

*JUAN GUZMAN QUISPE CABANILLAS*

*“REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA E ARTÉRIA  
PULMONAR PROVENIENTES DE RATOS PORTADORES  
DE ENCEFALOMIELITE ALÉRGICA EXPERIMENTAL”*

*CAMPINAS*

*2006*

**JUAN GUZMAN QUISPE CABANILLAS**

**“REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA E ARTÉRIA  
PULMONAR PROVENIENTES DE RATOS PORTADORES  
DE ENCEFALOMIELITE ALÉRGICA EXPERIMENTAL”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia*

***Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará***

**CAMPINAS**

**2006**

## BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa57p Quispe Cabanillas, Juan Guzman  
“Reatividade vascular de aorta e artéria pulmonar provenientes de ratos portadores de encefalomielite alérgica experimental” / Juan Guzman Quispe Cabanillas. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Marcelo Nicolas Muscará  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aorta. 2. Óxido Nítrico. 3. Telemetria. 4. Encefalomielite auto-imune experimental. 5. Receptores adrenérgicos. I. Muscará, Marcelo Nicolás. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slp/fcm)

**Título em inglês: “*Vascular reactivity of aorta and pulmonary artery from rats with experimental allergic encephalomyelitis*”**

**Keywords:** • Aorta

- Nitric oxide
- Telemetry
- Experimental autoimmune encephalomyelitis
- Receptors, adrenergic

Titulação: Mestrado

**Banca Examinadora: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará  
Profa. Dra. Liliam Fernandes  
Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior**

**Data de Defesa: 30/01/2006**



## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

### **Orientador:**

**Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará**

### **Membros:**

**Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará**

**Prof. Dra. Liliam Fernandes**

**Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 30/01/2006**

## ***DEDICATÓRIA***

*A Deus pela ajuda e guia imensurável.*

*À memória do meu querido pai, que sempre foi e será o meu exemplo de grande amigo, cidadão e pai.*

*A minha mãe por seu exemplo de perseverança e dedicação para com seus filhos, aos meus irmãos e a toda minha família que mesmo de longe sempre me incentivaram e torceram por mim.*

*A Lorena pela sua grande companhia e apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço a todos que, durante estes anos, contribuíram de diferentes formas para a minha formação e desenvolvimento deste trabalho. Em especial agradeço:

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará pela oportunidade concedida, amizade e a orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Edson Antunes, pela oportunidade concedida, amizade e sugestões vertidas na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Angelina, pelas dicas e principalmente pela sua amizade.

Aos Pós Doutorandos Cleber Evandro Teixeira, Simone A. Teixeira, pelos auxílios e contribuições durante a realização deste trabalho.

Aos companheiros do laboratório: Fernanda, Juliana, Cristiane, Mário, etc., pelo convívio agradável e companheirismo.

À Prof. Dra. Ana Maria, aos amigos Marcos, André e funcionários do CEMIB, pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Radicais Livres da USP e também a Juliano.

Ao secretário Wanderley do departamento de Farmacologia, pela colaboração

***APOIO***

*CAPS (Centro de Aperfeiçoamento Profissional)*

*“Uma longa viagem  
começa com um único passo”.*

***Lao Tsé***

*“Hasta cuándo, oh simples, amaréis la simpleza,*

*Y los burladores desearán el burlar,*

*Y los insensatos aborrecerán la ciencia?*

***Provérbios 1:22***

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1- Esclerose Múltipla</b> .....	21
<b>2- Encefalomielite Autoimune (Alérgica) Experimental (EAE)</b> .....	24
<b>3- Controle Adrenérgico Vascular</b> .....	27
3.1- Agentes vasoativos adrenérgicos.....	29
3.2- Agentes vasoativos colinérgicos.....	31
3.3- Outros agentes vasoativos.....	33
3.4- Óxido Nítrico.....	33
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	48
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
<b>4- RESULTADOS</b> .....	56
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>6- CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AG	Aminoguanidina
AMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ATP	Adenosina – 5´- trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
CCh	Carbacol
CFA	Adjuvante completo de Freund
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX	Ciclooxigenases
COX-1	Ciclooxigenase – 1
COX-2	Ciclooxigenase – 2
DG	Diacilglicerol
EAE	Encefalomielite autoimune (alérgica) experimental
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EETs	Ácidos epoxieicosatrienólicos
EIA	Atividade inibitória endógena

EM	Esclerose múltipla
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina – 1
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor acoplada à família das proteínas G
Gs	Proteína G estimulatória
GTN	Gliceriltrinitrato
GTP	Guanosina trifosfato
HETEs	Ácidos hidroieicosatetraenoicos
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP <sub>3</sub>	Inositol –1,4,5 – trifosfato
ISO	Isoproterenol
K <sub>ATP</sub>	Canais de K <sup>+</sup> dependentes de ATP
KDa	Quilodalton
Kir	Canais internos retificadores de K <sup>+</sup>
Kv	Canal de K <sup>+</sup> voltagem-dependente
L-NMMA	N <sup>0</sup> -nitro-monometil-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
MaxiK	Canal de K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> -ativado
MBP	Proteína básica de mielina
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de miosina de cadeia leve

