UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

ÓXIDO NÍTRICO E ISQUEMIA CEREBRAL

Estudo experimental em roedores

Marco de Agassiz Almeida Vasques

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Neuropsiquiatria do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Neurologia-Área de concentração: Neurocirurgia.

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença**
Professor Adjunto de Neurologia e Neurocirurgia
Departamento de Neuropsiquiatria
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE
2002

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças à generosa contribuição dos Professores José Antunes Rodrigues e Benedicto Oscar Colli, tendo sido realizado em sua maior parte no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A ambos, meus sinceros agradecimentos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO ..... **VII**

ABSTRACT ..... **IX**

1. INTRODUÇÃO **01**

2. REVISÃO DA LITERATURA **03**

2.1. Doença vascular cerebral **03**

2.2. Resposta encefálica à isquemia..... **09**

2.3. Sintases de óxido nítrico..... **19**

2.4. Óxido nítrico e lesão celular..... **22**

2.5. Modelos experimentais de isquemia cerebral..... **27**

3. OBJETIVO **29**

4. MATERIAL E MÉTODOS..... **30**

4.1. Animais..... **30**

4.2. Técnica cirúrgica..... **31**

4.3. Grupos experimentais..... **33**

4.4. Preparação dos tecidos..... **34**

4.5. Atividade da SON..... **35**

4.6. Nitrato..... **36**

4.7. Proteína..... **37**

4.8. Análise estatística..... **38**

5. RESULTADOS **39**

5.1. Experimentos com gerbil..... **39**

5.2. Experimentos com ratos..... **47**

6. DISCUSSÃO **55**

7. CONCLUSÃO **63**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **64**

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA = α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato.

ATP = adenina trifosfato.

AVC = acidente vascular cerebral.

FAD = flavina adenina dinucleotídeo.

FMN = flavina mononucleotídeo.

GABA = ácido γ-amino-butírico.

HAS = hipertensão arterial sistêmica.

L-NAME = N^G-nitro-L-arginina metil ester.

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida).

NMDA = N-metil d-aspartato.

ON = óxido nítrico.

SON = sintase de óxido nítrico.

RESUMO

Vasques, MAA. Óxido nítrico e isquemia cerebral: estudo experimental em roedores. Recife, 2002. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pernambuco.

O presente estudo teve como objetivo verificar a atividade da sintase de óxido nítrico e correlacionar com possível déficit neurológico induzido pela isquemia cerebral focal em modelos experimentais em roedores. Foram utilizados dois modelos experimentais: o primeiro utilizando a ligadura da artéria carótida comum direita por seis horas em gerbil e o segundo utilizando a oclusão filamentar da artéria cerebral média de ratos, com tempos de isquemia de 15 minutos, 60 minutos e 24 horas. A produção do óxido nítrico foi investigada através da determinação da atividade da sintase de óxido nítrico (SON) e da concentração de nitrato em tecidos cerebrais.

O tratamento com um inibidor não específico da SON (L-NAME) resultou em uma piora do déficit neurológico induzido pela isquemia cerebral focal por seis horas no gerbil. A atividade da SON e a concentração de nitrato no tecido isquêmico não foram diferentes em relação ao hemisfério controle.

No rato submetido a 15 minutos de isquemia focal houve uma diminuição da atividade da SON (controle: 226,01±1,23 pmol/mg/15min; isquêmico: 160,06±8,03 pmol/mg/15min, p=0,0105). Efeito semelhante foi

observado em relação à concentração de nitrato (controle: 10,59±0,44 μM; isquêmico: 4,37±0,57 μM, p=0,0004). Em outros intervalos estudados – 1 hora e 24 horas - não houve alteração significante da SON ou da concentração de nitratos.

Concluindo, o presente estudo sugere que há redução na produção de ON nas áreas isquêmicas em fases precoces e que o ON endógeno tenha alguma função neuroprotetora nas condições de isquemia cerebral focal aguda.

ABSTRACT

Vasques, MAA. Nitric oxide and brain ischemia: experimental study. Recife, 2002. 85 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pernambuco.

This study verified nitric oxide synthase activity during brain ischemia in rodent models. Two models were used: the first by carotid artery occlusion in the gerbil for six hours and the second by the intraluminal thread middle cerebral artery occlusion in rats for 15 minutes, 60 minutes and 24 hours. The brain nitric oxide synthase (NOS) activity and the nitrate concentration were determined in cerebral tissues.

The NOS inhibition with L-NAME worsened neurological disabilty induced by focal brain ischemia for six hours in the gerbil. NOS activity and nitrate concentration in ischemic tissue were not different from control hemispheres.

In rats submitted to 15 minutes focal ischemia there was a NOS activity reduction (control: 226.01±1.23 pmol/mg/15min; ischemic: 160.06±8.03 pmol/mg/15min, p=0.0105). Similar results were found in nitrate levels (control: 10.59±0.44 μM; ischemic: 4.37±0.57 μM, p=0.0004). The other time intervals studied – 1 hour and 24 hours – there was no sigificant alteration on NOS activity or nitrate levels.

This study suggests that NO production is lowered in ischemic areas in early periods of ischemia and that NO has some protective role in the acute focal cerebral ischemia.

INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a primeira causa de morte no Brasil, segunda no mundo, terceira nos Estados Unidos, atrás apenas das doenças cardíacas e neoplásicas (Sacco, 1993; Doenças cardiovasculares no Brasil, 1993). Dentre os AVCs o mais comum é o isquêmico (AVCI), sendo o principal território acometido o da circulação anterior – artérias carótidas – e principalmente na região da artéria cerebral média, o que se deve a fatores ligados à anatomia vascular destas regiões, que recebem a maior parte do fluxo sanguíneo encefálico (Pessin e Teal, 1993). Para o tratamento da isquemia encefálica deve-se buscar dois objetivos básicos: a reperfusão da área isquêmica antes de haver lesão neuronal irreversível e a adequada preservação dos territórios sob isquemia mas ainda com viabilidade (zona de penumbra) (Valença e Valença, 2001; Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares, 2001).

Para o estudo da fisiopatogenia e dos efeitos do AVCI da circulação anterior foram desenvolvidos diversos modelos experimentais em animais (Colli et al., 1998), que provocam a isquemia nas regiões da carótida e artéria cerebral média com grande reprodutibilidade (Levine e Payan, 1966; Tamura et al., 1981; Bederson et al., 1986).

O óxido nítrico (ON) é um mensageiro molecular produzido a partir da arginina pela sintase de óxido nítrico (SON) (Bredt e Snyder, 1990), que exerce funções em diversos locais do organismo como sistema nervoso central e periférico, sistemas vascular e imunológico (Christopherson e Bredt, 1997; Steiner et al., 1998; Perotti et al., 1999; Steiner et al., 2002; Ventura et al., 2002). O ON está envolvido no processo de morte celular durante eventos isquêmicos (Ashwal et al., 1998). As concentrações de nitrato (metabólito do ON) encontram-se elevadas no líquido cefalorraquiano de pacientes vítimas de AVCI (Castillo et al., 2000).

No presente trabalho foi estudada a atividade da SON, correlacionando com possíveis déficits neurológicos induzidos pela isquemia cerebral focal em modelos experimentais em roedores.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doença vascular cerebral

Os AVCs podem ser classificados em isquêmicos e hemorrágicos (AVCH). Estes compreendem as hemorragias subaracnóideas e intracerebrais. Os infartos isquêmicos podem ser classificados pelo mecanismo da isquemia (aterotrombótico ou tromboembólico) ou pela etiopatogenia (aterosclerótico, cardioembólico, ou indeterminado). Os vários subtipos diferem em relação à etiologia, freqüência, sinais clínicos, prognóstico e tratamento. O AVCI representa 70-80% de todos os AVCs, e os subtipos de causa indeterminada e lacunares são os mais freqüentes, embora haja certa variação dependendo do estudo (Valença e Valença, 1999). Quando a pressão de perfusão cerebral cai a níveis críticos, a isquemia se instala, progredindo para infarto se persiste por tempo prolongado (maior que 3-6 horas). O infarto pode ser branco ou hemorrágico. O primeiro ocorre quando o trombo previne a reperfusão da região infartada, e o último se deve a reperfusão da área isquêmica, onde já houve quebra da barreira hemato-encefálica. Um exemplo seria a reperfusão de uma área que sofreu isquemia por espasmo vascular, como em certas crises de migrânea (Valença et al., 2002). A classificação dos AVCs em subtipos,

embora seja freqüentemente imprecisa, é importante no sentido de estabelecer o tipo de intervenção terapêutica mais adequada e específica para cada paciente.

A tromboembolia relacionada a artérias estenóticas por placas ateromatosas ulceradas ou desordens cardíacas é um substrato importante no desenvolvimento do AVCI (Khrenov et al., 2002). Trombos de plaqueta e fibrina ocorrem porque tanto o sistema de coagulação como as plaquetas estão ativados. Em condições normais o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular persistem pela presença de um endotélio intacto e moléculas antitrombóticas. A cascata de coagulação pode ser ativada em áreas de lesão vascular, ruptura endotelial, distúrbios de fluxo, ou por anormalidades no sistema de coagulação. A via extrínseca da coagulação é ativada por fatores tissulares presentes nas células endoteliais e subendoteliais, assim como células inflamatórias. A via intrínseca pode responder mais rapidamente à lesão vascular que o sistema extrínseco. A via final da cascata de coagulação é a conversão de fibrinogênio em fibrina mediada pela trombina (Khrenov et al., 2002). A ativação plaquetária, que também ocorre em resposta à lesão vascular, parece ter uma interdependência com a cascata de coagulação. As plaquetas aderem aos sítios de lesão arterial, levando à ativação plaquetária e liberação granular. Indutores do recrutamento plaquetário e maior agregação

são também liberados, levando à formação do trombo plaquetário, o qual é estabilizado pela fibrina. Uma variedade de mecanismos inibitórios das plaquetas e da coagulação pode reduzir e modificar a formação do coágulo de plaqueta-fibrina, como a antitrombina III, proteína C e proteína S, assim como substâncias produzidas pelo próprio endotélio que irão regular o funcionamento equilibrado entre os sistemas de coagulação e anticoagulação (Hiatt e Lentz, 2002; Khrenov et al., 2002). A ativação de sistemas procoagulantes associada à aterosclerose de grandes ou médios vasos intracranianos pode desencadear uma seqüência de eventos que leva à obstrução vascular e em conseqüência à isquemia cerebral. Isto irá desencadear uma série de fenômenos no parênquima encefálico, o que contribuirá para a progressão da lesão neuronal (High, 1988; Sacco, 1993).

A mortalidade por AVC eleva-se com o aumento na idade, sendo maior em homens negros. A incidência do AVC nos Estados Unidos é de 500 mil casos novos por ano e estima-se que aproximadamente 3 milhões de americanos já apresentaram um AVC (Sacco, 1993). A incidência e a prevalência do AVC elevam-se com a idade. A maior parte dos casos ocorre em pessoas acima de 65 anos havendo uma discreta predominância no sexo masculino (Sacco et al., 1982). Conforme o estudo de Framingham, a incidência anual de AVCI aterotrombótico em idade acima de 30 anos foi de

270 por 100.000 para homens e 210 por 100.000 para mulheres. A proporção entre homens e mulheres é estimada como 1,3:1, diferindo entre os subtipos de AVC. Os homens seriam mais propensos ao AVCI e as mulheres à hemorragia subaracnóidea (Sacco, 1993). Ao longo dos anos vem sendo observada uma tendência de declínio na mortalidade por AVC, assim como para outras doenças cardiovasculares, o que provavelmente se deve a um melhor controle dos fatores de risco (American Heart Association, 1991).

Os fatores de risco para AVC podem ser divididos em dois grupos: modificáveis e não modificáveis. Estes últimos compreendem fatores como a idade e o sexo do paciente. Os modificáveis são: hipertensão arterial sistêmica (HAS), cardiopatias (fibrilação atrial, valvopatias, infarto do miocárdio, doença coronariana, insuficiência cardíaca congestiva e trombo em ventrículo esquerdo), *diabetes mellitus,* dislipidemias, tabagismo, alcoolismo e estenose de carótida (Valença, 1994; Blaser et al., 2002; Kaur et al., 2002), bem como hiperuricemia (Farias da Silva, 1970; Farias da Silva, 1971; Farias da Silva, $1972_{b)}$. Outros fatores de risco potenciais vêm sendo estudados, como história familiar, sedentarismo, uso de anticoncepcionais orais (Collaborative Group for the Study of Stroke, 1975) e outros de origem hematológica (hematócrito elevado, alterações do fibrinogênio, proteína C e S, entre outros) (Forastiero et al., 1993; Khrenov et al., 2002; Lemaitre et al., 2002; Hiatt e Lentz, 2002). O

que habitualmente se observa é uma multiplicidade de fatores de risco em um mesmo paciente, o que eleva a probabilidade de ocorrência de um AVC (Coura, 1998).

Na sua história natural o AVCI pode evoluir para cura, sobrevida com seqüelas ou morte. O período imediatamente após o AVC é o de maior risco de mortalidade. Mais comum é que a morte se deva a complicações cardiopulmonares, sendo a taxa de mortalidade entre 8 e 20% nos primeiros 30 dias após a isquemia. Os sobreviventes do evento inicial continuam a ter um risco de morte 3 a 5 vezes maior que a população geral da mesma faixa etária, possivelmente por comorbidades associadas. A sobrevida de 5 anos após infarto cerebral aterotrombótico foi de 56% para homens e 64% para mulheres no estudo de Framingham (Sacco et al., 1982). O AVCI tem maior probabilidade de causar incapacidade do que de ser fatal. A piora após um AVC agudo é comumente causada pela progressão do AVC. O AVC aterosclerótico tem a maior probabilidade de progredir em relação aos demais subtipos (Sacco et al., 1989).

A recorrência é responsável por grande parte da morbidade e mortalidade por AVC. O período imediatamente após o AVC é o que tem maior risco para recorrência precoce. A recorrência piora os escores motores, aumenta a mortalidade precoce e a duração do internamento. As taxas de

recorrência nos 30 dias seguintes variam conforme o subtipo de AVC, sendo menores para os infartos lacunares e maiores para infarto aterosclerótico. Há associação do risco de recorrência a determinados fatores de risco, como fibrilação atrial (Valença e Valença, 1999; Valença e Valença, 2001).

O prognóstico do AVC depende portanto de uma série de fatores, e diversos aspectos têm sido estudados no sentido de se estabelecer quais seriam esses fatores prognósticos, tanto em relação à mortalidade como à recorrência. Alguns desses fatores, como HAS, glicemia elevada e subtipo do AVC, foram correlacionados ao prognóstico, porém este é um campo ainda em investigação.

