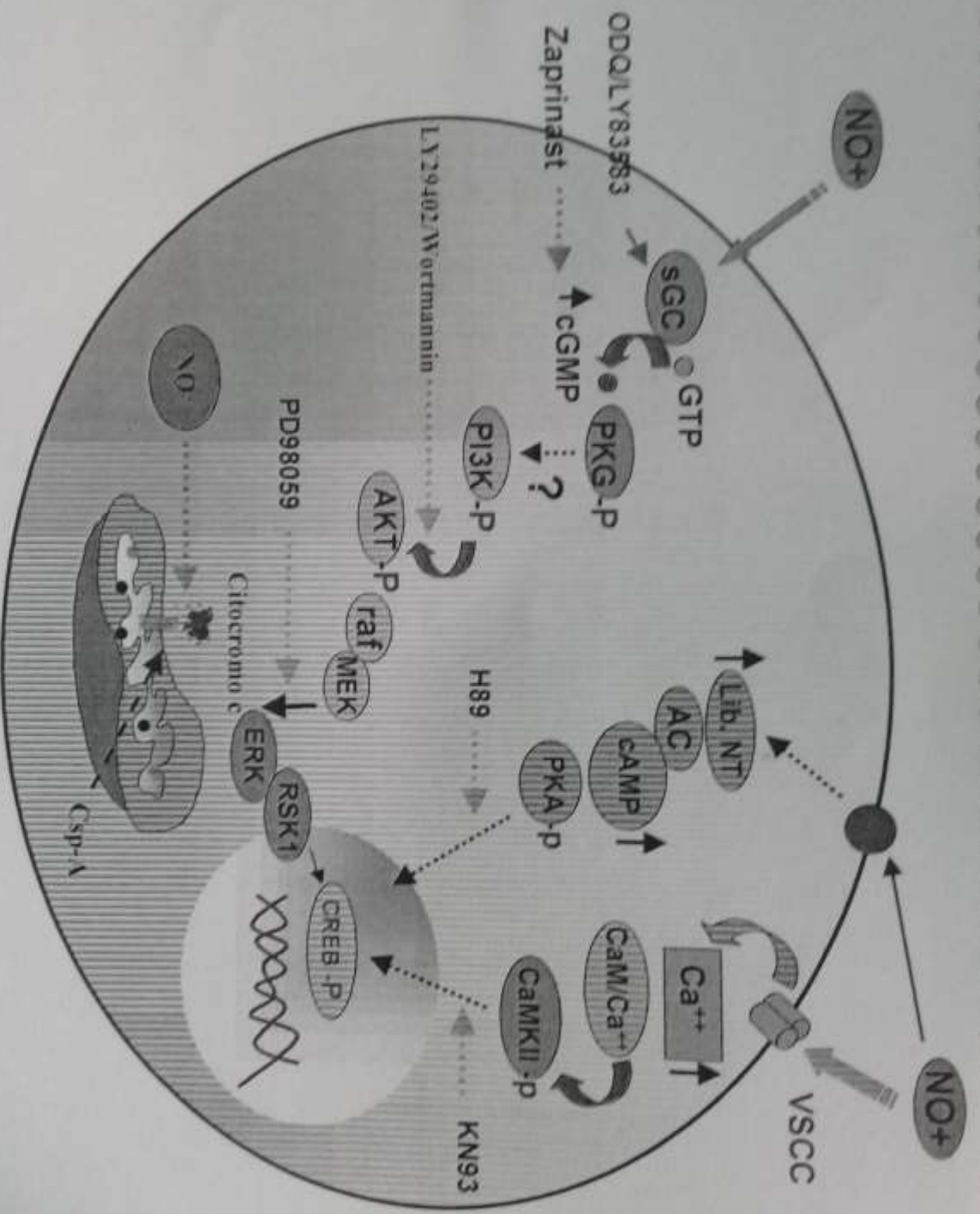


Fig. 24 – MODELO HIPOTETICO DA SINALIZAÇÃO DE NO⁻ NA NEUROPROTEÇÃO CELULAR.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABUDARA, V., FERNÁNDEZ, A. e MORALES, FR. (1998). El óxido nítrico (NO) se comporta como un mensajero neuronal ortodrómico en las motoneuronas trigeminales. *III Congreso Ibero-Americano de Biología Celular*. Pg 123
- ADLER, R. (1993). Determination of cellular types in the retina. *Invest. Ophth. Vis. Sci* (34): 1677-1681.
- ADLER, R. (1992). Plasticity and differentiation of retinal precursor cells. *Internat. Ver. Cytology*: 1-67.
- ALDERTON WK, COOPER CE. e KNOWLES RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry Society*
- ALMEIDA A., MONCADA S. e BOLAÑOS JP. (2004). Nitric oxide switches on the glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat. Cell Biol.* (6)45-51.
- ALVARES, B., DENOCOLA, A. e RADI, R. (1995). Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. *Chem Res Toxicol.* (8) 6, 859-864.
- ANDOH, T., CHIUEH, CC. e CHOCK, PB. (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates the expression of thioredoxin and thioredoxin peroxidase-1 during hormesis in response to oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* (278):885-890.
- ANKARCRONA, M., DYPBUKT, SM., ORRENIUS S. e NICOTERA, P. (1996). Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett* (394) 321-324.