MLCP	Fosfatase de miosina de cadeia leve
NA	Noradrenalina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NT	3 – nitrotirosina
PAF	Fator de ativação plaquetária
PE	Fenilefrina
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Nitroprussiato de sódio
TCR	Receptor de linfócitos T
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Distribuição dos adrenoreceptores $\alpha_1$ no sistema cardiovascular do rato.....	28
<b>Figura 2-</b> Biossíntese do óxido nítrico.....	35
<b>Figura 3-</b> Formação do NO e promoção da atividade de COX-2.....	43
<b>Figura 4-</b> Possível Mecanismo pelo qual o NO modula a COX.....	45
<b>Figura 5-</b> Aquisição dos dados por telemetria.....	53
<b>Figura 6-</b> Representação esquemática dos banhos orgânicos.....	55
<b>Figura 7-</b> Evolução Clínica.....	57
<b>Figura 8-</b> Evolução da variação do peso corporal.....	58
<b>Figura 9-</b> Medida de Pressão Arterial Média por telemetria.....	59
<b>Figura 10-</b> Medida de Pressão Arterial Sistólica por telemetria.....	60
<b>Figura 11-</b> Medida de Pressão Arterial Diastólica por telemetria.....	61
<b>Figura 12-</b> Medida de Frequência Cardíaca por telemetria.....	62
<b>Figura 13-</b> Curva concentração – resposta à NA em anéis de aorta de rato.....	63
<b>Figura 14-</b> Curva concentração – resposta à PE em anéis de aorta de rato.....	64
<b>Figura 15-</b> Curva concentração – resposta à ACh em anéis de aorta de rato.....	65
<b>Figura 16-</b> Curva concentração – resposta à CCh em anéis de aorta de rato.....	66
<b>Figura 17-</b> Curva concentração – resposta à SNP em anéis de aorta de rato.....	67
<b>Figura 18-</b> Curva concentração – resposta à ISO em anéis de aorta de rato.....	68
<b>Figura 19-</b> Curva concentração – resposta à PE em anéis de artéria pulmonar de rato.....	69
<b>Figura 20-</b> Curva concentração – resposta à ACh em anéis de artéria pulmonar de rato.....	70

## *LISTA DE DROGAS E REAGENTES*

---

<b>SUBSTÂNCIA</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
Acetilcolina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Aminoguanidina	Sigma Chemical Co. (Steinheim, Alemanha)
CaCl <sub>2</sub>	Mallinckrodt Chem. (Paris, França)
Carbacol	Sigma Chemical Co. (Steinheim, Alemanha)
Etoricoxibe	Merck (São Paulo, Brasil)
Fenilefrina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Glicose	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Halotano	Cristália (São Paulo, Brasil)
Indometacina	Sigma Chemical Co. (Steinheim, Alemanha)
Isoproterenol	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
KCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Mallinckrodt Chem. (Paris, França)
MgSO <sub>4</sub>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Mallinckrodt Chem. (EUA)
NaHCO <sub>3</sub>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Noradrenalina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Nitroprossiato de sódio	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)

*RESUMO*



A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela infiltração de células do sistema imune neste compartimento, com destruição de mielina e perda de oligodendrócitos. O emprego do modelo experimental, a encefalomielite autoimune (alérgica) experimental (EAE), tem trazido grandes contribuições para a compreensão dos mecanismos envolvidos e o esclarecimento da patogênese de doenças autoimunes, tais como a EM. Apesar do modelo EAE ter sido estabelecido em 1940, os únicos (e últimos) trabalhos nos quais foi estudada a resposta cardiovascular destes animais foram publicados entre 1966 e 1972 (quando ainda não se tinha conhecimento da ocorrência do NO em sistemas biológicos). Atualmente sabemos que há alterações na produção de NO na EAE e da importância deste mediador no controle do tônus vascular.

Os objetivos deste estudo foram investigar a reatividade vascular *in vitro* de aorta e artéria pulmonar provenientes de ratos portadores de EAE; bem como verificar a importância da produção endógena de NO, assim como a participação de produtos derivados da ciclooxigenase sobre a resposta vascular nos animais portadores da EAE e avaliar a evolução temporal de parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial média e frequência cardíaca), ao longo do desenvolvimento da doença EAE.