2.2. Resposta encefálica à isquemia.

O encéfalo é altamente vulnerável à isquemia. A interrupção total do fluxo sanguíneo por apenas cinco minutos desencadeia a morte de neurônios vulneráveis em várias regiões encefálicas, enquanto as células do músculo cardíaco ou do rim só morrem após cerca de 20 a 40 minutos de isquemia (Lee et al., 2000). Isto pode refletir em parte a sua alta taxa metabólica. Apesar do encéfalo humano representar apenas 2,5% do peso corporal, nele ocorre cerca de 25% do metabolismo basal, uma taxa metabólica cerca de 3,5 vezes maior do que a encontrada em outras espécies de primatas. Adicionalmente, neurônios centrais têm uma dependência quase que exclusiva de glicose como substrato energético, e as reservas encefálicas de glicose ou glicogênio são limitadas. Entretanto, há evidências de que características energéticas e limitação de substrato não são os únicos responsáveis pela alta vulnerabilidade do encéfalo à isquemia (Lee et al., 2000). Parece que mecanismos encefálicos intrínsecos de sinalização intra e intercelular, normalmente responsáveis pelo processamento de informações, tornam-se prejudiciais em situações de isquemia, provocando a falência energética e exacerbando as vias finais de morte celular isquêmica, incluindo a produção de radicais livres, ativação de enzimas catabólicas, falência da membrana, apoptose, e inflamação (Lee et al., 2000; Vexler et al., 1997).

Após alguns segundos do início da isquemia, a atividade eletrocorticográfica local desaparece; se a isquemia é global, rapidamente há perda de consciência. Esta perda da atividade neural é induzida pela saída de K^+ dos neurônios, mediada inicialmente pela abertura de canais voltagem-dependentes e posteriormente por canais ATP-dependentes, levando a uma hiperpolarização transitória da membrana plasmática. Poucos minutos após, uma abrupta redistribuição iônica ocorre através da membrana plasmática, associada com despolarização (efluxo de K^+ e influxo de Na^+, Cl^- e Ca^{2+}). Esta despolarização anóxica resulta na liberação excessiva de neurotransmissores, em particular glutamato, promovendo maior propagação da despolarização celular, depleção dos estoques energéticos e continuidade da cascata lesional (Lee et al., 2000).

O glutamato, um aminoácido dicarboxílico, é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Refletindo sua função na sinalização intercelular, as concentrações médias no encéfalo total são da ordem de 10mM, com concentrações presumivelmente maiores no interior das vesículas sinápticas. Sob condições isquêmicas, o glutamato é massivamente liberado, inicialmente pela liberação do conteúdo das vesículas nas terminações nervosas, e posteriormente por transporte reverso a partir dos astrócitos, atingindo altas concentrações no espaço extracelular. Estas

concentrações de glutamato são neurotóxicas, e há evidências de que essa toxicidade do glutamato tem função importante na patogênese da morte neuronal após isquemia e outros insultos agudos (Dawson et al., 1991). O acúmulo extracelular de glutamato sob condições isquêmicas hiperestimula os receptores tipo NMDA, AMPA e kainato, promovendo influxo de Na^+ e efluxo de K^+ através dos canais de membrana ativados pelos receptores de glutamato. Os canais iônicos receptor-NMDA-regulados são altamente permeáveis ao Ca^{2+} e medeiam o influxo de Ca^{2+} nos neurônios. Com a abertura dos canais (ativados por receptor de glutamato) ocorre o fenômeno da depressão alastrante, que se propaga a partir do centro isquêmico para a área de penumbra. A depressão alastrante aumenta a demanda metabólica e a falência energética, favorecendo ainda mais a liberação de glutamato (Gorji, 2001). Há um inchaço significativo dos dendritos e corpos celulares neuronais, característico da necrose, à medida que a entrada de Na^+ e Ca^{2+} é acompanhada por Cl^- e água. As elevações no cálcio livre intracelular neuronal, mediadas por receptores NMDA, canais de Ca^{2+} voltagem-regulados (ativados pela despolarização de membrana) e atividade revertida da bomba de troca Na^+/Ca^{2+}, exercem função importante na promoção da depressão alastrante e no desencadeamento de cascatas citotóxicas deletérias (Lee et al. 2000; Kristián e Siesjö, 1998; Ohta et al., 2001).

Em culturas de neurônios, o bloqueio seletivo dos receptores NMDA impede em grande parte o influxo de cálcio e a morte celular induzida pela exposição ao glutamato (Choi, 1988). Os antagonistas do NMDA também reduzem a morte de neurônios induzida pela deprivação de glicose e/ou oxigênio (Choi, 1988). Exposição ao NMDA por apenas 3 a 5 minutos é suficiente para desencadear morte neuronal em cultura (excitotoxicidade rapidamente desencadeada), enquanto a exposição ao kainato tipicamente requer horas para o mesmo efeito (excitotoxicidade lentamente desencadeada) (Lee et al., 2000). Esta diferença no curso temporal é compatível com uma maior velocidade de influxo de Ca^{2+} mediado diretamente pelos canais regulados pelos receptores de NMDA, comparado com um mais lento influxo de Ca^{2+} mediado pelo canal voltagem-regulado e rotas de trocadores iônicos ativados pelos receptores de AMPA ou kainato (Lee et al., 2000). Os antagonistas dos receptores de NMDA são neuroprotetores eficientes em modelos animais de isquemia focal encefálica, assim como hipoglicemia ou trauma (Albers et al., 1989), porém não em isquemia global transitória (Buchan, 1990). Nesta última situação, a excitotoxicidade mediada pelo receptor NMDA pode ser menos proeminente que a entrada de Zn^{2+} facilitada pelo receptor AMPA na indução de lesão neuronal letal. Razões para essa diferença são desconhecidas, mas um fator importante pode ser a acidez

extracelular devido ao acúmulo de ácido láctico durante a isquemia global, um evento menos proeminente na área de penumbra da isquemia focal, onde a perfusão é parcialmente mantida. Esta acidez seletivamente regula para baixo os receptores NMDA e a excitotoxicidade mediada por estes, mas exacerba a excitotoxicidade mediada pelo AMPA (Lee et al., 1999); pode ainda exacerbar a entrada (tóxica) de Zn^{2+} através de canais de Ca^{2+} voltagem-regulados (Kerchner et al., 2000).

Além do glutamato outros neurotransmissores liberados no espaço extracelular durante a isquemia podem influenciar significativamente o seu curso. Há aumento da concentração de dopamina em cerca de 500 vezes no espaço extracelular após a isquemia global, que pode contribuir para morte neuronal estriatal. A redução experimental da liberação de dopamina, que pode ser feita através de lesões nos neurônios dopaminérgicos que se projetam a partir da substância nigra ou pelo uso de alfa-metil-p-tirosina (inibidor da tirosina hidroxilase), para depletar reservas endógenas de dopamina, atenua a lesão estriatal em modelos de isquemia global em roedores (Obrenovitch et al., 1995). O potencial da dopamina em exacerbar as correntes dos receptores de glutamato pode ser um fator que contribui para a potencialização da lesão isquêmica induzida pela dopamina.

Nem todos neurotransmissores promovem lesão; alguns como serotonina, GABA e adenosina são neuroprotetores. Adenosina, que se acumula rapidamente durante a isquemia devido à degradação do ATP, tem efeitos benéficos em muitos tecidos. A ativação de receptores A2a no músculo liso vascular e nos neutrófilos aumenta o fluxo sanguíneo local e diminui o processo inflamatório, respectivamente (Von Lubitz, 1999). A adenosina também tem efeitos benéficos específicos para o sistema nervoso, mediados por receptores neuronais A1, reduzindo a liberação de neurotransmissores e a excitabilidade da membrana. Além disso, a expressão de vários fatores de crescimento aumenta em tecidos isquêmicos, talvez como uma resposta protetora. Administração exógena de fatores de crescimento tem potencial terapêutico em vários modelos experimentais de isquemia, incluindo tecidos diferentes como o fígado, rim, coração e encéfalo. Exemplos de fatores de crescimento cuja administração reduz o dano encefálico em ratos submetidos à isquemia cerebral são: fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofinas 4/5 (NT-4/5), fator de crescimento fibroblástico básico e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que aparentemente bloqueia a apoptose neuronal. Alguns fatores de crescimento podem também aumentar o brotamento de fibras

nervosas e formação de sinapses após uma lesão isquêmica, portanto promovendo recuperação funcional potencial (Lee et al., 2000).

A despeito de seus efeitos benéficos, certos fatores de crescimento podem também exacerbar a vulnerabilidade neuronal a radicais livres e excitotoxicidade. Exposição aguda a BDNF, NT-3 ou NT-4/5 reduz a vulnerabilidade à apoptose de neurônios neocorticais em cultura, mas exacerba a necrose celular das mesmas células após exposição ao NMDA ou à privação de oxigênio-glicose. Os efeitos deletérios das neurotrofinas assim como IGF-1 podem ser explicadas em parte pelo aumento do influxo de cálcio mediado pelo receptor NMDA, produção aumentada de radicais livres ou, possivelmente, efeitos pró-excitatórios agudos que poderiam aumentar a excitotoxicidade (Behrens et al., 1999).

O zinco, segundo mais abundante metal de transição no corpo humano, está presente em todas as células, a maior parte ligado a proteínas, como metalo-enzimas e fatores de transcrição, onde tem função catalítica e estrutural. No encéfalo, há um *pool* adicional de Zn^{2+} quelável localizado em vesículas sinápticas em terminais nervosos excitatórios (glutamatérgicos), o qual é liberado em um padrão cálcio-dependente com a despolarização e pode alterar o comportamento de vários receptores de neurotransmissores e de canais voltagem-regulados (Frederickson, 1989). Há evidências de que este

pool de zinco pode contribuir para a morte neuronal sob condições patológicas como isquemia, convulsões ou após traumatismo cranioencefálico (Choi e Koh, 1998).

Após isquemia global transitória, o zinco quelável transloca-se dos terminais nervosos para os corpos celulares de neurônios vulneráveis (Tonder et al., 1990). Esta translocação precede a degeneração neuronal, e sua interrupção pela administração intracerebroventricular de um quelante (CaEDTA), reduz a morte neuronal subseqüente. A exposição a altas concentrações de Zn^{2+} semelhantes ao que provavelmente ocorre no espaço extracelular após despolarização celular sincrônica, é suficiente para matar neurônios em cultura, especialmente se os neurônios estão despolarizados, o que facilita a entrada do Zn^{2+} através da membrana plasmática através de canais de Ca^{2+} voltagem-regulados (Choi e Koh, 1998). Há evidências de que o zinco pode contribuir para o desenvolvimento de infarto cerebral após isquemia focal transitória leve (Lee, 2000). Experimentos com camundongos transgênicos com expressão de metalotioneína 1, uma proteína de ligação do zinco, demonstraram uma redução na área de infarto após isquemia da artéria cerebral média (Campagne et al., 1999). Outras substâncias agem como sinalizadores intracelulares, como a proteina quinase C, proteínas quinase mitógeno-ativadas, quinases p38, entre outras, que participariam na ativação

de processos relacionados à morte celular programada ou apoptose em resposta à isquemia (Sugino et al., 2000; Alessandrini et al., 1999; Yang, 1997).

Além da lesão induzida pela isquemia, a reperfusão da área isquêmica pode acentuar a lesão pelo aumento na produção de radicais livres, ativação de enzimas intracelulares e depleção energética. O ON gerado pela SON expressada em macrófagos, neutrófilos e micróglia pode também contribuir para lesão tissular, enquanto o ON produzido pelo endotélio seria protetor no sentido de que o mesmo provoca vasodilatação, ajudando a preservar o fluxo sanguíneo (Samdani et al., 1997). No sistema nervoso central, a produção de radicais livres seria apenas um mediador da morte celular induzida pelo glutamato. Os neurônios respondem a aumentos do cálcio livre intracelular com aumentos da produção de ON (via SON neuronal) que teria efeitos neurotóxicos. Outros possíveis mediadores da geração de radicais livres seriam o desacoplamento do transporte de elétrons mitocondrial e a sobrecarga de zinco. Além disso a lesão pode ser exacerbada pela ativação excessiva de enzimas catabólicas dependentes de cálcio, como fosfolipase A2, fosfolipase C e calpainas (Bonventre et al., 1997; Umemura et al., 1992; Markgraf et al., 1998). Há uma tendência em valorizar os aspectos inflamatórios da isquemia cerebral, abrindo uma via promissora para novos tratamentos e neuroproteção

(Blake e Ridker, 2000; Rothwell et al., 1997; McCulloch e Dewar, 2001; El Kossi e Zakhary, 2000).

No primeiro consenso brasileiro do tratamento da fase aguda do AVC, a sociedade brasileira de doenças cerebrovasculares enfatiza a necessidade de se considerar o AVC como uma emergência médica e estabelece padrões de tratamento. O controle pressórico, glicêmico, térmico, respiratório, uso de antiagregantes plaquetários ou heparina, assim como o uso de trombolíticos em pacientes selecionados são os principais aspectos enfatizados (Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares, 2001). Boa parte das recomendações já está estabelecida há algum tempo (Farias da Silva, 1972_a) e a ausência de drogas neuroprotetoras recomendadas demonstra a necessidade de novos estudos nesta área, onde a cada dia são publicadas novas descobertas.

2.3. Sintases de óxido nítrico.

O estudo do ON ganhou grande impulso com o isolamento da SON dependente de NADPH e l-arginina a partir de homogenatos de cerebelo de ratos (Bredt e Snyder, 1990). Mais recentemente foi estabelecido que a síntese de ON em mamíferos é mediada por três isoformas da SON, sendo que duas delas dependem de cálcio/calmodulina, estando associadas à formação do chamado fator de relaxamento derivado do endotélio ou EDRF (eSON, ecSON, ou SON III) e transdução de sinais em neurônios centrais e periféricos (nSON, ncSON ou SON I). A terceira isoforma, originalmente isolada e seqüenciada a partir de macrófagos murinos, contém calmodulina mas é totalmente ativa em concentrações normais de cálcio intracelular, sendo sua atividade independente da elevação deste íon (iSON, mSON, SON II). A expressão desta isoforma de SON ocorre em resposta a várias citocinas inflamatórias e pode ser expressa pela maioria das células nucleadas, tendo provavelmente um papel na eliminação de patógenos intracelulares incluindo vírus (Griffith e Stuehr, 1995). A SON catalisa a transformação de l-arginina em l-citrulina e óxido nítrico através de reações de oxidação seqüenciais, necessitando para tanto da presença de NADPH e oxigênio além da ligação de cofatores como FAD e FMN (figura 1). Estudos genéticos têm demonstrado certa homologia entre os diversos subtipos assim como com outras enzimas

como a citocromo P-450 redutase. A estrutura da proteína SON é composta de dois domínios distintos: um redutase (C-terminal) e outro oxigenase (N-terminal), sendo que o último contém heme e liga-se à arginina e o primeiro contém FAD e FMN e liga-se ao NADPH. A ligação da calmodulina ocorre no centro da enzima e modifica sua conformação espacial possibilitando que haja uma aproximação entre os dois terminais e haja a transferência de elétrons necessária à reação (Griffith e Stuehr, 1995). O estudo do funcionamento da SON pode ser feito através de diversos métodos, todos eles com suas vantagens e desvantagens. Pode ser feita determinação direta da atividade da enzima em tecidos homogenizados através da adição de arginina marcada e leitura da quantidade de citrulina marcada produzida, uma vez que a produção de citrulina equivale à produção de ON (relação 1:1 molécula produzida) (Bredt e Snyder, 1990). Outra forma de estimar a produção de ON é a quantificação de seu metabólito, o nitrato, o que pode ser feito através de reações de quimioluminescência. Este e outros métodos estão descritos em publicação recente (Feelisch e Stamler, 1996). Outra forma de determinar a importância das SON em determinadas situações é utilizando os inibidores inespecíficos, como L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) ou específicos como 7-nitroindazol (inibe a forma neuronal) e aminoguanidina (inibe a forma indutível) e verificando a alteração ou não do fenômeno estudado. Outro

recurso elegante é a utilização de animais geneticamente modificados em que se reduziu ou eliminou a expressão de uma determinada isoforma da enzima.