- ARAKI, M. (1984). Immunocytochemical study on photoreceptor cell differentiation in the cultured retina of the chick. *Develop. Biol.* (103): 313-318.
- ARIANO, MA, LEWICKI, JA, BRANDWEIN, HJ. e MURAD, F. (1982). Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* (79): 1316-1320.
- ARNHOLD S., FABBENDER F., KLINZ J., KRUTTWING K., LÖHNIG B., ANDRESSEN C. e ADDICKS K. (2002). NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons and immunocytochemical and functional approach. *Int. J. Devl. Neuroscience.* (20): 83-92.
- ARNOLD, WP., MITTAL, CK., KATSUKI, S. e MURAD, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad. Sci.* (74): 3202-07.
- ASHKENAZI A. e DIXIT VM. (1998). Death receptor: signaling and modulation. *Science* (281): 1305-1308.
- BARABÁS, P., KOVÁCS, I., KOVÁCS, R., PÁLHALMI, J., KARDOS, J. e SCHOUSBOE, A. (2002). Light-induced changes in glutamate release from isolated rat retina is regulated by cyclic guanosine monophosphate. *J. Neurosci. Res.* (67): 149-155.
- BARABÁS P., RIEDL Z. e KARDOS J. (2003). Sildenafil, N-desthyl-sildenafil and Zaprinast enhance photoreceptor response in the isolated rat retina. *Neurochem Inter.* (43): 591-595.

- BHAVE, SV. e HOFFMAN, PL.** (2004) Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J. Neurochem.* (88): 359-369.
- BECKMAN JS., CHEN J. CROW JP. e YE JZ.** (1994) Reaction of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* (103): 371-380.
- BOHME, GA., BOM, C., STUTZMANS, JM., DOBLE, AE. e BLACCHARD, JC.** (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharm.* (19): 379-381.
- BOWEN, I.D. e BOWEN, SM.** (1990) Programmed cell death in tumours and tissues. *London: Chapman and Hall*, 268.
- BOWEN, ID., BOWEN, SM. e JONES, AH.** (1998) Mitosis and Apoptosis: matters of life and death. *London: Chapman and Hall*.
- BRADFORD, MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (72): 248-254.
- BREDDT, DS. e SNYDER, SH.** (1989) Nitric oxide mediator glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci.* (86): 9030-9033.
- BREDDT, DS., HWANG, PM. e SNYDER SH.** (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* (347): 768-770.
- BREDDT, D.S. e SNYDER, SH.** (1990) Isolation of Nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* (87): 682-685.

- BREDT, DD., GLATT, CE., HWANG, PM., FOTUHI, M., DAWSON, TM. e SNYDER, SH.** (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal population of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* (7): 615-624.
- BREDT, DS., HWANG, PM., GLATT., CE. LOWENSTEIN, C., REED, RR. e SNYDER, SH.** (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* (351): 714-718.
- BREDT, D. S. e SNYDER, SH.** (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* (8): 3-11.
- BRÜNE, B. e LAPETINA, EG.** (1989). Activation of cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generation agents. *J Biol Chem* (264): 8455-8458.
- BRÜNE, B., DIMMELER, S., MOLINA y VEDIA, L. e LAPETINA, EG.** (1994). Nitric oxide: A signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci.* (54): 61-70.
- BRUNTON, T. L.** (1967) Use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* (2): 97-98.
- BUTLER, AR., FLITMEY, FW. e WILLIAMS, DLH.** (1995). NO nitrosonium ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *TIPS* (16): 18-22.
- CASSINA, A. e RADI, R.** (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch biochem Biophys.* (328): 309-316.
- CASTRO L., RODRIGUEZ M., RADI R.** (1994). Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* (269): 29409-29415.
- CELLERINO, A., ARANGO-GONZALEZ, BA. e KOHLER, K.** (1999). Effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the rodent retina. *Exp. J. Neurosci.* (11): 2824-2834.

- CHEN, J., DAGGETT, H., DE WAARD, M., HEINEMANN, SH. e HOSHI, T. (2002) Nitric oxide augments voltage-gated P/Q-type Ca^{+2} channels constituting a putative positive feedback loop. *Free Radic. Biol. Med.* (32): 638-649.
- CHENG, A., WANG, S., CAI, J., RAO, MS. e MATTSON, MP. (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev. Biol.* (258): 319-333.
- CHUN, M., OH, S., KIM, I., e LIM, K. (1998) Light and electron microscopical analysis of nitric oxide synthase-like immunoreactive neurons in the rat retina. *Vis. Neurosci.* (16): 379-389.
- CHUNG HT., PAE HO. CHOI BM e BILLIAR TIMOTHY R. (2001) Nitric oxide is a bioregulator of apoptosis. *Bio. Bioph. Res. Com.* (282): 1075-1079.
- CLEMENTI, E., SCIORATI, C., RICCIO, M., MILOSO, M., MELDOLESI, J. e NISTICÓ, G. (1995). *J. Biol. Chem.* (270): 22277-22282.
- COULOMBRE, AJ. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.* (96): 153-189.
- COSENZA M., e PAES-DE-CARVALHO R (200). L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* (74): 1885-1894.
- CIANI E., VIRGILI M., CONSTESTABILE A. (2002). AKT pathway mediated a cGMP-dependet survival role of nitric oxide cerebellar granule neurons. *J. neurochem.* (81):218-228
- DANIOTTI, JL., LANDA, CA. e MACCIONI, HJF. (1994) Regulation of ganglioside composition and synthesis is different in developing chick retinal pigment epithelium and neunal retina. *Bram res.* (201) 1131-1136