O tratamento de ratos com o inibidor de iNOS aminoguanidina (AG) ou com o inibidor de COX-2 etoricoxibe (ETO) resultou em retardo do aparecimento dos sinais clínicos da EAE, sem modificar o perfil de perda ponderal que se segue à imunização com o antígeno de mielina. Não há diferenças significativas nos parâmetros hemodinâmicos, mesmo quando tratados com AG ou ETO. Tanto anéis de aorta como de artéria pulmonar de animais com EAE mostraram uma resposta diminuída a agonistas adrenérgicos vasoconstritores, os quais de alguma forma foram revertidas quando tratados com AG. Anéis de aorta de animais com EAE mostraram uma resposta aumentada à acetilcolina (ACh), a qual pode ser revertida pelo tratamento com AG ou ETO. Por outro lado as respostas dos tecidos de animais controle ou com EAE ao nitroprussiato de sódio (SNP) não foram diferentes. As ações vasorelaxantes do isoproterenol (ISO) não foram diferentes nos anéis de aorta provenientes dos diversos grupos experimentais, apesar da aparente maior potência do agonista nos tecidos dos animais com EAE, e a reversão pelo tratamento com AG. Contrariamente ao

observado nos anéis de aorta, a resposta a ACh mostrou-se muito deprimida nos anéis de artéria pulmonar de ratos com EAE em relação aos animais controle. Neste tecido, a resposta máxima parece normalizar-se nos animais com EAE tratados com AG ou ETO.

Com base nestes resultados, nós propomos que: o NO (derivado da iNOS) e/ou prostanóides (derivados da COX-2) podem estar envolvidos nos primeiros sinais clínicos da EAE, porém, a participação destes mediadores parece não ser relevante no equilíbrio hemodinâmico geral; há alteração na regulação simpática nos animais portadores da EAE e o NO derivado de iNOS parece mediar esta resposta contrátil deficiente; a resposta vasodilatadora simpática mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos parece não estar substancialmente alterada; há ocorrência de resposta relaxante dependente de endotélio alterada na EAE; aorta e artéria pulmonar mostraram alterações em sentidos opostos que podem ser normalizados através da inibição de iNOS ou COX-2; os efeitos do NO derivado de iNOS ou dos prostanóides sintetizados pela COX-2 são dependentes da função, fisiologia e/ou tipo particular de leito vascular.

***ABSTRACT***



Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), characterized by the infiltration of immune system cells in this compartment, with destruction of myelin and loss of oligodendrocytes. Experimental autoimmune (or allergic) encephalomyelitis (EAE) is a useful animal model for the study of human multiple sclerosis that shows characteristics similar to those shown by patients with MS.

Last works in which was studied the cardiovascular reply of EAE animals was published between 1966 and 1972 (when it was unknown the occurrence of Nitric Oxide (NO) in the biological systems). Currently we know that exist alterations in the production of NO in the EAE and your importance in the control of tonus vascular.

The purpose of the present study is to investigation of vascular reactivity *in vitro* of aorta and pulmonary artery from rats with EAE; as well as verifying the importance of the endogenous production, the participation of derived products from cyclooxygenase on the vascular response in the animals with EAE and evaluating hemodynamic parameters (average arterial pressure and cardiac frequency), to the long one of the development of disease EAE.

The treatment of rats with aminoguanidine (AG) inhibitor of iNOS or with etoricoxibe (ETO) inhibitor of Cox-2, resulted in retarding showing of the clinical signals of the EAE, without modifying the profile that follows to the immunization with the myelin antigen. There is not significant differences in the hemodynamic parameters, when treated with AG or ETO. The rings of aorta, pulmonary artery from animals with EAE has a diminished response for adrenergic vasoconstrictor agonists, the response to revert when treated with AG. Rings of aorta from animals with EAE had shown a increase response to acetilcolina (ACh), which can to be revert by the treatment with AG or ETO. On the other hand the responses of blood vessel of animal control or with EAE to the nitroprussiato of sodium (SNP) had not differences. The vasodilation actions of isoproterenol (ISO) had not differences significant in rings of aorta from the diverse experimental groups, despite apparent potency and to revert the response of vasodilation when treated with AG.

In contrast to the observed one in rings of aorta, the response for ACh it was decreased in rings of pulmonary artery of rats with EAE, when compared to the control animals. In this blood vessel, the maximum reply it seems to be normalized in the animals with EAE when treated with AG or ETO.

These results suggest that: the nitric oxide (derived from iNOS) and/or prostanoids (derived from the Cox-2) can be involved in the first clinical signals of the EAE, however, the participation of these mediators seems not to be important in the general hemodynamic equilibrium; there is alteration in the sympathetic regulation in the animals with EAE, NO derivative of iNOS seems to mediate this deficient contrátil response; the vasodilator response mediated by  $\beta$ -adrenergic receptor it seems not to be substantially modified; the response of dependent relaxation of endothelium it was altered in the animals with EAE; aorta and pulmonary artery showed alterations in opposed directions that can be normalized through the inhibition of iNOS or Cox-2; the effects of NO derivative of iNOS or prostanoids synthesis for the Cox-2 are dependents of the function, physiology and/or particular type of blood vessel.