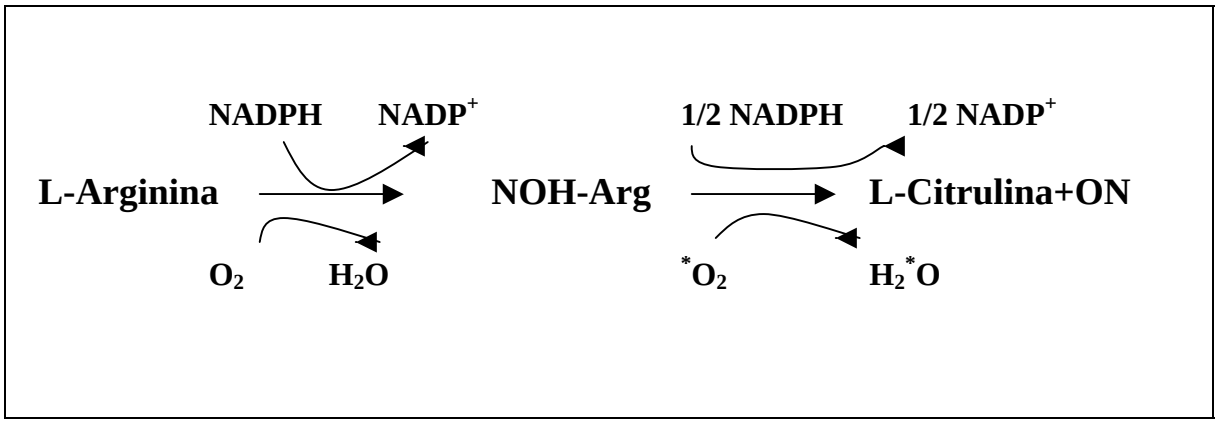

Figura 1. A conversão da L-Arginina em L-citrulina envolve a utilização de NADPH e O_2. Ambas as etapas são mediadas pela sintase de óxido nítrico.

2.4. Óxido nítrico e lesão celular.

A descoberta do ON como um mensageiro molecular difusível e reativo nos sistemas vascular e imunológico motivou a sua busca em outros locais do corpo. O ON foi encontrado em abundância no sistema nervoso central e periférico, e portanto nesses locais (principalmente no encéfalo) se encontra a maior quantidade de SON, a enzima responsável por sua formação. Diversos estudos têm demonstrado que o ON medeia diversas funções fisiológicas neuronais. No sistema nervoso periférico o ON age de forma semelhante aos neurotransmissores clássicos na regulação da motilidade gastrointestinal, fluxo sanguíneo regional e função neuroendócrina (Steiner et al., 1998; Ventura et al., 2002). No encéfalo o ON age como um neuromodulador controlando atividade comportamental, influencia na formação da memória e intensifica resposta a estímulos dolorosos (Zhang e Snyder, 1995). Há evidências de que o ON poderia mediar a plasticidade neuronal, participando nos mecanismos do desenvolvimento e armazenamento de informações no encéfalo, como potenciação de longo prazo no hipocampo e depressão de longo prazo no cerebelo (Schuman e Madison, 1994; Shibuki e Okada, 1991; Son et al., 1996). A biossíntese de ON em tecidos excitáveis não está restrita aos neurônios, tendo sido identificada produção de ON em músculo esquelético, onde regula contratilidade e metabolismo musculares. A síntese de ON em

tecidos excitáveis é regulada por aumento no cálcio intracelular, o qual ativa a SON através da dependência desta em relação à calmodulina (Christopherson e Bredt, 1997). Apesar de pequenas quantidades de ON participarem no funcionamento normal dos tecidos, uma produção excessiva pode mediar lesão tecidual. Isto vem sendo estudado na isquemia cerebral e em outras afecções como doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington, bem como na distrofia muscular de Duchenne (Samdani et al., 1997; Brenman et al., 1995; Christopherson e Bredt, 1997).

A sinalização do ON em tecidos excitáveis requer a chegada rápida e controlada do mesmo a alvos celulares específicos. Outros neurotransmissores são liberados de suas vesículas em terminações sinápticas, e o fim de sua ação se dá pela remoção de sua forma ativa da sinapse, seja pela ação de enzimas ou bombas (Christopherson e Bredt, 1997). No caso do ON a regulação se torna mais complexa devido à sua natureza gasosa, ao mesmo tempo em que sua produção excessiva é tóxica a neurônios e outras células. Portanto, a sinalização deve provocar uma produção rápida e localizada de ON seguida de término imediato na sua biossíntese. Este controle rígido é exercido principalmente na síntese, estando a SON entre as mais reguladas enzimas neuronais. O controle agudo da atividade da nSON é mediado por regulação alostérica, modificação pós-translacional e ação subcelular da enzima. Os

níveis de proteína SON são regulados ainda por alterações na transcrição gênica, o que permite alterações de longa duração nos níveis de ON tissular (Griffith e Stuehr, 1995; Christopherson e Bredt, 1997). A atividade da nSON é regulada primariamente por aumentos locais no cálcio intracelular, o qual estimula a enzima pela sua interação com a calmodulina (Bredt e Snyder, 1990). No encéfalo, o glutamato é o mais eficaz ativador da biossíntese de ON, provavelmente pela sua ação sobre os receptores NMDA, que produzem influxo de cálcio. A nSON é ligada fisicamente ao receptor NMDA através de uma proteína chamada PSD-95, que pode ser mais um possível local de regulação desta enzima (Brenman et al., 1996).

A indução inapropriada de proteína SON no encéfalo e outros tecidos claramente atua como mediadora de lesão em diversos estados patológicos. De maneira semelhante, a estimulação excessiva da SON na sinapse tem o potencial de causar neurotoxicidade no encéfalo. Muitas causas de lesão neuronal são devidas ao excesso de liberação de glutamato, que age na sinapse sobre receptores NMDA para produzir neurotoxicidade, possivelmente através da produção de ON (Dawson et al., 1991). Estudos experimentais em camundongos *knockout* sem expressão de nSON e iSON demonstram que estes têm áreas de isquemia menores em relação aos controles, enquanto os deficientes em eSON mostram infartos maiores o que demonstra um papel

duplo do ON na vigência de isquemia cerebral (Huang et al., 1994; Huang et al., 1996; Iadecola, 1997; Zhao et al., 2000).

A neurotoxicidade do ON é provavelmente causada pelo seu caráter de radical livre, o que torna o ON reativo a certas proteínas com características químicas específicas. A depleção energética celular é uma característica da morte celular associada à isquemia e o ON pode atenuar a fosforilação oxidativa pela inibição de enzimas mitocondriais, como NADH-ubiquinona/oxidoredutase e NADH succinato/oxidoredutase. Também pode inibir a glicólise reagindo com *cis*-aconitase e competindo com oxigênio na citocromo oxidase. Além de reagir com os grupos prostéticos de proteínas o ON também reage com o íon superóxido produzindo peroxinitrito, o qual pode ser responsável por grande parte de sua toxicidade (Figura 2). O peroxinitrito é um poderoso oxidante, sendo estável para se difundir através da célula e reagir com diversas proteínas levando à depleção energética e lesão do citoesqueleto (Beckman e Koppenol, 1996; Zhang e Snyder, 1995).

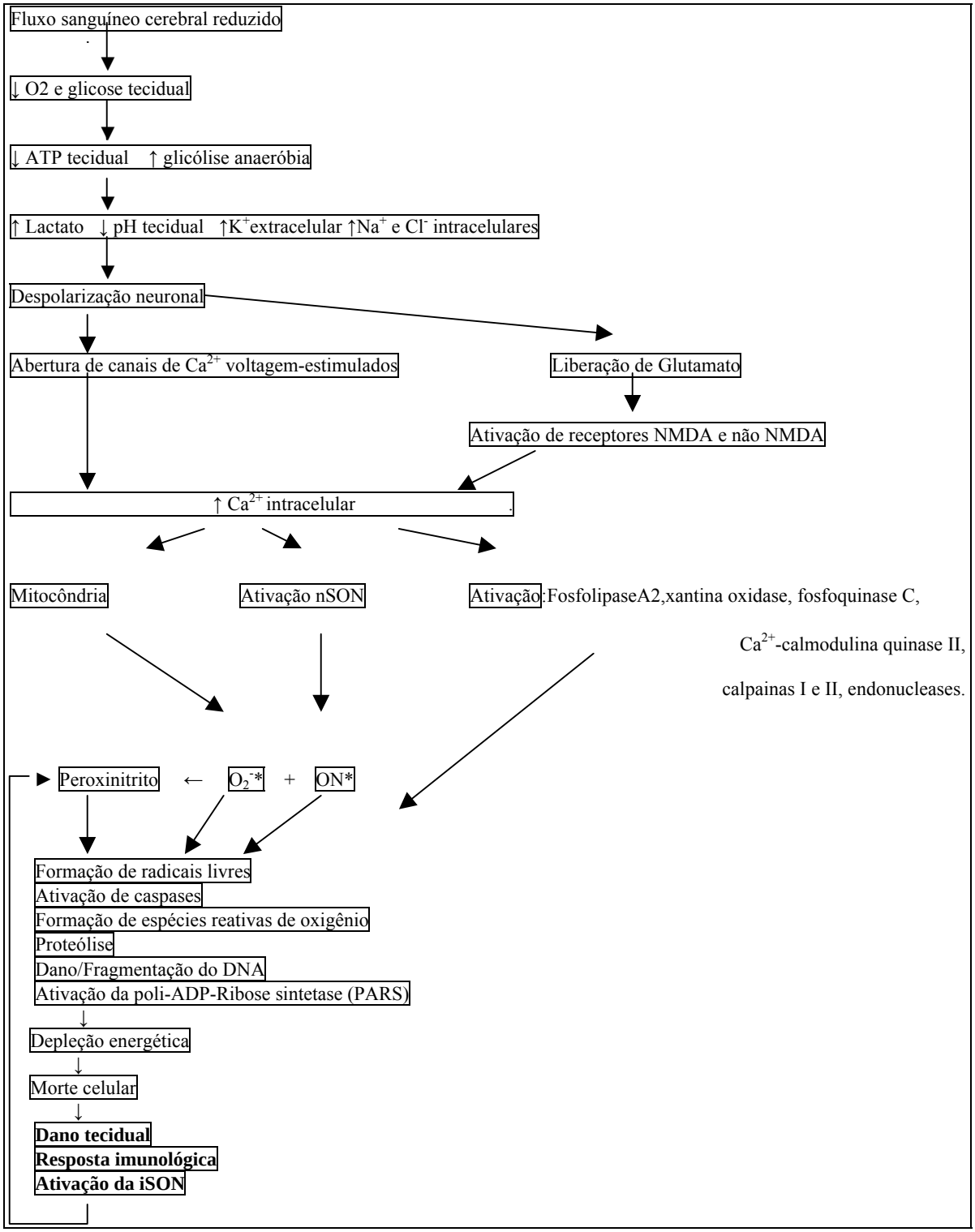

Figura 2. Mecanismos de dano tecidual na isquemia (modificado de Samdani et al., 1997).

2.5. Modelos experimentais de isquemia cerebral

O estudo da isquemia cerebral em animais é fundamental para possibilitar o desenvolvimento desta área do conhecimento, pois permite um controle adequado das múltiplas variáveis envolvidas. Diversas espécies de animais podem ser utilizadas, como macacos, coelhos, gatos, cães e roedores. Estes últimos, pela relativa facilidade de obtenção e manuseio, são sem dúvida os mais utilizados. Os modelos de isquemia podem utilizar métodos que simulam a isquemia global, onde haveria falta de circulação em todo o encéfalo, ou focal, onde apenas um território vascular seria afetado (Colli et al., 1998).

A circulação cerebral do rato apresenta rede importante de colaterais, que envolve o polígono de Willis, anastomoses entre os ramos corticais do sistema carotídeo e anastomoses entre os sistemas carotídeo interno e externo. Isto confere ao rato uma grande proteção contra isquemia cerebral. Algo semelhante ocorre em seres humanos. Vários modelos foram descritos para isquemia experimental em ratos, como oclusão da artéria cerebral média (ACM) por craniectomia e coagulação direta, oclusão da ACM associada à ligadura das carótidas comuns, oclusão da ACM por filamento intraluminal, trombose arterial induzida por processo fotoquímico, embolização com microesferas, ar ou coágulos sanguíneos; todos estes modelos de isquemia

focal. Entre os modelos de isquemia global, podemos citar a oclusão temporária das carótidas comuns seguida de hipotensão arterial sistêmica, ou precedida de ligadura das vertebrais, e isquemia por compressão de um ou ambos hemisférios cerebrais.

Outro animal que pode ser utilizado para experimentos com isquemia cerebral é o gerbil (*Meriones unguiculatus*), um roedor do deserto. Este animal apresenta uma pobreza de circulação colateral, sendo bastante susceptível à isquemia cerebral através da ligadura da carótida comum, o que teria maior facilidade técnica em relação aos métodos anteriormente citados (Levine e Payan, 1966; Yoshimine e Yanagihara, 1983). Vem sendo bastante utilizado para o estudo de isquemia de curta duração, seja focal ou global (Kohno et al., 1997; O`Neill et al., 2000; Kitagawa et al., 2000; Calapai et al., 2000; Jin et al., 2002).

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo verificar a atividade da sintase de óxido nítrico e correlacionar sua inibição com possível déficit neurológico induzido pela isquemia cerebral focal em modelos experimentais em roedores.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 13 gerbils adultos do sexo masculino com peso em torno de 90g, submetidos à técnica de ligadura da carótida comum direita, e 15 ratos Wistar adultos do sexo masculino com peso em torno de 300g que foram submetidos à oclusão da artéria cerebral média direita. Todos os animais recebiam ração padrão do biotério e acesso ilimitado à água. Após o procedimento cirúrgico e o tempo de isquemia os animais eram sacrificados por decapitação, sendo retirados os encéfalos e congelados a $-70^{o}C$. Neste momento eram também obtidas amostras de plasma. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas para pesquisa em animais do laboratório de Neuroendocrinologia do departamento de Fisiologia da FMRP-USP conforme a lei 6638, de 08/05/1979 e declaração universal dos direitos dos animais da UNESCO, de 27/01/1978.