- DATTA, SR., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. e GREENBERG, ME.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* (91): 231-241.
- DAWSON, TM., BREDT, DS., FOTUHI, M., HWANG, PM. e SNYDER, SH.** (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88): 7797-7801.
- DAWSON, TM. e DAWSON, VL.** (1995). ADP-ribosylation as mechanism for the action of nitric oxide in the nervous system. *New Horiz.* (3): 85-92.
- DAWSON, TM., DAWSON, VL.** (1996). NADPH Diaphorase Satining. En: Nitric oxide synthase characterization and functional analysis. *Maines, M. D. (Ed) Academic Press* 62-67.
- DE FARIA, MH., PAES-DE-CARVALHO, R., DO NASCIMENTO, JLM. e HOKOC, JN.** (1996). development of NADPH-diaphorase in the avian retina: Regulation of calcium ions and relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem* (67): 1063-1071.
- DE MELLO, FG.** (1980). Aspectos neuroquímicos da diferenciação embrionária da retina de pinto. *Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências.*
- De NADAI C., SESTILI P., CANTONI O., LIEVREMONT JP., SCIORATI C., et al.** (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (97): 5480-5485.
- DENICOLA, A., SOUZA, JM., AUGUSTO, O. e RADI, R.** (1995). Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-livre reactivity of peroxinitrite: role of the hydroxamic groups. *Free Rad Biol Med* (19): 11-19.

- DENICOLA, A., FREEMAN, BA., TRUJILLO, M. e RADL, R.** (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidation. *Arch Biochem Biophys* (333): 49-58.
- DEORA AA., HAJJAR DP. e LANDER HM.** (2000). Biochemistry (39): 9901-9908.
- DESAGHER S. E MARTINOUC JC.** (2000). Mitochondrial as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* (10): 369-377.
- DOMAŃSKA-JANIK, K., BUŽAŃSKA, L., DLUŻNIEWSKA, J., KOZTOWSKA, H., SARNOUWSKA, A. e ZABLOCKA, B.** (2004). Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Mol. Brain Res.* (121): 50-59.
- DOWLING, JE.** (1991). Retina. Enciclop. Human Biology (06): 615-631.
- DOWLING, JE.** (1987). The retina: An approachable part of the brain. (*Harvard University. Press*).
- EBERSOLT, C., PREMONT, J., PRONCHIANTZ, et al.** (1983) Inhibition of brain adenylate cyclase by A₁ adenosine receptor pharmacological characteristics and locations. *Brain Res* (267): 123-129.
- EISERICH JP., HIRTOVA M., CROSS CE., JONES AD., FREMANN BA. ET AL. VLIET A.** (1998). Formation nitric oxide-derivad inflammatory oxidant bymyeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* (391): 393-397.
- ENDO M., MAIESE K. e WAGNER JÁ.** (1994). Expression of the neural form of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. *Neuroscience* (63): 679-689.
- EVANS, VG.** (1993). Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biology International* (17): 461-476.

- FARBER D. e ADLER R.** (1986) Issues and question in cell biology of the retina. The retina. A model for cell biology studies. Part 1. *Academic Press Inc. (London) Ltd.* 2-16.
- FEELISCH, M.** (1998). The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (358): 113-122.
- FEESLISCH, M. e STAMLER, JS.** (1996). Donors of nitrogen oxides. In: *Feelisch M., Stamler, JS. (eds) Methods in nitric oxide research Wiley, Chichester:* 77-115.
- FERREIRA JM., MAIA, GA. e PAES-DE-CARVALHO, R.** (2003). Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. *Neurochem. Res.* (28): 1581-1588.
- FERREIRA, JM. e PAES-DE-CARVALHO, R.** (2001). Long-term activation of adenosin A (2a) receptor blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Bram Res* (2): 169-176.
- FESENKO, E., KOLESNIKOV, SS., e LYUBARSKY, AL.** (1985). Induction by cyclic GMPe of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* (313): 310-313.
- FÖRSTERMANN, U., GORSKY, LE., POLLOCK, JS., SCHMIDT, HHHW., HELLER, M. e MURAD. F.** (1990) Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (168): 727-732.
- FUJITA S. E HORII M.** (1963). Analysis of cytogenesis in the chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch. Histol. Jap.* (23): 359-366.
- FURCHGOTT, RF.** (1984) the rol of endothelium in the reponse of vascular smooth muscle to drugs. *Am. Ver. Pharmacol. Toxicol.* (24): 175-197.
- FURCHGOTT, RF.** (1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retracto penis is

organic nitrite and endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. En. Vasodilation Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. *P.M. Vanhoutte (Ed)*. New York, Raven Press. 401-414.

FURUYAMA, T., INAGAKI, S. e TAKAGI, H. (1993). Localizations of alpha-1 and beta-1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Mol Brain Res.* (20): 335-344.