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1- Esclerose Múltipla

O neurologista francês, Jean Martin Charcot, descreveu pela primeira vez a Esclerose Múltipla (EM) em 1868, notando um acúmulo de células inflamatórias na região perivascular, dentro da substância branca do cérebro e da medula espinhal de pacientes com episódios intermitentes de disfunção neurológica (Charcot, 1868a, 1868b, 1887). Isto conduziu ao termo esclerose em placas disseminadas ou esclerose múltipla.

O nome “esclerose” deriva do termo grego que significa cicatrizado ou endurecimento, no caso da doença nas áreas onde foi destruída a mielina no sistema nervoso central; enquanto que “múltipla” refere-se à condição do número de vezes que se repete a esclerose (NINDS, 2003).

A esclerose múltipla é uma doença complexa de natureza inflamatória em áreas da substância branca no sistema nervoso central (SNC) (Kabat *et al*, 1948, 1950; NINDS, 2003), seguida por um processo de destruição imunológica da mielina, e redução de oligodendrócitos.

Atualmente a EM não tem tratamento inteiramente eficaz e a sua patogenese é em grande parte desconhecida (Weinshenker, 1996; Ewing & Bernard, 1998). Na metade do século passado, diversos estudos sugeriram uma base genética para a EM (Mackay & Myriantopoulos, 1966; Williams *et al*, 1980; Ebers *et al*, 1986; Heltberg & Holm, 1982; Kinnunen *et al*, 1987; Utz *et al*, 1993; Mumford *et al*, 1992; French Research Group on Multiple Sclerosis, 1992).

A maioria das pessoas que tem EM começam a sentir os sintomas entre os 20 e 40 anos de idade, raramente se tem relatos de casos desta doença em crianças e idosos.

A doença é mais comum nas mulheres, frequentemente em adultos jovens e é tido como uma das causas principais de incapacidade do sistema nervoso entre as idades de 20 a 40 anos (Weinshenker, 1996). O diagnóstico é clínico devido à falta de um exame diagnóstico específico (NINDS, 2003).

É geralmente uma doença esporádica e é caracterizada por períodos de exacerbações e remissões característicos. Os sintomas são diversos, variando do tremor, vertigem, espasticidade aumentada, depressão, ataxia, oscilação de humor, disartria, perda de coordenação das extremidades superiores, anormalidades cognitivas, disfunção sexual, fadiga, euforia, incontinência urinária, paralisia, distúrbios no discurso e na visão. Sendo que 55 % dos pacientes com EM terão um ataque de neurite óptica em algum momento de sua vida, este será o primeiro sintoma de EM em 15 %, aproximadamente dos casos. Isto tem levado ao reconhecimento geral da neurite óptica como um sintoma inicial da EM, especialmente quando se tem exames que mostram anormalidades no líquido cefaloraquídeo do paciente (Weinshenker, 1996; NINDS, 2003).

A EM pode ser categorizada clinicamente como EM benigna, de surtos e remissões, como progressiva primária, progressiva secundária e EM maligna. A forma benigna da EM ocorre aproximadamente em 20 % da população com EM, freqüentemente em mulheres jovens e os sintomas são ligeiros e apresentam pouca ou nenhuma progressão após o primeiro surto. A forma mais freqüente da doença é a EM caracterizada por *surtos e remissões* que é observada em 70-80% dos pacientes. As manifestações sintomatológicas consistem de disfunção neurológica (exacerbação, relapso ou ataque) com períodos de estabilização ou melhora (remissão).

As reincidências ou os "ataques" apresentam-se tipicamente com o desenvolvimento dos sintomas que excedem de horas a diversos dias, persistindo até por semanas, dissipando-se gradualmente.

Os ataques são causados pelo tráfego de células T ativadas, mielina-reativas no SNC, causando uma inflamação aguda com edema associado (Khoury *et al*, 1992).

A freqüência aumentada do ataque e a baixa recuperação dos ataques nos primeiros anos da doença clínica predizem uma deterioração mais rápida.

Na EM *progressiva primária*, a principal característica é que a doença tem uma progressão de anormalidades neurológicas lenta. Os sintomas mais comuns que se apresentam são: ataxia cerebelar e incontinência urinária.

Aproximadamente 40% de pacientes com EM caracterizada por *surtos e remissões* param de ter os ataques e desenvolvem o que pode ser uma desordem secundário neurodegenerativo progressivo relacionado à inflamação crônica do SNC, conhecida como EM *progressiva secundária* (Confavreux *et al*, 2000). A evolução desta forma da doença progressiva secundária é associada à diminuição no volume parenquimal do cérebro (Khoury *et al*, 1994; Filippi *et al*, 1995).

São poucos os pacientes que sofrem de EM maligna, definida como uma deterioração rápida e contínua que resulta na incapacidade notável ou inclusive na morte pouco depois de ter começado a doença.