4.2. Técnica cirúrgica

Os animais submetidos à ligadura da artéria carótida comum (gerbil) eram anestesiados com tionembutal na dose de 400mg/kg intraperitoneal, colocados em decúbito dorsal, sendo feita incisão de cerca de 0,5 cm na região cervical e dissecção da artéria carótida comum direita com o auxílio de um microscópio cirúrgico. A artéria era então ligada com fio de algodão 4-0, sendo observada a interrupção do fluxo por visão direta no microscópio. A pele era fechada com sutura simples com algodão 4-0 e o animal era levado a uma gaiola com aquecimento para recuperação anestésica.

Os ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média foram anestesiados com uretana a 25% na dose de 1g/kg intraperitoneal, posicionados em decúbito dorsal, sendo feita incisão mediana longitudinal anterior de 3 cm em região cervical, dissecção microcirúrgica da artéria carótida comum direita e seus ramos, sendo ligada a artéria carótida externa e feita clipagem das artérias carótida comum, pterigopalatina e carótida interna. A artéria carótida externa era seccionada para introdução do filamento de nylon 4-0 com a ponta previamente aquecida (formando um expessamento de 0,3 mm) o qual era introduzido na direção da carótida interna intracraniana até ser notada resistência à progressão do mesmo. Este ponto correspondia em geral à introdução de 19 a 20mm do fio a partir da bifurcação carotídea, e

provocava a oclusão da emergência da artéria cerebral média. O fio era então fixado à artéria carótida comum, sendo a mesma ligada. A pele era fechada com sutura simples com fio de algodão 3-0 e o animal levado à gaiola de recuperação.

4.3. Grupos experimentais.

No experimento utilizando gerbil, os animais foram divididos em dois grupos, ambos com tempos de isquemia de 6 horas (n=13): grupo L-NAME (n=7), que recebia este inibidor da SON na dose de 10 mg/kg intraperitoneal 30 minutos antes da oclusão da artéria carótida, e grupo controle (n=6) que recebia o veículo NaCl 0,9%. Todos os animais deste grupo foram avaliados neurologicamente antes do sacrifício através de uma escala de 0 a 5 (Bederson et al., 1986; Sauter e Rudin, 1986; Menzies et al., 1992):

0-sem movimento;

1-círculo contralateral espontâneo;

2-movimento espontâneo em todas as direções; círculo contralateral só quando elevado pela cauda;

3-redução da força de preensão da pata anterior contralateral quando puxado pela cauda;

4-Flexão contralateral da pata anterior;

5-mobilidade normal, sem déficits aparentes.

Os ratos foram subdivididos em 3 grupos com intervalos de tempo da isquemia de 15 minutos (n=3), 1h (n=8) e 24h (n=8). Somente o grupo de 24h pôde ser submetido à avaliação neurológica, devido ao tempo do anestésico.

4.4. Preparação dos tecidos.

Os cérebros congelados eram submetidos a um corte padronizado no nível da eminência mediana hipotalâmica, com 2 mm de expessura, do qual eram obtidas as amostras teciduais através de um *punch* no território de irrigação da artéria cerebral média (*core* isquêmico), e de região homóloga contralateral (controle). Estas amostras foram utilizadas para determinações da atividade enzimática da SON e concentrações do nitrato e das proteínas, após homogenização em 150µl de solução de Hepes 20mM.

4.5. Atividade da SON.

A determinação da atividade da SON era realizada a partir de uma alíquota de 90µl do homogenato tissular, à qual era adicionada 450µl de solução de Hepes 20mM com 1,25mM de cloreto de cálcio e DL-DTT 1mM além de tetrahidrobiopterina (0,314mg/ml). Adicionava-se à solução NADPH 120µM e (^{14}C)-L-arginina (270mCi/mmol), incubando-se por 15 minutos em banho à temperatura de 37^{o}C, sob ambiente com 95% O_2 e 5% CO_2, e agitação de 60 ciclos/min. Após este período os tubos eram imediatamente transferidos para uma centrífuga refrigerada e centrifugado a 1.000g por 10 minutos. Os sobrenadantes eram imediatamente aplicados no topo de uma coluna de Dowex AG 50W-X8 previamente preparada e eluída com 2,5 ml de água MiliQ (bi-destilada). Todo o diluído coletado de cada coluna era misturado a um coquetel de cintilação e levado para um contador de cintilação beta. Este media a quantidade de citrulina marcada produzida, que reflete a produção de ON por tecido por 15 minutos.

4.6. Nitrato.

A determinação da concentração de nitrato tissular foi feita utilizando-se o analisador de ON, segundo método descrito por Hampl e colaboradores (1996). Uma alíquota do homogenato (50µl) era retirada e adicionada a etanol (100µl) e deixada por 30 minutos em refrigeração a 4^{o}C. Após este período a solução era centrifugada a 1.000g por 10 minutos e uma alíquota de 5µl do sobrenadante era retirada e colocada na câmara de reação do analisador de ON. O nitrato da amostra reage com o cloreto de vanádio formando ON que por sua vez reage com o O_3 contido na câmara de reação formando dióxido de nitrogênio. Este se apresenta numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma fotomultiplicadora dando origem a uma corrente elétrica que é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico digital, originando o traçado gráfico. O cálculo da área sob a curva é feito pelo próprio programa do aparelho, que converte em concentração pela comparação com amostras de concentração conhecida previamente injetadas.

4.7. Proteína.

A dosagem de proteína tissular foi feita através de espectrometria de massa (metodologia BIO RAD), onde uma alíquota (10µl) do homogenato era adicionada em uma placa de leitura a 200µl do reagente BIO RAD e após 5 minutos era feita medida no leitor de microplaca em 595nm. A concentração de proteína foi utilizada para poder calcular a atividade enzimática, uma vez que a mesma depende da quantidade de proteína no tecido.

4.8. Análise estatística.

Para análise dos resultados encontrados foi utilizado o programa de análise estatística *GraphPadPrism 3.0* sendo realizado teste t de Student ou análise de variâncias (ANOVA) para comparação de múltiplos grupos com pós-teste de Tukey. Os dados estão expressos em média ± erro padrão, e a significância estatística admitida com $p<0,05$.

RESULTADOS

5.1. Experimentos com gerbil

Todos os animais de ambos os grupos – controle e tratados com L-NAME – apresentavam déficit motor das patas contralaterais, tendência à rotação e redução do reflexo de direcionamento quando estimuladas as vibrissas e queda da orelha ipsilateral, indicando que o procedimento experimental foi eficaz em produzir isquemia cerebral. Também observou-se semi-ptose palpebral direita , que indicava ter havido lesão do simpático no momento da ligadura da carótida direita. Na figura 3 observa-se o escore obtido no exame neurológico dos animais após oclusão da artéria carótida comum direita no grupo controle e no grupo tratado com L-NAME previamente à oclusão arterial. Seis horas após o procedimento, o grau do déficit neurológico foi pior no grupo que recebeu o inibidor da SON (0,67 ± 0,21; n=7) quando comparado ao grupo controle (3,43 ± 0,89; n=6; p=0,0179).

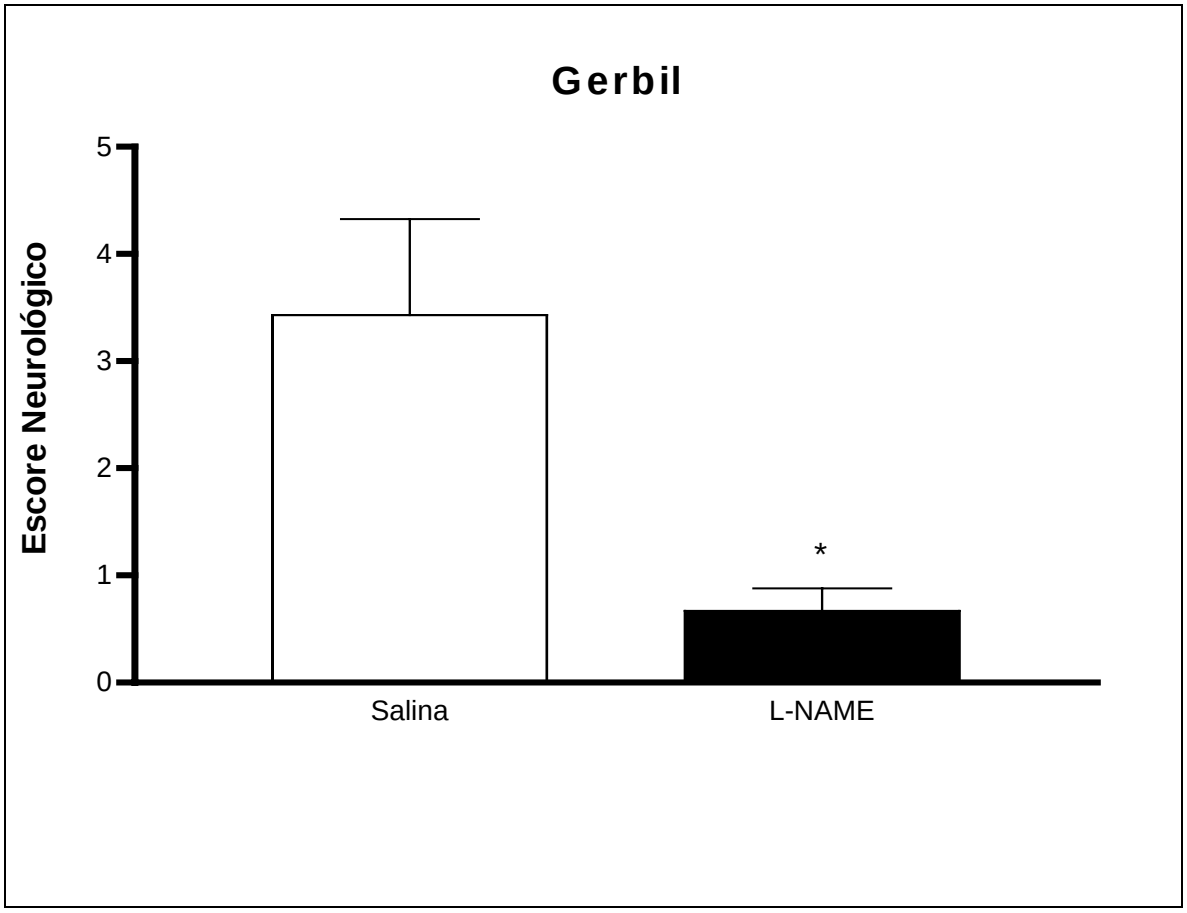

Figura 3. Escore neurológico observado 6 horas após oclusão da artéria carótida comum direita em gerbil. **p*<0,05 em relação ao grupo tratado com salina.

A figura 4 mostra os resultados da atividade da SON determinada nos tecidos cerebrais após oclusão carotídea por um período de 6 horas (expressa em pmol de citrulina por mg de proteina por 15 minutos). Não houve diferença estatística (p=0,3751) da atividade da SON, embora houvesse atividade menor no hemisfério isquêmico (126,58 ± 33,72 pmol/mg/15 min *versus* 175,21 ± 28,09 pmol/mg/15 min no controle). O tratamento com L-NAME foi eficaz em reduzir a atividade da SON cerebral em ambos hemisférios: controle (74,64 ± 8,37 pmol/mg/15 min) e isquêmico (74,44 ± 11,75 pmol/mg/15 min), conforme demonstra a figura 4.

A figura 5 mostra as concentrações de nitrato tecidual encontradas nos tecidos cerebrais (controle, 16,83 ± 2,77 mM no hemisfério isquêmico *versus* 14,52 ± 1,71 mM no hemisfério não isquêmico, p=0,5042; L-NAME, 16,89 ± 1,74 mM no hemisfério isquêmico *versus* 16,23 ± 2,00 mM no hemisfério não isquêmico, p=0,8114). Não houve diferença estatística entre as concentrações de nitrato do hemisfério controle e do que sofreu isquemia por seis horas, tanto no grupo que recebeu salina como no grupo tratado com L-NAME .

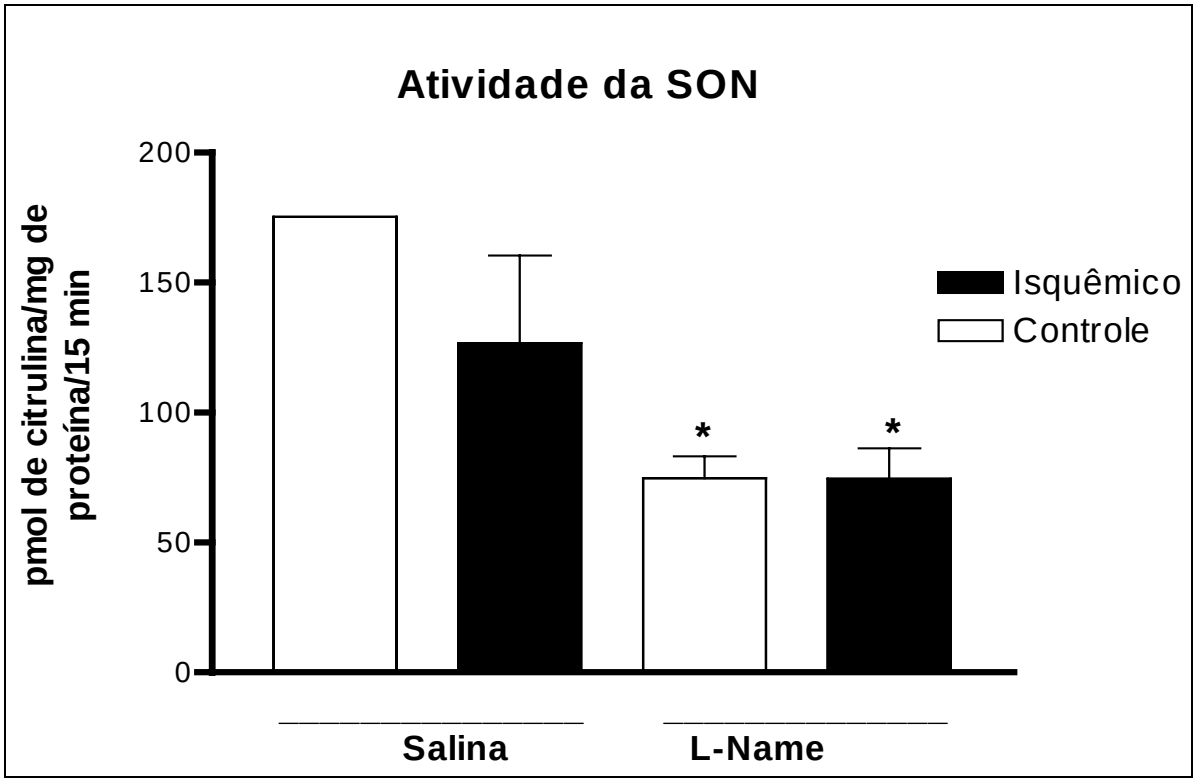

Figura 4. Atividade da sintase de óxido nítrico em tecidos cerebrais (isquêmico e controle) de gerbil 6h após oclusão da artéria carótida comum direita nos dois grupos de animais: grupo tratado com solução salina e grupo que recebeu o inibidor da SON (L-NAME). * $p<0,05$ em relação ao hemisfério controle do grupo tratado com salina.