GARCÍA-NOGALES P., ALMEIDA A. e BOLAÑOS JP. (2003). Peroxynitrito protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol Chem.* (278):864-874.

GARTHWAITE, J., CHARLES, SL. e CHESS-WILLIAMS, R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* (336): 385-388.

GASTON, B., REILLY, J., DRASEN, JH., FACKL, J., RANDEV, P., ARNELLE, D., MULLINS, ME. e SUGARBAKER, DJ(1993). Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. USA* 90: 10957-10961.

GELLER, DA., LOWENSTEIN, CJ., SHAPIRO, RA., NUSSLER AK., DI SM., WANG SC., NAKAYAMA DK. SIMMONS RL., SNYDER SH. e BILLIAR TR. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA* (90): 3491-3495.

GENARO AM., HORTELANO S., ALVAREZ A., MARTINEZ C., e BOSCA L. (1995). *J. Clin. Invest.* (95): 1884-1890.

GERHART, J. e KIRCHNER, M. (1997). Cells, Embryos, and Evolution. *Blackwell Science.* 642p.

GIBSON, A., MIRZAZADEH, S., HOBBS, AJ. e MOORE, PK. (1990) L-N^G-monomethyl-nitro-arginine and L-N^G-L-arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse aortic artery. *Br. J. Pharmacol.* (99): 602-606.

- GILLESPIE, JS., LIU, XR. e MARTIN, W.** (1989a) The effects of L-arginine and 1-N^G-monomethyl-nitro-arginine on the reponse of the rat anococcygeous muscle to NANC nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* (98): 1080-1082.
- GILLESPIE, JS. e SHENG, H.** (1989b) A comparison of haemoglobin and erythrocytes as inhibitors of smooth muscle relaxation by the NANC transmitter in the BRP and rat anococcygeus and by EDRF in the rabbit aortic strip. *Br. J. Pharmacol* (98): 445-450.
- GOUREAU O., JEANNY, JC., BECQUET, F., HARTMANN, MP. e COURTOIS, Y.** (1993) Protection against light-induced degeration by an inhibitor of NO synthase. *Neuroreport.* (5): 233-36.
- GOW, A.J. e ISCHIROPOULOS, H.** (2001). Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J. Cell. Physiol.* 187: 277-282.
- GREENWOOD, MT., GUO, Y., KUMAR, U., BEAUSÉJOURS S. e HUSSAIN NA.** (1997) Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Biochem Biophys Res Comm.* (238): 617-621.
- GROSS, SS. e WOLIN, MS.** (1995). Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev. Physiol.* (57): 737-769.
- GRUETTER, CA., BARRY, BK., McNAMARA, DB., GRUETTER, DY., KADOWITZ, PJ. e IGNARRO, L.** (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanilate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and carcinogenic nitrosamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* (5): 211-224.
- GRYLEWSKI, RJ., PALMER, RRJ., MONCADA, S.** (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*,(320) 454-456.

- GWON, J., JU, W., PARK, S., KIM, L., LEE, M., OH, S. e CHUN, M. (2001) The regulatory expression of neuronal nitric oxide synthase in the ischemic rat retina. *NeuroReport*. (12) 3385-3389.
- HA K., KIM K., KWON Y., BAL S., NAM, W., YOO, Y., KIM, PKM, CHUNG, H., BILLIAR, TR. e KIM, Y. (2003). Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells Through cGMP-dependet P13 Kinase/Akt activation. *J. FASEB* (17) 1036-1047.
- HAMBURGER, V., HEMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* (88): 49-92.
- HEBESTREIT H., DIBBERT B., BALATTI L., BRAUN D., SCHAPOWAL A., BLASER K., e SIMON HU. (1998). *J. Exp. Med.* (187): 415-425.
- HANSSON MJ., PERSON T. FRIBER H., KEEP F., REES A., WIELOCH T., ELMÉR E. (2003). Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. *Brain Res.* (960):99-111.
- HERMANN ANDRÁS. (2003) The neuromodulatory roles of glutathione, S-nitrosoglutathione and cysteina in the central nervous system. Academic dissertation University of Tampere, Medical School. Finland. 87 pg.
- HIBSS, JB., TAINTOR, R., VAVRIN, ZE. e RACHLIN, EM. (1988) Nitriarginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (189) 242-249.
- HINDLEY, S., JUULINK, BHJ., GYSBERS, JW., MIDDLEMISS, PJ., HERMAN, MAR. e RATHBONE, MP. (1997). Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J. Neurosci. Res.* (47): 427-439.
- HOFFMAN, M., SPANO, PF., TRABUCCHI, M. e KUMAMURA, K. (1977). Guanylate cyclase activity in various rat brain areas. *J. Neurochem.* (29): 395-396.