A patologia da esclerose múltipla é caracterizada por ser uma doença complexa de natureza inflamatória em áreas da substância branca no sistema nervoso central (NINDS,2003; Kabat *et al*, 1948, 1950).

A examinação bruta do tecido cerebral dos indivíduos com EM revelou múltiplas placas agudamente demarcadas na substância branca do SNC com uma preferência aos nervos óticos, a substância branca das regiões periventricular do cérebro e da medula espinhal.

Dependendo do estágio da lesão e da destruição dos oligodendrócitos, as lesões podem ser caracterizadas como ativa inicial, ativa tardia ou crônica. É importante mencionar que em todas as lesões há uma presença dominante de linfócitos e macrófagos.

Embora os antígenos específicos responsáveis pela resposta autoimune não estejam caracterizados ainda, acredita-se que o início da resposta autoimune começa quando macrófagos apresentam peptídeos antigênicos próprios modificados aos receptores de linfócitos T (TCR) nas células T helper (Th1). O perfil das células inflamatórias nas lesões ativas é caracterizado pela infiltração perivascular de células T oligoclonais (Wucherpfennig *et al*, 1992) consistindo de células T CD4+/CD8  $\alpha/\beta$  (Traugott *et al*, 1983; Hauser *et al.*, 1986) e  $\gamma/\delta$  (Wucherpfennig *et al*, 1992), monócitos, células B e infreqüentes células do plasma (Prineas & Wright 1978).

Os macrófagos são os mais proeminentes no centro das placas e são vistos por conter restos de mielina, enquanto as contagens do oligodendrócitos são reduzidas. Assim a destruição da mielina seria mediada por macrófagos que a fagocitam e liberam fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além de radicais livres derivados do oxigênio, óxido nítrico (NO), proteases e por células T que secretariam o TNF- $\alpha$ , tóxico para oligodendrócitos.

Os linfócitos podem ser encontrados na substância branca normal-aparecendo além da margem da desmielinização ativa (Prineas, 1975). A presença dos linfócitos B na destruição da mielina também é marcante, estes se diferenciam em plasmócitos, secretando anticorpos que ativam o sistema complemento, promovendo o ataque à bainha de mielina (Andersson & Goodkin, 1998).

Em lesões crônicas ativas, a infiltração de células inflamatórias é bem menos proeminente e pode ser restrita na maior parte à borda da placa, sugerindo a presença de atividade inflamatória ao longo da borda da lesão (Lucchinetti *et al*, 1996).

## **2- Encefalomielite Autoimune (Alérgica) Experimental (EAE)**

Após a descoberta da vacina contra a raiva por Louis Pasteur, em 1875, observou-se que alguns pacientes vacinados desenvolviam doença neurológica severa.

Iniciaram-se, então, as pesquisas sobre os efeitos da injeção de tecido cerebral em animais de laboratório (Macedo, 1996).

Em 1933, no Instituto de Rockefeller, Thomas Rivers, descreveu pela primeira vez a encefalomielite autoimune (ou alérgica) experimental (EAE), com repetidas injeções de extrato de cérebro de coelho em primatas (macacos) (Rivers *et al*, 1933; para revisão ver Hafler, 2004).

A partir de 1933, vários protocolos começaram a ser utilizados para estudar a EAE em diferentes espécies de animais como camundongos, ratos, cobaias, coelhos, carneiros, etc. Estes animais apresentam diferentes graus de susceptibilidade à doença,

devido a diferenças genéticas, tipo e concentração do antígeno empregado, via de inoculação e tipo de adjuvante utilizado. Essas diferenças são também observadas entre linhagens e sublinhagens da mesma espécie (Macedo, 1996).

Diversos protocolos usam tanto imunização ativa quanto passiva.

Na indução ativa da EAE, dois tipos de adjuvantes são comumente utilizados: O adjuvante incompleto de Freund (IFA), uma emulsão aquosa contendo o antígeno em óleo mineral e o adjuvante completo de Freund (CFA), contendo micobactérias mortas além dos mesmos componentes do IFA (Freund *et al*, 1947).

Os adjuvantes interferem com os mecanismos de tolerância imunológica, retardam a destruição do antígeno, aumentando sua dispersão e proporcionam sua liberação gradativa e constante nos linfonodos de drenagem. O componente micobacteriano presente no CFA parece ser de importância fundamental na indução da EAE ativa.

Na indução passiva utiliza-se a injeção de clones de linfócitos T (CD<sub>4</sub>) encefalitogênicos ativados, oriundos de animais susceptíveis estimulados *in vivo* com proteína básica de mielina e IFA (MBP-IFA) e ativada *in vitro* com MBP (Paterson, 1960; Killen & Swanborg, 1982).

O uso do modelo da EAE para estudo da esclerose múltipla deve-se principalmente pela sua semelhança nas características imunológicas, histopatológicas e manifestações sintomatológicas. Tanto na EM como no modelo EAE a doença pode ser variável, apresentando-se sob duas formas: (1) forma monofásica aguda, (2) forma crônica com ataques e remissões.