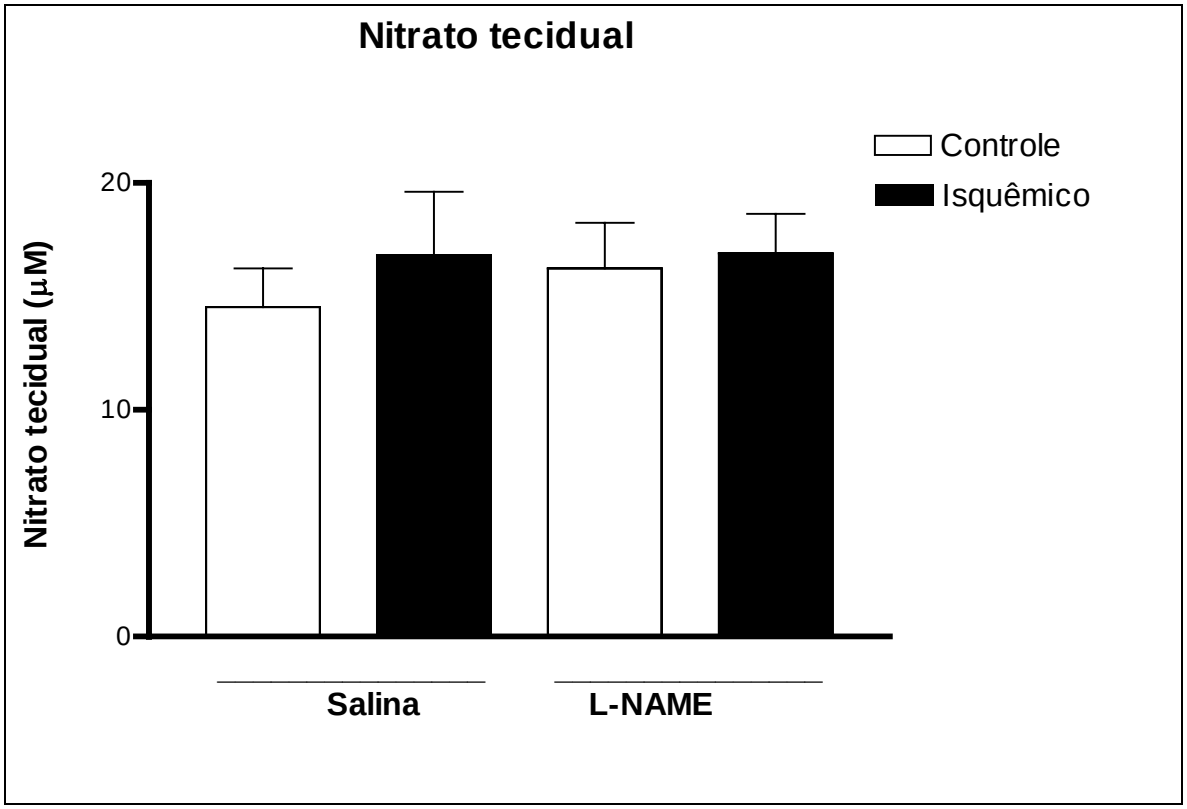

Figura 5. Concentrações do nitrato tissular encontradas nos hemisférios cerebrais (controle e isquêmico) de gerbils submetidos a 6h de isquemia por oclusão da artéria carótida comum direita. Não houve diferença estatística entre os grupos.

A figura 6 apresenta as concentrações plasmáticas de nitrato. As concentrações de nitrato plasmático não apresentavam diferença significativa do ponto de vista estatístico entre os grupos controle e tratado com L-NAME (grupo controle: 12,13 ± 1,55μM; n=7; grupo tratado com L-NAME: 10,29 ± 1,47μM; n=6; *p*=0,4084).

A figura 7 apresenta a correlação entre a atividade da SON no hemisfério isquêmico, representada no eixo das ordenadas, e o escore neurológico (eixo das abscissas) em gerbils submetidos à isquemia cerebral por oclusão carotídea. A baixa inclinação da reta demonstra uma falta de correlação entre o escore neurológico e a atividade da SON no hemisfério isquêmico (*slope*=7,591; r^2=0,06146; *p*=0,3730).

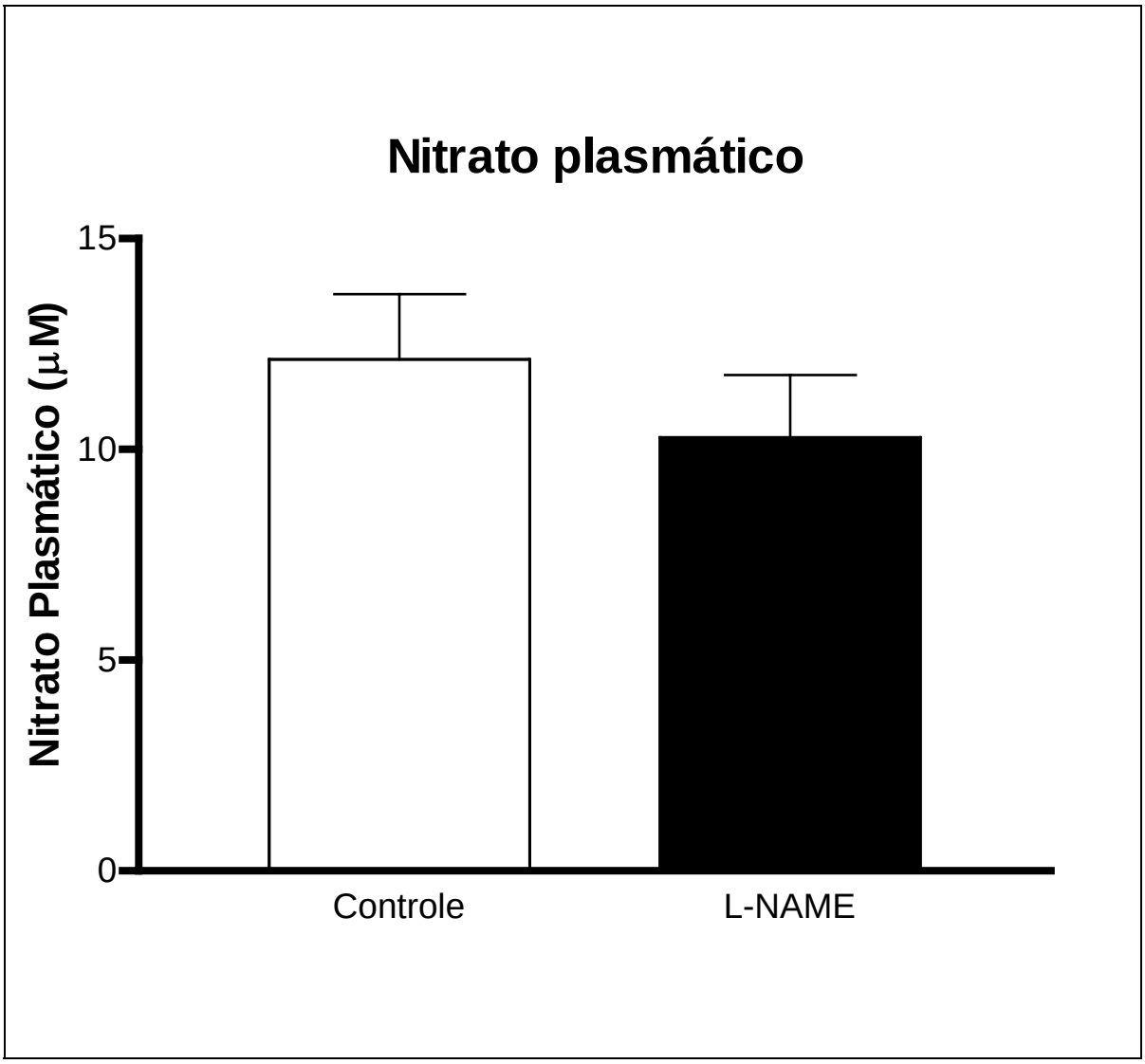

Figura 6. Concentrações do nitrato plasmático de gerbils 6h após oclusão da artéria carótida comum direita. *p*=0,4084.

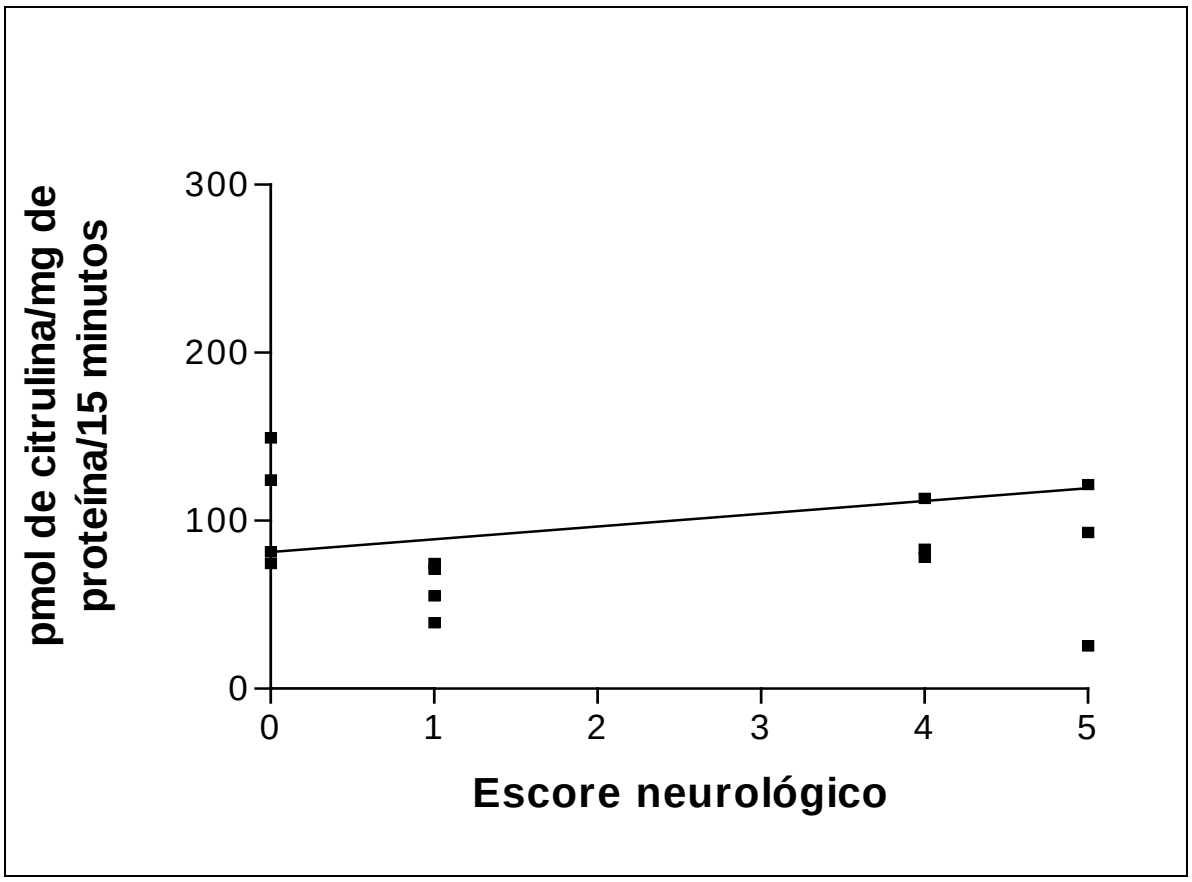

Figura 7. Correlação da atividade da sintase de óxido nítrico do hemisfério isquêmico x escore neurológico em gerbils submetidos a 6h de isquemia por oclusão da artéria carótida comum direita. Não há correlação significativa entre as duas variáveis.

5.2. Experimentos com ratos.

A atividade da SON em ratos submetidos a isquemia cerebral está representada nas figuras 8, 9 e 10. A figura 8 mostra a atividade da SON (em pmoles de citrulina por mg de tecido por 15 minutos) nos hemisférios cerebrais de ratos submetidos à isquemia cerebral por oclusão filamentar da artéria cerebral média durante 15 minutos. Houve uma atividade menor da SON no hemisfério isquêmico (160,06 ± 8,03 pmol/mg/15min) em relação ao hemisfério controle contralateral (226,01 ± 1,23 pmol/mg/15min; média das diferenças: -65,95; I.C.95%: -36,66 a –95,24; *p*=0,0105 n=3).

A figura 9 mostra a atividade da SON nos hemisférios cerebrais de ratos submetidos à isquemia cerebral por uma hora. Observa-se uma atividade ligeiramente maior da SON no hemisfério isquêmico, embora estatisticamente não significante (hemisfério isquêmico, 174,72 ± 20,42 pmol/mg/15min; hemisfério controle, 147,95 ± 17,14 pmol/mg/15min; média das diferenças: 26,77; I.C.95%: -14,25 a 67,78; *p*=0,1667; n=8).

A figura 10 mostra a atividade da SON nos hemisférios cerebrais de ratos submetidos à isquemia cerebral por oclusão filamentar da artéria cerebral média por 24 horas. Observa-se uma atividade maior da SON no hemisfério isquêmico, embora estatisticamente não significante (hemisfério isquêmico, 271,92 ± 16,14 pmol/mg/15min; hemisfério controle, 196,78 ± 30,73

pmol/mg/15min; média das diferenças: 75,14; I.C.95%: -25,14 a 175,4; *p*=0,0972; n=4).

As figuras 11, 12 e 13 mostram as concentrações teciduais de nitrato nos hemisférios cerebrais dos ratos submetidos à isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média. Os três grupos experimentais encontram-se representados: 15 minutos (figura 11), 1 hora (figura 12) e 24 horas (figura 13) de isquemia. As concentrações de nitrato são menores nos hemisférios isquêmicos aos 15 minutos (4,37 ± 0,57 μM *versus* 10,59 ± 0,44 μM do hemisfério controle, *p*=0,0004 ; n=3), tornando-se discretamente maiores nos grupos de 1 hora (8,39 ± 0,83 μM *versus* 6,59 ± 0,63 μM do hemisfério controle, *p*=0,0806; n=8) e 24 horas (7,55 ± 0,62 μM *versus* 7,25 ± 1,19 μM do hemisfério controle, *p*=0,8294; n=4), sendo o aumento observado nos dois últimos grupos não significativo do ponto de vista estatístico.