- HOGG NEIL. (2000) The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (42): 585-600.
- HÖLSCHER, C. (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *TINS* (20): 2998-303.
- HOPE, BT., MICHAEL, GJ., KNIGGE, KM. e VINCENT, SR. (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci.* (88): 2811-2814.
- HUGHES WF., e LA VELLE A. (1974) An the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.* (17): 297-302.
- HYER, J., MIMA, T. e MIKAWA, T. (1998) FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* (125): 869-877.
- IGNARRO, L.J., LIPPTON, H., EDWARDS, JC., BARICOS, WH., HYMAN, AL., KADOWITZ, PJ. e GRUETTER, CA. (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol Exp. Ther.* (218): 739-749.
- IGNARRO, L.J., BYRNS, RE. e WOOD, KS. (1988) Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In: *Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. P. M. Vanhoutte (Ed). New York, Raven Press. 427-436.
- IKEGAMI K., e KOIKE T. (2000). Membrane depolarization-mediated survival of sympathetic neurons occurs through both phosphatidylinositol 3-Kinase and CaM kinase II-dependent pathways. *Brain Res.* (2000): 218-226.
- JAFREY, SR., e SNYDER, SH. (1996). PIN:Na associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* (274): 774-777.

- JANSSON A., GOLDSTEIN M., TINNER B., ZOLI M., MEADOR-WOODRUFF JH, LEW JY., LEVEY A., WATSON S., AGNATI LF, e FUXE K. (1999) On the distribution patterns of D1, D2, tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities in the ventral striatum of the rat. *Neuroscience*. (89): 473-489.
- JUHASZOVA, M., ZOROV, DB., KIM, S-H, PEPE, S., FU, Q., FISHBEIN, KW., ZIMAN, BD., WANG, S., YTREHUS, K., ANTOS, CL., OLSON, EN, e SOLLOTT, SJ. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* (113): 1535-1549.
- JURÁNYI Z., SPERLÁGH B. e VIZI ES. (1999). Involvement of P2 purinoceptor and nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slice. *Brain Res.* (823): 183-190.
- KAHN AJ. (1973) ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res.* (63) 285-290.
- KAHN AJ. (1974). Na autoradiographic analysis of the time of appearance of neuron in the developing chick neural retina. *Develop. Biol.* (38): 30-40.
- KAMISAKI Y., WADA K., BRIAN K., BANABANLI B. DAVIS K., MARTIN E., et al. (1998). Na activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95) 11584-11589.
- KASHIBA MISATO e INOUE MASAYASU. (2000). Nitric oxide-independent effects of nitric oxide donors on energy metabolism in erythrocytes. *Biochem Pharm.* 59): 557-561.
- KELLY, R. B. (1993) Storage and release of neurotransmitters. *Neuron*. (10): 43-53.
- KELM, N. e SCHRADER, J. (1996). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Cir Res.* (66): 1561-1575.

- KELM, M. e SCHRADER, J.** (1988) Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart. *Eur. J. Pharmacol.* (155): 317-321.
- KIM, YM., CHUNG, HT., KIM, SS., HAN, JA., YOO, YM., KIM, KM., LEE, GH., YUN, HY., GREEN, A., LI, J., SIMMONS, RL. e BILLIAR, TR.** (1999). *J. Neurosci.* (19): 6740-6747.
- KLOCKER, N., KERMER, P., GLEICHMANN, M., WELLER, M. e BAHR, M.** (1999). Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* (19): 8517-8527.
- KLUGE, L., GUTTECK-ASLER, V., ZOLLINGER, M. e DO KQ.** (1997). S-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Neurochem.* 69: 2599-2607.
- KOINSTINAHO, J. e SAGAR, SM.** (1995). NADPH-diaphorase-reactive neurons in the retina. *Prog. Retinal Eye Res.* (15): 69-87.
- KOISTINAHO, J., SWANSON, RA., VENDE, JD. e SAGAR, SM.** (1993) NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase)-reactive amacrine cells of rabbit retina: Putative target cells and stimulation by light. *Neuroscience.* (57): 587-597.
- KOLB H.** (1994) The architecture of functional neural circuit in the vertebrate retina – The proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (35): 2385-2404.
- KOLCH, W.** (2000). The regulation of the Ras/Raf/Mek/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* (351): 289-305.
- KONTUREK SK. e KONTUREK, PC.** (1995) Role of nitric oxide in the digestive system. *Digestion.* (56): 1-13.

- KOTS, AY., SKURAT, AV., SERGIENKO, EA., BULARGINA, TV. e SEVERIN, ES.** (1992). Nitroprus-side stimulates the cysteine-specific(mono) ADP-ribosylation of gliceralhy de-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *FEBS Lett.* (300) 9-12.
- KOWALUK, EA., SETH, P., FUNG, HL.** (1992) Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (262) 916-922.
- KWON, YG., MIN, JK., KIM, KM., LEE, DJ., BILLIAR, TR., e KIM, YM.** (2000) Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J. Biol Chem.* (276): 10627-10633. *In press.*
- LANCASTER, JR Jr.** (1994). Stimulation of the diffusion and reaction of endoneously produced nitric oxide. Implications for neural nitric oxide signaling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* (33): 1235-1244.
- LANDER HM.,SCHAIPAL P., LEVI, E. DM. e NOVOGRODSKY A.** (1993) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide generating compounds. *J. Immunol* (150) 1509-1516.
- LANDER, HM., OGISTE, JS., PEARCE, SFA., LEVI, R. e NOVOGRODSKY, A.** (1995). Nitric oxid-stimulated guanina nucleotide exchange on P21Ras. *J. Bio. Chem.* (270): 7017-7020.
- LANDER, HM., JACOVINA, AT., DAVIES, RJ. e TAURAS, JM.** (1996). *J. Biol. Chem.* (271): 19705-19709.
- LEE WI. e FUNG HL.** (2003) Mechanism-basal partial inactivation of glutathione S-transferases by nitroglycerin: Tyrosine nitration vs sulfhydryl oxidation. *Nitric Oxide* (8) 103-110.