A manifestação das formas da doença dependerá do tipo de indução que se adote no protocolo experimental.

Após alguns dias da imunização na forma aguda, a doença em ratos é caracterizada primeiramente por uma perda de peso progressiva de acordo com a piora da doença e alterações neurológicas que se manifestam nos membros inferiores de forma paralisante e ascendente; primeiramente é afetada a cauda mostrando-se uma cauda sem

força e arrastada. A seguir os membros inferiores (posteriores) perdem o movimento e a doença progride para os membros superiores (anteriores), o que na maioria das vezes, é acompanhado por incontinência urinária e fecal, levando eventualmente à morte (D'amelio *et al*, 1990).

Da mesma forma que na patogênese da EM, a quebra da barreira hematoencefálica (BHE) e o incremento na permeabilidade levando ao surgimento de edema é um evento crucial na indução da doença em ratos com EAE (Miller *et al*, 1988; Claudio *et al*, 1995). A ativação de macrófagos e dos linfócitos T é um evento que parece ser essencial para o desenvolvimento da doença e para a quebra da BHE (Lutton *et al*, 2004). Os macrófagos e a micróglia são responsáveis pelos processos desmielinizantes característicos da EAE e da EM, devido à atividade fagocítica destas células (Bauer *et al*, 1994).

É de grande importância a participação das citocinas nos mecanismos de ferimento do SNC, agindo na propagação e na regulação do ferimento autoimune da mielina. Está estabelecido que sob estímulo antigênico, linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem diferenciar-se nos sub-tipos Th1, Th2 ou Th3, dependendo do tipo de citocinas secretada (Olsson, 1995; Das, 1997). Os linfócitos Th1 produzem: IL2, linfotóxina, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , os Th2 produzem: IL-4, IL-5, IL-6, IL10 e IL-13, os Th3 secretam: o fator de crescimento tumoral (TGF)- $\beta$  (Hafler *et al*, 1997).

As citocinas do tipo Th1 estão presentes nas lesões inflamatórias no SNC, entretanto as de tipo Th2/Th3 estão associados com a fase da recuperação de EAE. As citocinas pro-inflamatórias tipo Th1, IL-12, IFN- $\gamma$ , linfotóxina (LT)- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  estão envolvidas com a doença através da lesão direta dos oligodendrócitos, assim como na ativação de macrófagos (envolvida no processo de desmielinização; Kuchroo & Weiner, 1998).

Durante a fase da recuperação de EAE, ocorre o aumento da expressão das citocinas derivadas da Th2 (incluindo IL-4, IL-10 e IL-13) mediando o processo de desativação do macrófago, além do aumento da expressão do TGF- $\beta$  pelas células Th2/Th3 (Olsson, 1995; Navikas & Link, 1996).

O ataque do sistema imune é direcionado para os oligodendrócitos que são responsáveis pela formação e, juntamente com astrócitos, pela manutenção da mielina e assim atuando na manutenção do axônio (Ludwin, 1997).

### **Função Cardiovascular na EAE**

Apesar do modelo da EAE ter sido estabelecido em 1940, os únicos (e últimos) trabalhos nos quais foi estudada a resposta cardiovascular destes animais foram publicados pelo grupo de Marvin Rosenthale (Wyeth Laboratories, Inc.) entre 1966 e 1972.

No trabalho publicado em 1966, Baum e Rosenthale mostraram que animais com EAE apresentam valores de pressão arterial e frequência cardíaca menores aos dos animais Controle, e que tanto o aumento de pressão arterial secundário à estimulação elétrica do nervo ciático como a diminuição da pressão arterial devida à injeção intravenosa de metacolina estavam atenuados nos animais com EAE.

### **3- Controle Adrenérgico Vascular**

O sistema vascular é regulado pelo sistema nervoso simpático, que influencia principalmente a vasculatura através de mudanças na liberação das principais catecolaminas endógenas: Noradrenalina e Adrenalina, dos terminais dos nervos simpáticos e da medula adrenal. Os efeitos biológicos da Noradrenalina e Adrenalina são mediados através de receptores (adrenoceptores) os quais estão localizados na membrana celular através da qual agem como neurotransmissores.