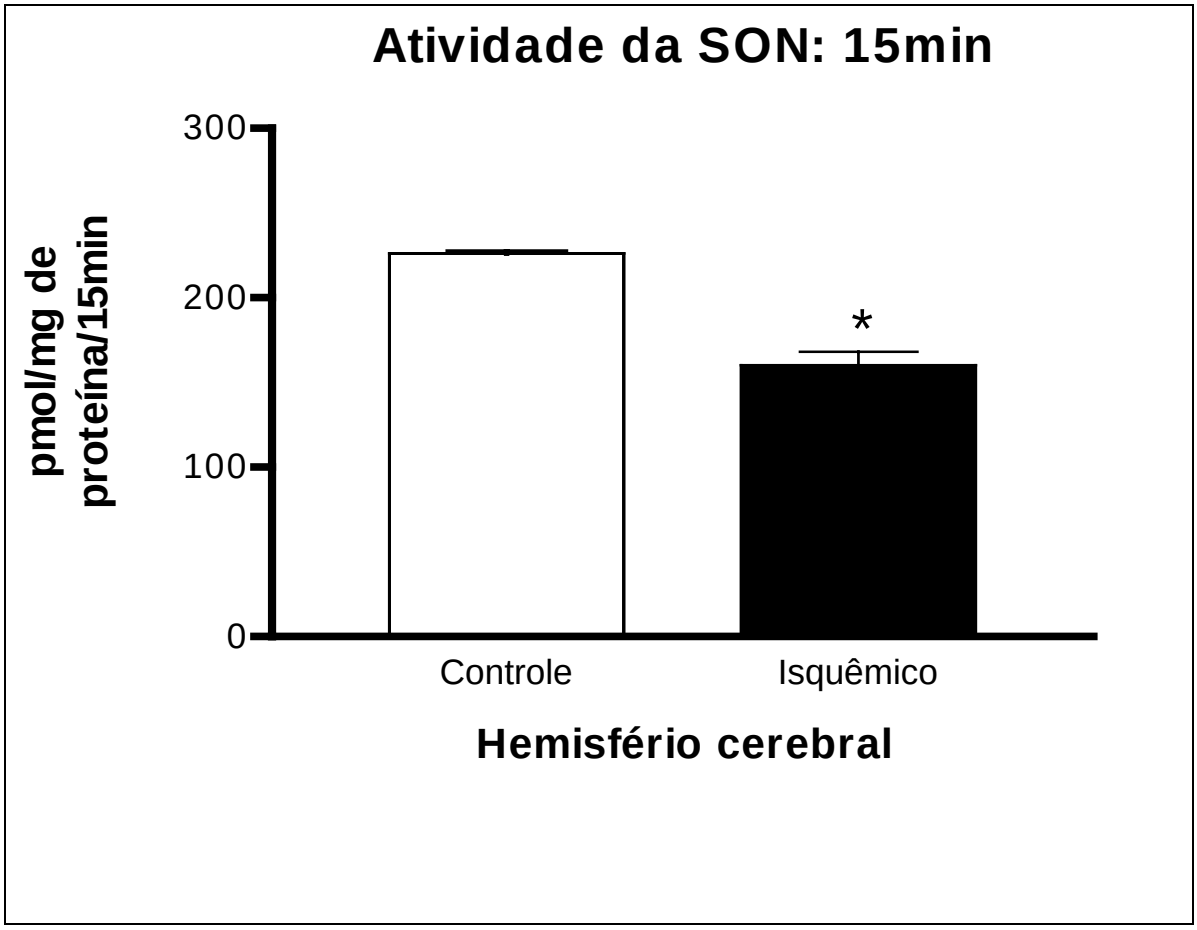

Figura 8. Atividade da sintase de óxido nítrico em hemisférios cerebrais de ratos submetidos a 15 minutos de isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média direita. *p<0,05 em relação ao hemisfério controle.

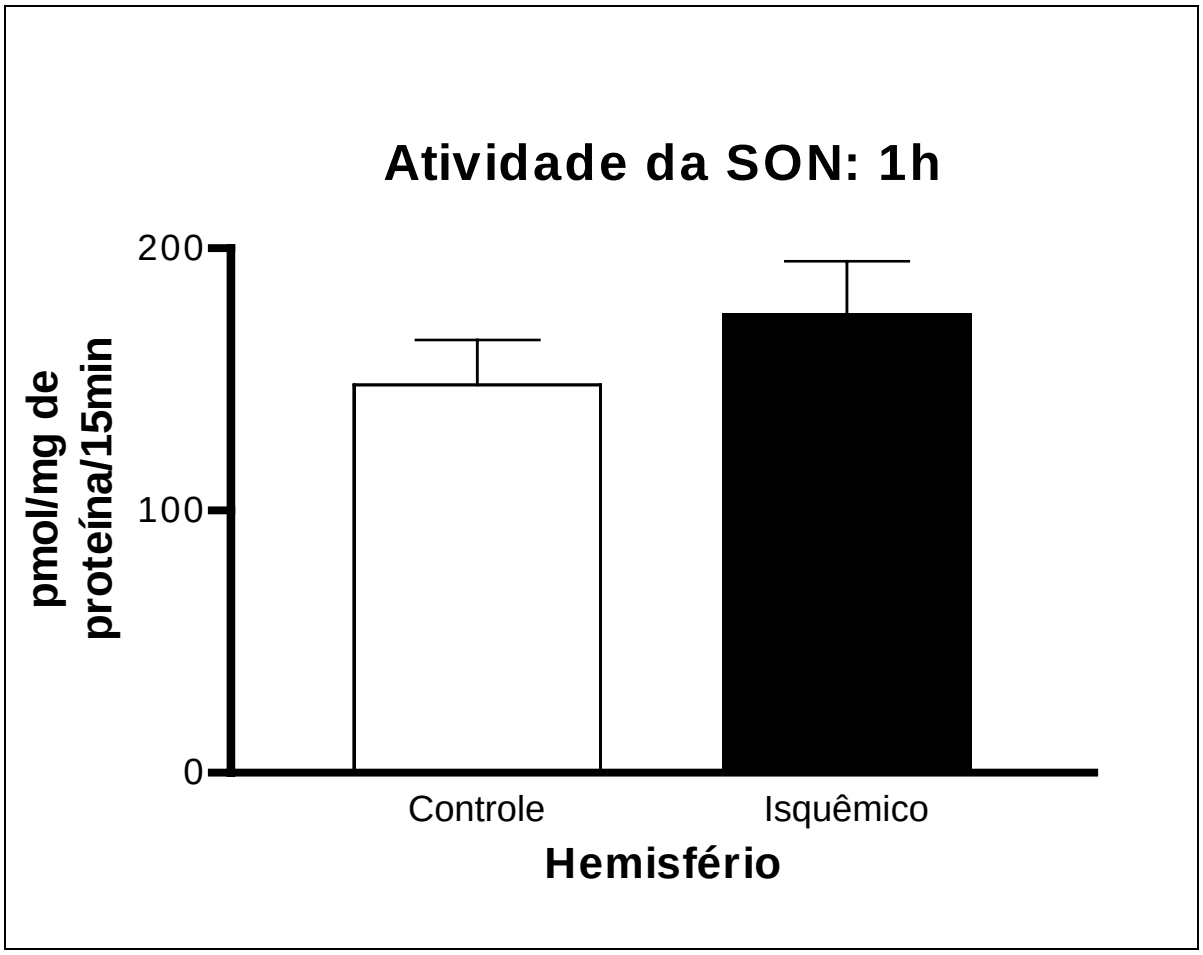

Figura 9. Atividade da sintase de óxido nítrico em hemisférios cerebrais de ratos submetidos a 1 hora de isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média direita. Não houve diferença estatística entre os grupos.

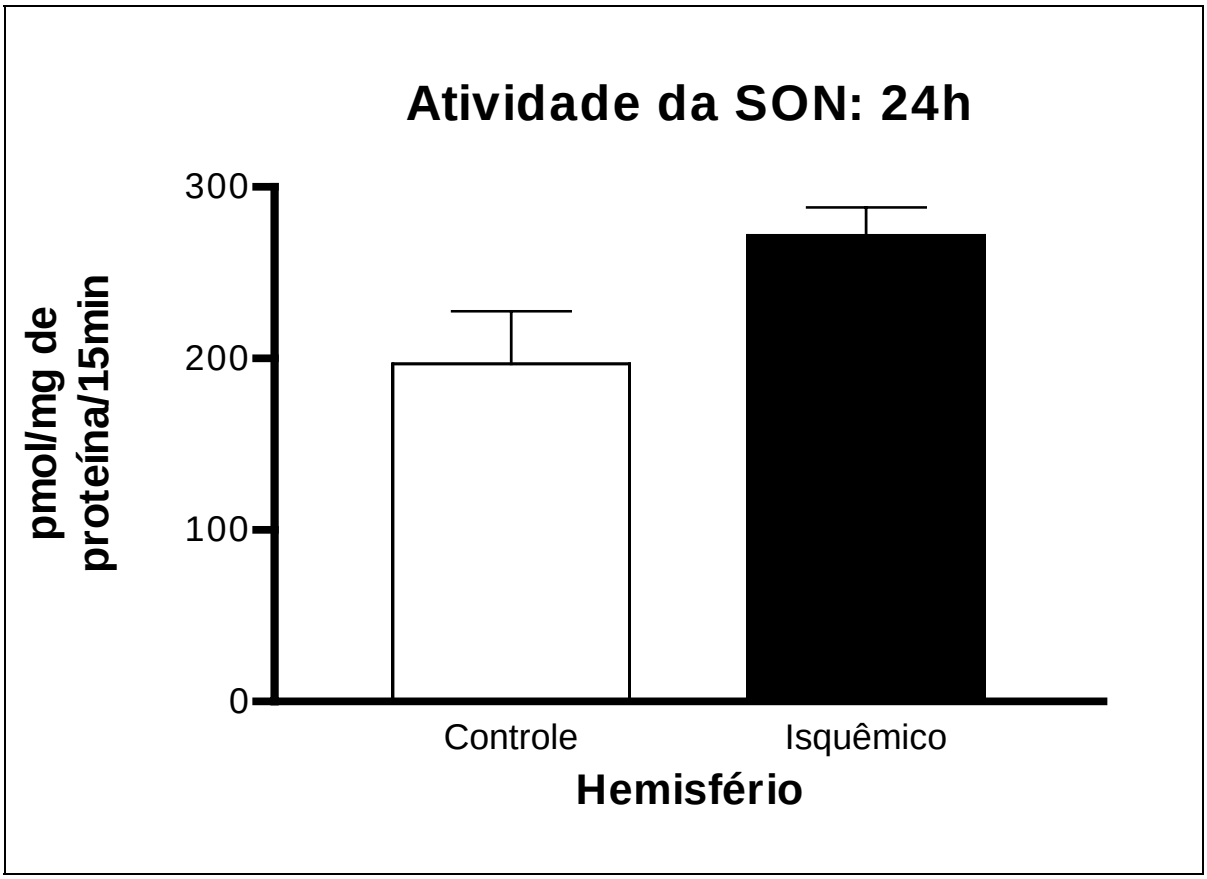

Figura 10. Atividade da sintase de óxido nítrico em hemisférios cerebrais de ratos submetidos a 24 horas de isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média direita. Não houve diferença estatística entre os grupos.

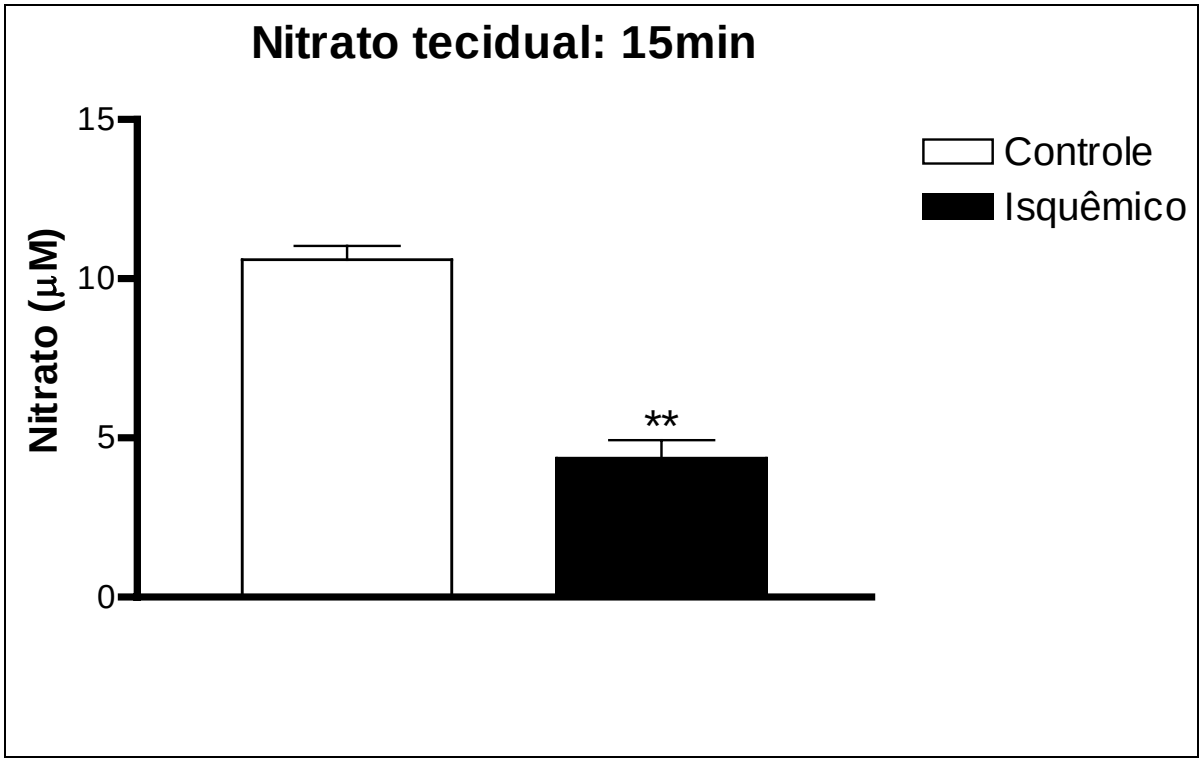

Figura 11. Concentração de nitrato em hemisférios cerebrais de ratos submetidos a 15 minutos de isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média direita. ***p*<0,01 em relação ao hemisfério controle.

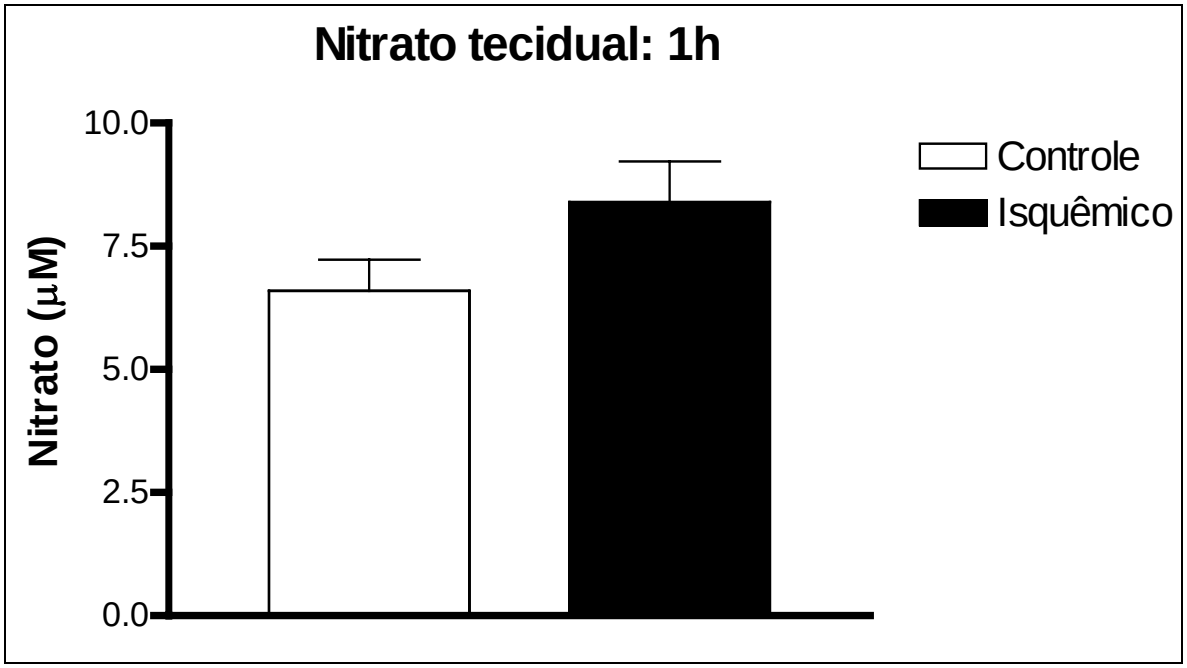

Figura 12. Concentração de nitrato em hemisférios cerebrais de ratos submetidos a 1 hora de isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média direita. Não houve diferença estatística entre os grupos.