- LEI, SZ., PAN, ZH., AGGARWAL, SK., CHEN, HSV., HARTMAN, J., SUCHER, NJ. e LIPTON, SA. (1992). Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron*. (8): 1087-1099.
- LEONARD, CS., RAO, S. e SÁNCHEZ, RM. (1995). Patterns of neuromodulation and the nitric oxide signaling pathway in mesopontine cholinergic neurons. *The Neurosciences*. (7): 319-328.
- LEWIN, GR. e BARDE, YA. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* (19): 289-317.
- LI J., YANG S. e BILLIAR TR. (2000). *J. Biol. Chem.* (275): 13026-13034.
- LINCZ LF. (1998) Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol.* (76): 1-19.
- LIN HJ., WANG X., SHAFFER KM., SASAKI CY. e MA W. (2004). Characterization of H₂O₂ induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. *FESB letters* (570): 102-106.
- LIU P., SMITH PF., APPLETON I., DARLINGTON CL. e BILKEY DK. (2003). Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience*. (119): 679-687.
- LUSCHER, TF. (1991). Endothelium-derived nitric oxide: the endogeneous nitrosodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J.* (12): E2-E11.
- MARTÍNEZ-RUÍZ, A. e LAMAS, S. (2004). S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovas. Res.* (62): 43-52.
- MASON, WT. e BIGHOUSE. (1975). Correlation of rhodopsin biogenesis with ultrastructure morphogenesis in the chick retina. *J. Cell. Biol.* (64): 235-241.

MAYER, B., WERNES, ER., LEOPOLD, E., KLATT, P. e SCHMIDT, K. (1994). En *Biology of Nitric Oxide*. Feelisch, M., Busse, R., Moncada, S. (Eds) Colchester, Portland Press.

MAYER, B. (1995). Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. En: Nitric oxide in the Nervous System. Academic Press Limited, Vincent, S. R. (Ed): 21-42.

MEI FC., QIAO J., TSYGANKOVA OM., MEINKOTH JL., QUILLIAM LA. e CHENG X. (2002). Differential signaling of cyclic AMP: Opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J. Biol. Chem.* (277): 11497-11504.

MEY, J. e THANOS, S. (2000) Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res.* (32): 343-379.

MEYER, DJ., KRAMER, H., OZER, N., COLES, B. e KETTERER, B. (1994). Kinetics and equilibria of s-nitrosothiol-thiol exchange between glutathione, cysteine, penicillamines and serum albumin. *FEBS Lett* 345: 177-180.

MIKI, N., KAWABE, Y. e KURIAMA, K. (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (75): 851-856.

MIRANDA, K., ESPEY, MG., JOURD'HEUIL, D., GRISHNAM, MB., FUKUTO, M., FEELISCH, M. e WINK, DA. (2000). The Chemical Biology of Nitric Oxide. In: Ignarro, L.J. (Ed.), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Academic Press. San Diego (USA): 41-55.

MIRANDA, KM., NIMS, RW., THOMAS, DD., ESPEY, MG., CITRIN, D., BARTBERGER, MD., PAOLOCCI, N., FUKUTO, JM., FEELISCH, M. e WINK, DA. (2003). Comparison of the reactivity of Nitric Oxide and Nitroxyl with heme proteins.

- A chemical discussion of the differential biological effects of these nitric related products of NOS. *Journal of Inorganic Biochemistry* (93): 52-60.
- MISHIMA H. E FUJITA H. (1978). Studies on the cindifferentiation of the neuroblasts and visual cells in the chick embryo retina, using the eletronmicroscopic autoradiographs of 3H-thymidine. *Albrecht V. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* (206): 1-10.
- MONCADA, S., PALMER, RML. e HIGGS, EA. (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac Ther.* (43): 109-142.
- MONTAGUE, PR., GANCAYCO, CD., WINN, ML, MARCHASE, RB. e FRIEDLANDER, MJ. (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* (263): 973-977.
- MORENO-LOPEZ, B., ESCUDERO, M., DELGADO GARCÍA, JM. e ESTRADA, C. (1996). Nitric oxide production by brain stem neurons is required for normal performance of eye movements in alert animals. *Neuron.* (17): 739-745.
- MURAD, F., ISCHI, K., FÖRSTERMANN, U. et al. (1990). EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulated cyclic GMP synthesis in many cells. *Second Messenger Phosphoprotein Res.* (24): 441-445.
- MURREL, W. (1979). Nitroglycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* (1): 80-81.
- NAKAGAWA, H., YOSHIDA, M. e MIYAMOTO, S. (2000). Nitric oxide underlies the differentiation of PC12 cells induced by depolarization with high KCl. *J. Biochem.* (127): 113-119.
- NATHAN, C. e XIE, QW. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol Chem* (269): 13725-13728.
- OHKUMA S., e KATSURA M. (2001). Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog. Neurobiol.* (64): 97-108.