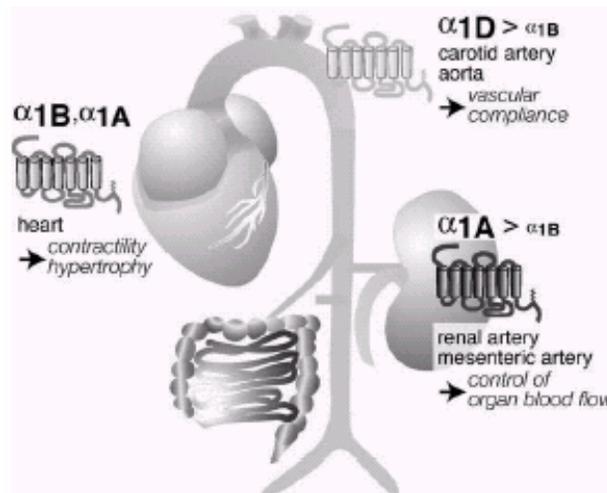
A descoberta dos adrenoceptores foi feita primeiramente através do sistema cardiovascular a partir da observação de Dale (1905), onde o efeito pressor da adrenalina foi invertido pela ergotoxina em um efeito depressor. A explicação para este fenômeno somente foi dada 43 anos mais tarde em 1948 por Ahlquist que propôs a divisão dos adrenoceptores em dois tipos,  $\alpha$  e  $\beta$  (para revisão veja Guimarães & Moura, 2001).

Atualmente através da técnica de clonagem molecular são conhecidos nove subtipos deferentes de adrenoceptores, todos eles pertencem à super família de receptores acoplados à proteína GPCR (Pierce *et. al.*, 2002; para revisão veja Phipipp & Hein, 2004).

Estes receptores adrenérgicos podem ser divididos em três grupos de receptores:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , e  $\beta$ . Cada um destes grupos é composto de 3 subtipos de receptores, sendo:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , e  $\beta_3$  (Bylund *et al*, 1998; Alexander & Peters, 1999). O adrenoceptor dominante nos grandes vasos de condutancia como aorta de rato é o do tipo  $\alpha_1$  (Han *et al*, 1990; Aboud *et al*, 1993).

Através de estudos com ratos “knockout”, viu-se a relevância fisiológica dos receptores, indicando que os receptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , e  $\alpha_{1D}$  contribuem ao regulamento do tônus vascular no rato (Cavalli *et al*, 1997; Rokosh & Simpson, 2002; Tanoue *et al*, 2000a, 2002b, 2002c). Apesar das respostas similares, evidências apontam para uma distribuição e uma função distintas dos 3 receptores nas diferentes camadas vasculares (Fig. 1).

Estudos *in vitro*, mostram que as artérias de condutância isoladas (aorta e carótida) são contraídas principalmente pela ativação do receptor  $\alpha_{1D}$ ; em artérias distribuidoras (mesentérica, caudal, e renal), o subtipo  $\alpha_{1A}$  prevalece (Rokosh & Simpson, 2002; Tanoue *et al*, 2000a, 2002b, 2002c). Uma contribuição menor do receptor de  $\alpha_{1B}$  foi identificada em todas as artérias.



**Figura 1-** Distribuição e função dos adrenoceptores  $\alpha_1$  no sistema cardiovascular do Rato (Philipp & Hein, 2004).

Desta forma, os subtipos  $\alpha_1$  vascular podem afetar o diferencial de complacência das grandes artérias ( $\alpha_{1D}$ ) e da redistribuição do fluxo sanguíneo entre os diferentes sistemas orgânicos  $\alpha_{1A}$  (Daly *et al*, 2002).

No sistema cardiovascular, os três subtipos de adrenoreceptores  $\beta$  estão funcionalmente presentes nos vasos sanguíneos (Chruscinski *et al*, 2001).

Ainda, através de estudos *in vitro* usando agonistas seletivos e antagonistas mostraram que o relaxamento de células do músculo liso vascular resultou da ativação dos subtipos  $\beta_1$  ou  $\beta_2$  adrenoreceptores, e que a participação de cada subtipo dependeu da camada vascular e da espécie (O'Donnell & Wanstall, 1984; Guimarães *et al*, 1993; Shen *et al*, 1994, 1996; Begonha *et al*, 1995 para revisões, veja Rohrer & Kobilka, 1998; Rohrer, 2000).

O endotélio vascular possui também ao menos cinco subtipos diferentes de adrenoreceptores ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , e  $\beta_3$ ), que participam ativamente na regulação do tônus vascular (Cohen *et al*, 1984; Molenaar *et al*, 1988; Rohrer *et al*, 1999; para revisão veja Guimarães & Moura, 2001).

Em 1987, Ignarro *et al*. e Palmer *et al*. demonstraram que a ativação dos adrenoreceptores  $\alpha_2$  em células endoteliais estimula a liberação do NO, uma ação que tende a atenuar a vasoconstrição produzida pela ativação de adrenoreceptores vasculares  $\alpha_1$  (Angus *et al*, 1986; Vanhoutte & Miller, 1989; Richard *et al*, 1990).

Também tem se relatado outras funções adicionais para os subtipos de adrenoreceptores  $\alpha_2$  (Lähdesmäki *et al*, 2003 a, 2003 b; para revisão ver Holmeberg *et al*, 2003).