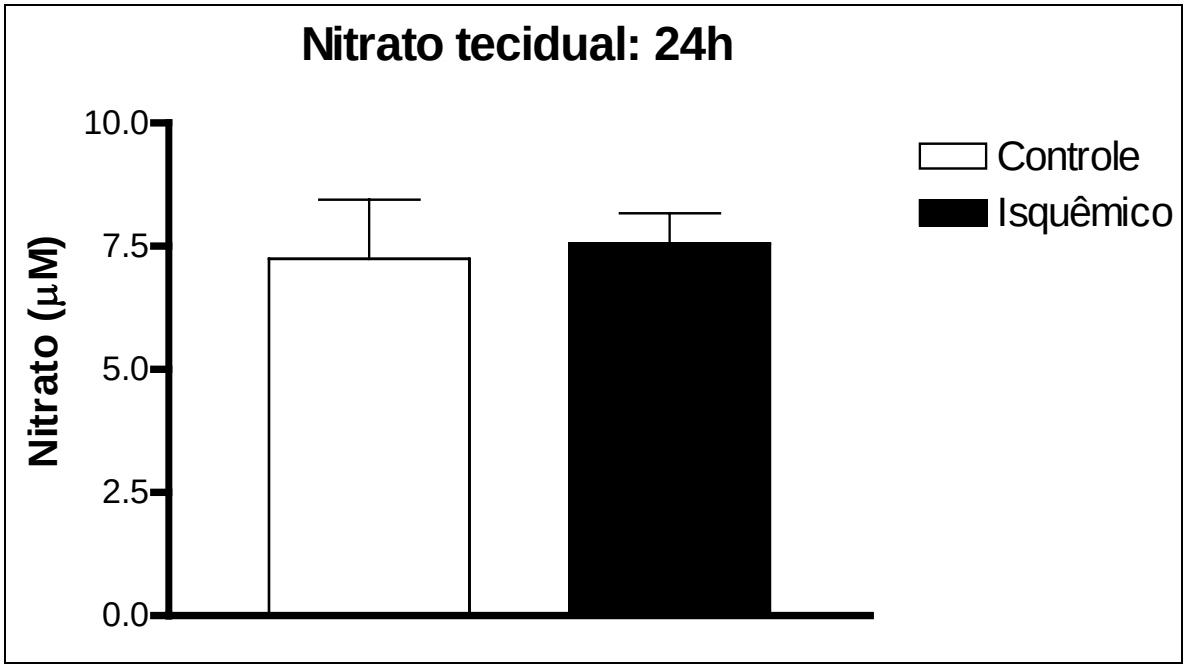

Figura 13. Concentração de nitrato em hemisférios cerebrais de ratos submetidos a 24 horas de isquemia por oclusão filamentar da artéria cerebral média direita. Não houve diferença estatística entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a isquemia cerebral provoca alteração na atividade das sintases de óxido nítrico aos 15 minutos e que o ON endógeno protege o sistema nervoso central da lesão isquêmica, como demonstrado pelos experimentos realizados. Outros estudos trazem observações semelhantes (Ashwal et al., 1998; Endres et al., 1998). Alguns autores enfatizam que abordagens farmacológicas e genéticas contribuiram para o conhecimento da função do óxido nítrico e das diferentes isoformas de SON na isquemia cerebral focal, sendo a nSON e a iSON mediadores da neurodegeneração e a eSON importante na manutenção do fluxo sanguíneo cerebral e portanto neuroprotetora (Samdani et al., 1997).

A influência do ON sobre o fluxo sanguíneo cerebral tem sido estudada em modelos animais. Em camundongos com deleção do gene responsável pela expressão da nSON a inalação de CO_2 aumenta o fluxo sanguíneo cerebral de forma semelhante à espécie selvagem, entretanto o bloqueio da SON não compromete esta resposta o que sugere que há mais mecanismos envolvidos nesta regulação (Irikura et al., 1995). A atividade tônica em fibras nitrérgicas perivasculares em estreita proximidade a microvasos parenquimatosos pode

ser uma fonte de tônus dilatador dentro do parênquima (Brown et al., 2000). O ON tem sido implicado como modulador da elevação do fluxo sanguíneo cerebral em resposta a acetazolamida em ratos (Tuettenberg et al., 2001). A dilatação de artérias cerebrais de ratos submetidas a concentrações elevadas de potássio pode ser bloqueada pela inibição da SON com inibidores inespecíficos, sendo restaurada com doadores de ON, sugerindo que o ON teria uma ação moduladora neste fenômeno. A inibição da guanilato-ciclase elimina esta resposta, indicando que este mecanismo pode ser GMP-cíclico dependente (Schuh-Hofer et al., 2001). A liberação de ON basal do endotélio teria um papel permissivo na resposta induzida pela elevação de potássio e da osmolalidade (Golding et al., 2001). A acidose induz dilatação de arteríolas cerebrais por mecanismos que envolvem a produção de ON endotelial e canais de potássio sensíveis ao ATP (Horiuchi et al., 2002). Estudos em ratos sugerem que a alcalinização intracelular produzida pela ativação da bomba de troca Na^+/ H^+ pode exacerbar a produção de ON no endotélio, contribuindo para as respostas de vasodilatação (Kitazono et al., 2001).

Embora a eSON seja a principal responsável pela regulação do fluxo sanguíneo cerebral, alguns estudos demonstram que mesmo atividades residuais da SON no encéfalo podem ser suficientes para produzir o tônus dilatador cerebrovascular mediado pelo ON (Kelly et al., 2000) e que a nSON

contribui de maneira significativa para o efeito relaxante da acetilcolina sobre artérias basilares de ratos, indicando a importância desta isoforma no endotélio cerebrovascular (Benyó et al., 2000).

Outros trabalhos relatam não haver suporte para um papel primário do ON na hiperemia funcional do córtex de ratos, sugerindo que resultados divergentes possam ser devidos ao regime anestésico empregado (Gerrits et al., 2001). Estudos em seres humanos demonstraram que a administração de L-NMMA, um inibidor inespecífico da SON, por via carotídea reduziu modestamente o fluxo sanguíneo regional, sugerindo que o tônus basal dos vasos de resistência cerebral pode ser relativamente insensível à inibição da SON (Joshi et al., 2000). A administração de nitroprussiato pela mesma via não elevou o fluxo sanguíneo cerebral, mesmo em doses capazes de provocar hipotensão arterial durante a recirculação, levando à dúvida em relação ao verdadeiro significado do ON na circulação cerebral humana (Joshi et al., 2002).

Os resultados por nós encontrados mostram que a inibição da SON pelo L-NAME piorou o déficit neurológico em gerbils submetidos a 6 horas de isquemia por ligadura de carótida. Uma possível explicação seria que a SON e o ON produzido teriam função protetora durante o período da isquemia. Por outro lado, outros autores relataram um efeito protetor do L-NAME (em doses

menores) no momento da reperfusão em modelo de oclusão filamentar da artéria cerebral média em camundongos, indicando uma possível ação deletéria do ON na lesão de reperfusão (Gürsoy-Özdemir et al., 2000). O efeito da manipulação dos sistemas de produção de ON vem sendo relatado por vários autores, assim como as descobertas de substâncias que exercem sua ação através de mecanismos dependentes do ON. Estudos utilizando ratos e camundongos submetidos à oclusão filamentar da artéria cerebral média demonstraram uma redução na área de infarto pela 4-fenil-1-(4-fenilbutil) piperidina (PPBP, um inibidor da liberação de glutamato), associada à redução na produção de ON cerebral, de maneira semelhante ao 7-nitroindazol (inibidor específico da nSON), sendo que o uso combinado das duas substâncias não propiciava maior redução da região isquêmica. Os autores sugeriram que o mecanismo de neuroproteção do PPBP *in vivo* seria através da atenuação da atividade da nSON e da produção de ON induzida pela isquemia (Goyagi et al., 2001).

O consumo crônico de álcool reduz a dilatação de artérias vertebrobasilares de ratos mediada por mecanismos SON-dependentes, e a aplicação de superóxido dismutase pode restaurar esta resposta, sugerindo a participação de radicais livres no fenômeno (Sun e Mayhan, 2001). Em modelos de oclusão da artéria cerebral média em ratos há evidências de que a

hiperglicemia resulta em um aumento precoce e concomitante na produção de superóxido e ON, o que poderia levar à formação de peroxinitrito e reação deste com resíduos-tirosina, sugerindo que a isquemia hiperglicêmica contribui à indução precoce de enzimas envolvidas na biodisponibilidade de ON (Ste-Marie et al., 2001). O estudo dos efeitos do ON na produção de espécies reativas de oxigênio e tamanho do infarto após lesão de reperfusão, utilizando modelos em coelhos e ratos, mostra que o uso de doadores de ON melhora o efeito da reperfusão precoce após isquemia sugerindo uma ação de varredura de radicais livres pelo ON (Pluta et al., 2001).

O tratamento profilático com simvastatina, lovastatina ou mevastatina aumenta o fluxo sanguíneo cerebral, reduz a área de infarto e melhora a função neurológica em camundongos normocolesterolêmicos. O mesmo não ocorre em animais com deficiência na expressão da eSON, o que sugere ser o aumento da expressão desta isoforma enzimática o principal mecanismo de neuroproteção e efeito antiinflamatório destas substâncias (Endres et al., 1998; Blake e Ridker, 2000; Amin-Hanjani et al., 2001).

Estudos imunohistoquímicos demonstram uma elevação na expressão da SON na área de isquemia (semelhante para as formas neuronal e endotelial), porém só a eSON mostra aumento na chamada zona de penumbra,

o que pode indicar uma função protetora para a eSON contra dano isquêmico adicional (Leker et al., 2001).

O uso de inibidores específicos da isoforma iSON como a aminoguanidina eliminou o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento anestésico com isoflurano ou halotano em ratos, indicando a participação desta isoforma no mecanismo (Kapinya et al., 2002). O uso da aminoguanidina tem um efeito neuroprotetor em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média, porém a inibição da iSON não parece ser o único mecanismo envolvido (Cash et al., 2001).

A análise da atividade da SON em ratos submetidos a períodos variados de isquemia mostra achados interessantes. Resumidamente poderíamos dizer que (excetuando os primeiros quinze minutos) a atividade da SON não se altera durante o período isquêmico, até 24 horas após o mesmo, porém o presente estudo não esclarece se há alterações em subtipos específicos da SON. Estudos prévios têm demonstrado que a expressão da iSON no cérebro normal é mínima, sendo induzida após determinados estímulos como a isquemia (Iadecola et al., 1996; Nathan e Xie, 1994; Cash et al., 2001). A geração de ON dependente da iSON foi demonstrada após 48 horas da indução de isquemia focal em ratos (Fassbender et al., 2000). O ON produzido em grandes quantidades seria um possível mediador do aumento

secundário da lesão. No entanto, não achamos que esta isoforma tenha importância significativa no modelo estudado, que só utilizou períodos inferiores a 24 horas. Portanto, provavelmente as principais isoformas envolvidas neste período da isquemia seriam a eSON e a nSON. A importância fisiológica da produção de ON poderia ser um mecanismo de proteção do tecido neural contra a isquemia através da regulação do fluxo sanguíneo (Kelly et al., 2000; Benyó et al., 2000). No entanto, com a persistência da isquemia este ON traria um efeito maléfico ao tecido, provocando a progressão lesional. O efeito da reperfusão envolveria uma terceira variável, provavelmente com o envolvimento da iSON, porém este aspecto não foi avaliado neste estudo.

Uma atividade maior da SON na região central da isquemia quando comparada à área de penumbra foi demonstrada em ratos submetidos a diversos intervalos de tempo de isquemia (entre 30 min e 2h) e reperfusão; esta diferença na atividade da SON entre tais regiões poderia contribuir para a expansão da área de infarto com o tempo (Ashwal et al., 1998). Foi também observada uma redução na atividade da SON no hemisfério isquêmico neste mesmo trabalho, que os autores atribuem à redução na disponibilidade de cofatores durante a isquemia. Esta redução na atividade da SON durante as fases iniciais da isquemia poderia ainda dever-se à redução dos níveis de

glutamato uma vez que a SON tem uma ligação aos receptores NMDA de glutamato (Zhang e Snyder, 1995; Brenman et al., 1996; Barañano e Snyder, 2001). A redução dos níveis de glutamato foi demonstrada em córtex parietal de ratos submetidos a 30 minutos de isquemia por oclusão da artéria cerebral média (Dias et al., 2000).

Um outro aspecto a ser considerado em relação à função do ON durante a isquemia cerebral é que a expressão das enzimas pode variar entre espécies diferentes. O nosso estudo mostrou não haver alteração na atividade da SON nem aumento na produção de ON no hemisférico isquêmico de gerbil após seis horas de isquemia, sendo que o estudo em ratos mostrou alteração apenas nos quinze minutos iniciais. Deve ainda ser feita a consideração em relação ao aspecto temporal, uma vez que a produção de ON parece aumentar no decorrer do tempo durante o período isquêmico, o que pode ter implicações em relação à "janela terapêutica" para manipulações da atividade da SON durante a isquemia.

CONCLUSÃO

Não houve aumento de atividade da sintase de óxido nítrico nem elevação na produção do óxido nítrico provocados pela isquemia cerebral. Apenas uma redução na atividade da SON e produção de ON foi observada em fases precoces da isquemia (15 minutos). O bloqueio farmacológico com inibidor inespecífico das sintases de óxido nítrico piora o déficit neurológico em roedores, sugerindo que o ON endógeno tenha ação de neuroproteção nas condições de isquemia cerebral focal aguda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albers GW, Goldberg MP, Choi DW. N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia? Ann Neurol 1989; 25:398-403.

Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre JV. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96:12866-12869.

American Heart Association. The National Health and Nutrition Survey II. In: 1992 Heart and stroke facts. 1991.Dallas.

Amin-Hanjani S, Stagliano NE, Yamada M, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. Stroke 2001; 32:980-985.