- OLIVEIRA, C.JR., SCHINDLER, F., VENTURA, AM., MORAIS, MS., ARAI, R.I., DEBBAS, V. e STERN E MONTEIRO HP.** (2003) Nitric oxide and activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* (35): 381-396
- OZES, ON., MAYO, LD., GUSTIN, JK., PFEFFER, SR., PFEFFER, LM. e DONNER, DB.** (1999) NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature (London)* (401): 82-85
- PAES-de-CARVALHO, R. BRAAS, KM., SNYDER, SH. e ADLER, R.** (1990) Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake and released in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. *J. Neurochem.* (55): 1603-1611.
- PAES-de-CARVALHO, R., BRAAS, K. M., ADLER, R & SNYDER, S.H.** (1992) Developmental regulation of adenosine A₁ receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina. *Dev. Brain Res.* (70): 87-95.
- PAES-de-CARVALHO, R. e MATTOS, JC.** (1997). Development of nitric oxide synthase in the avian retina. *Rev. Bras. Biol.* (56): 145-152.
- PAGLIARO, P.** (2003). Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sciences* (73): 2137-2149.
- PALMER, RMJ, FERRIGE, AJ. e MONCADA, S.** (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (327): 524-526.
- PALMER, RMJ, ASHTON, DS. e MONCADA, S.** (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* (333): 664-666.

- PERANOVICH, TMS., SILVA, AML, DA FRIES, DM., STERN, A. e MONTEIRO, HP. (1995) Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation in murine fibroblasts in the absence and presence of epidermal growth factor. *Biochem J.* (305): 613-619.
- PEUNOVA, N. e ENIKOLOPOV, G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* (375): 68-73.
- PHAM, N., CHEGLAKOV, I., KOCH, CA., DE HOOG, CL., MORAN, MF. e ROTIN, D. (2000). *Curr. Biol.* (10): 555-558.
- PHUNG, YT., BEKKER, JM., HALLMARK, OG. e BLACK, SM. (1999). Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation : a cGMP independent pathway. *Mol. Brain Res.* (64): 165-178.
- PINEDA, J., KOGAN, JH. e AGHAJANIAN, GK. (1996). Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J Neurosci.* (16): 1389-1399.
- POLLOCK, JS., FÖRSTERMANN, U., MITCHELL, JÁ., WARNER, TD., SCHMIDT, HHHW., NAKAME, M. e MURAD F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* (88): 10480-10484.
- PRADA, OF., ARMENGOL, JÁ., e GENIS-GALVEZ, JM. (1979). Algunos datos autoradiográficos sobre la histogénesis retiniana. *Morfología normal e Patología.* (3): 379-385.
- RADI, R, RODRIGUEZ, M., CASTRO, L. e TELLERI, R. (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem biophys.* (308): 89-95.
- RADI, R. (1996a). Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol.* (9): 828-835.

- RADI, R.** (1996b). Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods Enzimol.* (269): 354-366.
- REES, DD., PALMER, RMJ., SCHULTZ, R., HODSON, HF. e MOCADA, S.** (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and vivo. *Brit. J. Pharm.* (101): 746-752.
- REISER, G.** (1995). Ca²⁺-and nitric oxide-dependent stimulation of cyclic GMP synthesis in neuronal cell line induced by P2-purinergic/pyrimidinergic receptor. *J. Neurochem.* (64): 61-68.
- RÍOS H., LOPEZ-COSTA JL., FOSSER NS., BRUSCO A., e SAAVEDRA, JP.** (2000). Development of nitric oxide neurons in the chick embryo retina. *Dev. Brain Res.* (120): 17-25.
- ROGERS, N. e. IGNARRO, LJ** (1992). Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun.* (189): 242-249.
- ROOIJ, J. e BOS, JL.** (1997). *Oncogene*. (14): 623-625
- SATO, T.** (1990) NADPH-diaphorase positive amacrine cells in the retinae of the frog (*Rana esculenta*) and pigeon (*Columbia livia*). *Arch. Histol. Cytol.* (53): 63-69.
- SATA M., KAKPKI M., NAGATA G., NISHIMATSU H., SUZUKI E. et al.** (2000). Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cells apoptosis via cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension.* (36): 83-88.
- SCHLESSINGER, JE. e ULLRICH, A.** (2000). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* (61): 203-212.

- SCHMIDT, HHHW., POLLOCK, JS., NAKANA, M., GORSKY, LD., FÖRSTERMANN, U. e MURAD, F. (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating- factor synthase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* (88): 365-369.
- SCHMIDT, HW., GAGNE, GD., NAKANE, M., POLLOCK, JS., MILLER, MF e MURAD, F. (1992) Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem.* (40): 1439-1456.
- SCHMIDT, HW., LOHMANN, SM. e WALTER, U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* (1178): 153-175.
- SCHMIDT, JM., WAYMAN, GA., NOZAKI, N. e SODERLING, TR. (2004). Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J. Biol. Chem.* (279): 24064-24072.
- SCHUMAN, EM. e MADISON, DV. (1994). Locally distribute synaptic potentiation in the hippocampus. *Science* (263): 532-536.
- SHEFFIELD, JB. e FISCHMAN, DA. (1970). Intercellular junctions in the developing neural retina of the chick embryo. *Z Zellforsch Mikrosk. Anat.* (104):405-418.
- SHIBUKI, K. e OKADA, D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* (349): 326.
- SIMON, DI., MULLINS, ME., JIA, L., GASTON, B., SINGEL, DJ. e STANLER, JS. (1996). Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity and functional consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(10):4736-4741.