Ashwal S, Tone B, Tian HR, Cole DJ, Pearce WJ. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. Stroke 1998; 29:1037-1047.

Barañano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10996-11002.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 1996; 271:C1424-C1437.

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke 1986;17:472-476.

Behrens MM, Strasser U, Lobner D, Dugan LL. Neurotrophin-mediated potentiation of neuronal injury. Microsc Res Tech 1999;45:276-284.

Benyó Z, Lacza Z, Hortobágyi T, Görlach C, Wahl M. Functional importance of neuronal nitric oxide synthaser in the endothelium of rat basilar arteries. Brain Res 2000;877:79-84.

Blake GJ, Ridker PM. Are statins anti-inflammatory? Curr Control Trials Cardiovasc Med 2000;1:161-165.

Blaser T, Hofmann K, Buerger T, Effenberger O, Wallesch CW, Goertler M. Risk of stroke, transient ischemic attack, and vessel occlusion before endarterectomy in patients with symptomatic severe carotid stenosis. Stroke 2002;33:1057-1062.

Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. Nature 1997;390:622-625.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:682-685.

Brenman JE, Chao D, Xia SH, Aldape K, Bredt D. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell 1995;82:743-752.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and a-1 syntrophin mediated by PDZ motifs. Cell 1996;84:757-767.

Brown LA, Key BJ, Lovick TA. Fluorescent imaging of nitric oxide production in neuronal varicosities associated with intraparenchymal arterioles in rat hippocampal slices. Neurosci Lett 2000;294:9-12.

Buchan AM. Do NMDA antagonists protect against cerebral ischemia: are clinical trials warranted? Cerebrovasc Brain Metab Rev 1990;2:1-26.

Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squadrito F, Inferrera G, Parisi A, Rizzo A, Crisafulli C, Fiore A, Caputi AP. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. Life Sci 2000;67:2673-2683.

Campagne MV, Thibodeaux H, Bruggen NV, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:12870-12875.

Cash D, Beech JS, Rayne RC, Bath PMW, Meldrum BS, Williams SCR. Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain. Brain Res 2001;905:91-103.

Castillo J, Rama R, Dávalos A. Nitric oxide – related brain damage in acute ischemic stroke. Stroke 2000;31:852-857.

Choi DW. Glutamate neurotoxicicy and diseases of the nervous system. Neuron 1988;1:623-634.

Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. Annu Rev Neurosci 1998;21:347-375.

Christopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. J Clin Invest 1997;100:2424-2429.

Collaborative Group for the Study of Stroke in Young Women. Oral contraceptives and stroke in young women: associated risk factors. J Am Med Assoc 1975;231:718-722.

Colli BO, Nunes M, Carlotti Jr CG. Isquemia cerebral experimental. In: Castro e Silva O, Beer A, Zuccoloto S (eds). Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo, Probel Editora,1998;643-662.

Coura JR. Prevenção de doenças cardiovasculares: mito ou realidade? An Acad Nac Med 1998;158:57-58.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6368-6371.

Dias LA, Colli BO, Coutinho Netto J, Lachat JJ. Focal cerebral ischaemia induced by middle cerebral artery occlusion and the neuroprotective effect of ketoprofen in rats. Arq Neuropsiquiatr 2000;58:1047-1054.

Doenças cardiovasculares no Brasil. Sistema Único de Saúde. Ministério da saúde. Coordenação de Doenças Cardiovasculares. Brasília 1993.

El Kossi MMH, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. Stroke 2000;31:1889-1892.

Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8880-8885.

Farias da Silva, W. O ácido úrico e a patologia vascular cerebral aterosclerótica. Neurobiol 1970;33:201-212.

Farias da Silva, W. Uricemia e acidentes vasculares cerebrais isquêmicos. Estudo de 318 casos. Neurobiol 1971;34:177-186.

Farias da Silva, W. Tratamento médico das afecções vasculares cerebrais. Neurobiol 1972 (a);35:349-372.

Farias da Silva, W. Considerações sobre o metabolismo do ácido úrico, dos lipídeos e dos glicídeos em 57 pacientes com doença cérebro-vascular aterosclerótica. Neurobiol 1972 (b);35:409-416.

Fassbender K, Fatar M, Ragoschke A, Picard M, Bertsch T, Kuehl S, Hennerici M. Subacute but not acute generation of nitric oxide in focal cerebral ischemia. Stroke 2000;31:2208-2211.

Feelisch M, Stamler JS, editors. Methods in nitric oxide research. Chichester. John Wiley and sons; 1996.

Forastiero RR, Falcon C, Rodrigues S, Kordich LC, Carreras LO. Antiphospholipid antibodies and cerebral ischemic infarction in a 6-year-old boy. Sangre (Barc) 1993;38:147-149.

Frederickson, CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. Int Rev Neurobiol 1989;31:145-238.

Gerrits RJ, Stein EA, Greene AS. Anesthesia alters NO-mediated functional hyperemia. Brain Res 2001;907:20-26.

Golding EM, Steenberg ML, Johnson TD, BryanJr RM. Nitric oxide in the potassium-induced response of the rat middle cerebral artery: a possible permissive role. Brain Res 2001;889:98-104.

Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. Brain Res Rev 2001;38:33-60.

Goyagi T, Goto S, Bhardwaj A, Dawson VL, Hurn PD, Kirsch JR. Neuroprotective effect of σ1-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production. Stroke 2001;32:1613-1620.

Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol 1995;57:707-736.

Gürsoy-Özdemir Y, Bolay H, Sariba O, Dalkara T. Role of Endothelial Nitric Oxide Generation and Peroxynitrite Formation in Reperfusion Injury After Focal Cerebral Ischemia. Stroke 2000;31:1974-1981.

Hiatt BK, Lentz SR. Prothrombotic states that predispose to stroke. Curr Treat Options Neurol 2002;4:417-425.

High KA. Antithrombin III, protein C, and protein S. Naturally occurring anticoagulant proteins. Arch Pathol Lab Med 1988;112:28-36.

Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Goto T, Dacey Jr RG. Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis. Stroke 2002;33:844-849.

Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. J Cereb Blood Flow Metab 1996;16:981-987.

Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. Science 1994;265:1883-1885.

Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. Trends Neurosci 1997;20:132-139.

Irikura K, Huang PL, Ma J, Lee WS, Dalkara T, Fishman MC, Dawson TM, Snyder SH, Moskowitz MA. Cerebrovascular alterations in mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:6823-6827.

Jin YJ, Raicu V, Park KC, Shimizu K. Combined argatroban and edaravone caused additive neuroprotection against 15 min of forebrain ischemia in gerbils. Neurosci Res 2002;43:75-79.

Joshi S, Young WL, Duong DH, Ostapkovich ND, Aagaard BA, Hashimoto T, Pile-Spellman J. Intracarotid infusion of the nitric oxide synthase inhibitor, l-NMMA, modestly decreases cerebral blood flow in human subjects. Anesthesiology 2000;93:699-707.

Joshi S, Young WL, Duong H, Aagard BA, Ostapkovich ND, Connolly ES, Pile-Spellman J. Intracarotid nitroprusside does not augment cerebral blood flow in human subjects. Anesthesiology 2002;96:60-66.

Kapinya KJ, Löwl D, Fütterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. Stroke 2002;33:1889-1898.

Kaur J, Singh P, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular diseases. Am J Ther 2002;9:510-515.

Kelly PAT, Ritchie IM, McBean DE. 7-Nitroindazole reduces cerebral blood flow following chronic nitric oxide synthase inhibition. Brain Res 2000;885:295-297.

Kerchner GA, Canzoniero LM, Yu SP, Ling C, Choi DW. Zinc current is mediated by voltage-gated calcium channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurons. J Physiol 2000;528 (Pt 1):39-52.

Khrenov AV, Ananyeva NM, Griffin JH, Saenko EL. Coagulation pathways in atherothrombosis. Trends Cardiovasc Med 2002;12:317-324.

Kitagawa K, Matsumoto M, Ohtsuki T, Kuwabara K, Mabuchi T, Yagita Y, Hori M, Yanagihara T. Extended neuronal protection induced after sublethal ischemia adjacent to the area with delayed neuronal death. Neuroscience 2000; 96:141-146.

Kitazono T, Kamouchi M, Ago T, Ooboshi H, Nakamura H, Fujishima M, Ibayashi S. Role of Na^+/H^+ exchanger in dilator responses of rat basilar artery in vivo. Brain Res 2001;906:101-106.

Kohno K, Higuchi T, Ohta S, Kohno K, Kumon Y, Sakaki S. Neuroprotective nitric oxide synthase inhibitor reduces intracellular calcium accumulation following transient global ischemia in the gerbil. Neurosci Lett 1997;224:17-20.

Kristián T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. Stroke 1998;29:705-718.

Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. J Clin Invest 2000;106:723-731.

Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature 1999;399:A7-A14.

Leker RR, Teichner A, Ovadia H, Keshet E, Reinherz E, Ben-Hur T. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor. Brain Res 2001;909:1-7.

Lemaitre RN, Heckbert SR, Psaty BM, Smith NL, Kaplan RC, Longstreth WT Jr. Hormone replacement therapy and associated risk of stroke in postmenopausal women. Arch Intern Med 2002;162:1954-1960.

Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the Gerbil (Meriones unguiculatus). Exp Neurol 1966;16:255-262.

Markgraf CG, Velayo ML, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, Chmielewsky PA, Linnik MD. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1998;29:152-158.

McCulloch J, Dewar D. A radical approach to stroke therapy. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10989-10991.

Menzies SA, Hoff JT, Betz LA. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. Neurosurgery.1992;31:100–107.

Obrenovitch TP, Richards DA. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1995;7:1-54.

Ohta K, Graf R, Rosner G, Heiss WD. Calcium ion transients in peri-infarct depolarizations may deteriorate ion homeostasis and expand infarction in focal cerebral ischemia in cats. Stroke 2001;32:535-543.

Perotti CA, Nogueira MS, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. Braz J Med Biol Res 1999;32:1381-1387.

Pessin MS e Teal PA. Carotid territory ischemic stroke. In: Fisher, M.(ed). Clinical atlas of cerebrovascular disorders.London. Wolfe.1993.pp 5.1-5.18.

Pluta RM, Rak R, Wink DA, Woodward JJ, Khaldi A, Oldfield EH, Watson JC. Effects of nitric oxide on reactive oxygen species production and infarction size after brain reperfusion injury. Neurosurgery 2001;48:884-893.

Rothwell N, Allan S, Toulmond S. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. J Clin Invest 1997;100:2648-2652.

Sacco RL, Foulkes MA, Mohr JP, Wolf PA, Hier DB, Price TR. Determinants of early recurrence of cerebral infarction. The Stroke Data Bank. Stroke 1989;20:983-989.

Sacco RL, Wolf PA, Kannel WB, McNamara PM. Survival and recurrence following stroke: the Framingham study. Stroke 1982;13:290-295.

Sacco RL. Frequency and determinants of stroke. In: Fisher, M.(ed). Clinical atlas of cerebrovascular disorders.London. Wolfe.1993.pp 1.1-1.16.

Samdani AF, Dawson TM, Dawson, VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke. 1997;28:1283-1288.

Sauter A, Rudin M. Calcium antagonists reduce the extent of infarction in rat middle cerebral artery occlusion model as determined by quantitative magnetic resonance imaging. Stroke 1986;17:1228-1234.

Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U. The cerebrovascular response to elevated potassium – role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. Neurosci Lett 2001;306:61-64.

Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. Annu Rev Neurosci 1994;17:153-183.

Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. Nature 1991;349:326-328.

Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares. Primeiro consenso Brasileiro do tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral. Arq Neuropsiquiatr 2001;59:972-980.

Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. Cell 1996;87:1015-1023.

Ste-Marie L, Hazell AS, Bémeur C, Butterworth R, Montgomery J. Immunohistochemical detection of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and manganese superoxide dismutase following hyperglycemic focal cerebral ischemia. Brain Res 2001;918:10-19.

Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Branco LG. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002; 282:R584-593.

Steiner AA, Carnio EC, Antunes-Rodrigues J, Branco LG. Role of nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypothermia. Am J Physiol 1998; 275:R937-941.

Sugino T, Nozaki K, Hashimoto N. Activation of mitogen-activated protein kinases in gerbil hippocampus with ischemic tolerance induced by 3-nitropropionic acid. Neurosci Lett 2000;278:101-104.

Sun H, Mayhan WG. Superoxide dismutase ameliorates impaired nitric oxide synthase-dependent dilatation of the basilar artery during chronic alcohol consumption. Brain Res 2001;891:116-122.

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat, I: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab 1981;1:53-60.

Tonder N, Johansen FF, Frederickson CJ, Zimmer J, Diemer NH. Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. Neurosci Lett 1990;109:247-252.

Tuettenberg J, Heimann A, Kempski O. Nitric oxide modulates cerebral blood flow stimulation by acetazolamide in the rat cortex: a laser doppler scanning study. Neurosci Lett 2001;315:65-68.

Umemura A, Mabe H, Nagai H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. Stroke 1992;23:1163-1166.

Valença MM. Dislipidemias e outros fatores de risco no acidente vascular cerebral isquêmico. Anais da Faculdade de Medicina da UFPE.1994;39:96-104.

Valença MM, Costa J, Farias-da-Silva W, Valença LPA, Wichert-Ana L, Leite JP, Bordini CA, Speciali JG, Antunes-Rodrigues J. Estreitamento arterial cerebral: diagnóstico diferencial, patofisiologia e correlação com síndromes de cefaléia. Neurobiol 2002;65:3-12.

Valença MM, Valença LPAA. Acidente vascular cerebral (AVC): Aspectos epidemiológicos em 1358 pacientes. Anais do 11º. Congresso Brasileiro de Doencas Cerebrovasculares 1999; pag 5

Valença MM, Valença LPAA. Doença cerebrovascular isquêmica In: NA Filgueira, JI Costa Jr, CCS Leitao, VG Lucena, HRL Melo, CAA Brito. Condutas em Clinica Médica, 2° ed. Editora Medsi, Rio de Janeiro, 2001; pag. 516-532.

Ventura RR, Gomes DA, Reis WL, Elias LL, Castro M, Valença MM, Carnio EC, Rettori V, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Nitrergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. Braz J Med Biol Res 2002;35:1101-1109.

Vexler ZS, Roberts TPL, Bollen AW, Derugin N, Arieff AI. Transient cerebral ischemia.Association of apoptosis induction with hypoperfusion. J Clin Invest 1997;99:1453-1459.

Von Lubitz DK. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? Eur J Pharmacol 1999;365:9-25.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature 1997;389:865-870.

Yoshimine T, Yanagihara T. Regional cerebral ischemia by occlusion of the posterior communicating artery and the middle cerebral artery in gerbils. J Neurosurg 1983;58:362-367.

Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:213-233.

Zhao X, Haensel C, Araki E, Ross ME, Iadecola C. Gene-dosing effect and persistence of reduction in ischemic brain injury in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Brain Res 2000;872:215-218.

(conforme as normas do International Commitee of Medical Journals Editors – Grupo de Vancouver)