- SINGH, SP., WISHNOK, JS., KESHIVE, M., DEN, WH. e TANNENBAUM, SR. (1996) The chemistry of the S-nitrosoglutathione glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (93): 14428-14433
- SNYDER, SH. (1992) Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science* (257): 494-496
- SPENCE, SG. e ROBSON, JA. (1989) An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*, (3): 801-812.
- SPIKE, RC., TODD, AJ. e JOHNSTON, HM. (1993). Coexistence of NADPH-diaphorase with GABA, glycine and acetylcholine in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* (335): 320-333
- STAMLER, JS., SINGEL, DJ. e LOSCALZO, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* (258).
- STENKAMP, DL., IUVONE, PM., e ADLER, R. (1994). Photochemical movements of cultured embryonic photoreceptors: Regulation by exogenous neuromodulators and by a regulable source of endogenous dopamine. *J. Neurosci.* (14): 3083-3096.
- STRYER, L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev. Neurosci.* (9): 87-119.
- STUEHR, DJ., CHO, HJ., KWON, NS., WEISE, MF. e NATHAN, CF. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an fad-and fmn-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci. USA* (90): 3491-3495.
- TAKUMA, K., PHUAGPHONG, P., LEE, E., MIRI, K., BADA, A. e MATSUDA, T. (2001). Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes. Inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J. Biol. Chem* (276): 48093-48099.

- TAKUMA, K., PHUAGHONG, P., LEE, E., MORI, K., BABA, AE. e MATSUDA, T. (2002) The nitric oxide donor NOC12 protects cultured astrocytes against apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Jpn. J. Pharmacol.* (89): 64-71.
- TENG B., MURTHY, KS., KUEMMERLE, JF., GRIDER, JR., SASE, K., MICHEL, T. e MAKHLOUF GM. (1998). Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* (275) 342-351.
- VANHOUTTE, PM. (1989). Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* (913): 658-667.
- VENTURINI, CM., KNOWLES, RG., PLAMER, RMJ. e MOCADA, S. (1991). Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. *Biochem. Biophys. Res Comm.* (180): 920-925.
- VIDWANS, AS., KIM, S., COFFIN, DO., WINK, DA. e HEWETT, SJ. (1999). Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. *J. Neurochem.* (72):1843-1852.
- VINCENT, SR. (1994). Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress Neurobiol.* (42): 129-160.
- VINCENT, SR. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Vincent, S. R. (Ed) Academic Press.*
- WANG, X. e ROBINSON, PJ. (1997). Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem.* (68): 443-456.
- WATKINS, JC., KROGSSGAARD-LARSEN P. e HONORÉ, T. (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* (11): 25-33.

- WEILER, R. e KEWITZ, B.** (1993). NADPH-diaphorase, co-localizes with GABA in horizontal cells and cells of the inner retina in the carp retina. *Neurosci. Lett.* (158): 151-154.
- WIKLUND, NP., CELLEK, S., LEONE, AM, IVERSEN, HHL, GUSTAFSSON, LE., BRUNDIN, L., FURST, VW., FLOCK, A. e MONCADA, S.** (1997). Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. *J Neurosci Res.* (47): 224-232.
- WINK DA., HANBAUER I. KRISHNA MC., DEGRAFF W., GAMSON J. e MITCHELL JB** (1997). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (90): 9813-9817.
- WU, HH., WILLIAMS, CV. e McLOON, SC.** (1994). Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science* (265): 1593-1596.
- WU, SY. e DUN, NJ.** (1996). Potentiation of IPSC by nitric oxide in immature rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *J Physiol.* (495): 479-490.
- YAMAMOTO, R., BREDT, DS., DAWSON, TM., SNYDER, SH., e STONE, RA** (1993a). Enhanced expression of nitric oxide synthase by rat retina following pterygopalatine parasympathetic denervation. *Brain Research* (631): 83-88.
- YAMAMOTO, R., BREDT, DS., SNYDER, SH., e STONE, RA.** (1993b). The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience.* (54): 189-200.
- YAMAZAKI, M., CHIBA, K., MOHRI, T. e HATANAKA, H.** (2004). Cyclic GMP-dependent neurite outgrowth by genipin and nerve growth factor in PC12h cells. *Eur. J. Pharmacol.* (488): 35-43.

YAMAZAKI, M., CHIBA, K., MOHRI, T. e HATANAKA, H. (2001). Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade through nitric oxide synthesis as a mechanism of neuritogenic effect of genipin in PC12 cells. *J. Neurochem.* (79): 45-54.

YAO, ST., GOURINE, AV., SPYER, KM., BARDEN, JÁ., e LAERENCE AJ. (2003). Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hippocampus of the rat: A fluorescence immunohistochemical study. *Neuroscience.* (121): 411-419.

ZHANG J. e SNYDER SH. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annu Ver Pharmacol Toxicol* (35): 213-233.

ZHANG, Y., ZHANG, D., CAO, Y. e ZHAO, B. (2002). Development expression and activity variation of nitric oxide synthase in the brain of golden hamster. *Brain Res. Bull.* (58): 385-389.