### 3.1- Agentes vasoativos adrenérgicos

**Noradrenalina (NA):** a noradrenalina é o mediador químico liberado pelos nervos adrenérgicos pós-ganglionares dos mamíferos. Só difere da adrenalina pela ausência da substituição metílica no grupo amino.

A noradrenalina é um potente agonista dos receptores  $\alpha$ , com pouco valor terapêutico. Órgãos como o coração e alguns vasos sanguíneos são particularmente ricos em noradrenalina (5-50 nmol/g de tecido) e tem sido amplamente utilizados para estudos da transmissão noradrenérgica. A noradrenalina é rapidamente inativada no organismo pelas mesmas enzimas que metilam e desaminam oxidativamente a adrenalina (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

**Fenilefrina (PE):** a fenilefrina é um vasoconstritor de ação direta e ativador seletivo dos receptores  $\alpha_1$ . Do ponto de vista químico, só difere da adrenalina pela ausência de um grupo hidroxila na posição 4 do anel benzeno. O efeito vasoconstritor da fenilefrina é causando através de segundos mensageiros, ativação da fosfolipase C, aumento de inositol trifosfato e diacilglicerol, com conseqüente aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Usado como fármaco a fenilefrina (*cloridrato de fenilefrina*) produz vasoconstrição arterial pronunciada durante a sua infusão intravenosa, também é utilizada como descongestionante nasal e como midriático em várias formulações nasais e oftálmicas.

Apesar da utilidade clínica desses agentes ser limitada, eles podem ser úteis no tratamento de alguns pacientes com hipotensão ou choque (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

**Isoproterenol (ISO):** o isoproterenol é um potente agonista  $\beta$ -adrenérgico não-seletivo com afinidade muito baixa pelos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, que causa vasodilatação através do aumento do segundo mensageiro cAMP.

Alem disso, a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos aumentam a extrusão do  $Ca^{2+}$  e a recaptção de  $Ca^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático, e ambos os efeitos atuam no sentido de reduzir as concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$  livre.

O isoproterenol relaxa quase todas as variedades de músculo liso; todavia esta ação é mais pronunciada na musculatura lisa brônquica e gastrointestinal. A ação do isoproterenol pode ser mais prolongada do que a da adrenalina, embora seja também breve.

O isoproterenol (*cloridrato de isoproterenol*) pode ser utilizado em emergências para estimular a frequência cardíaca em pacientes com bradicardia ou bloqueio cardíaco (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

### 3.2- Agentes vasoativos colinérgicos

**Acetilcolina (ACh):** a acetilcolina é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervosos central e periférico. As ações deste transmissor são efetivadas pelos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes. Os receptores muscarínicos (M) estão presentes no cérebro, nos gânglios nervosos e em algumas células, como as dos vasos sanguíneos que recebem pouca ou nenhuma inervação colinérgica. Os agonistas colinérgicos simulam os efeitos da acetilcolina nesses locais.

A acetilcolina praticamente não tem aplicações terapêuticas por causa da sua ação difusa e hidrólise rápida pela acetilcolinesterase (AChE) e butiricolinesterase plasmática. Portanto tem sido sintetizados vários derivados na tentativa de se obterem medicamentos com ações mais seletivas e prolongadas.

Dentre as várias centenas de derivados sintéticos da colina investigados, apenas a metacolina, o carbacol e o betanecol tiveram aplicação clínica.

A acetilcolina produz quatro efeitos principais no sistema cardiovascular: vasodilatação, redução da frequência cardíaca, diminuição da taxa de condução nos tecidos especializados dos nodos sinusal e atrioventricular e redução da força das contrações cardíacas (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

A acetilcolina apresenta ação vasodilatadora, apesar de a maioria dos vasos sanguíneos não ter inervação parassimpática. Trata-se de um efeito indireto: a acetilcolina (como muitos outros mediadores) atua sobre as células endoteliais vasculares para liberar óxido nítrico (NO) (Moncada *et al*, 1991), que relaxa a musculatura lisa (Furchgott, 1980). A função desse evento permanece incerta, visto que a acetilcolina normalmente não é encontrada no sangue circulante.

Os receptores  $M_3$  são acoplados a proteínas G que provocam: ativação da fosfolipase C (PLC) (com conseqüente formação de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DG) como segundos mensageiros) atuam como mediadores do relaxamento (principalmente vascular) da musculatura lisa, que resulta na liberação do NO das células endoteliais adjacentes. Este receptor atua através da via do  $IP_3$  estimulando um aumento na concentração de  $[Ca^{2+}]_i$  levando a vasodilatação, sendo a ACh um agonista não seletivo para este receptor .

As moléculas de acetilcolina permanecem ligadas aos receptores durante um período de cerca de 2ms, em média, e sofrem rápida hidrólise após a sua dissociação, de modo que elas não podem associar-se a um segundo receptor. Outros mediadores, como a noradrenalina, também inibem a liberação de acetilcolina.

A acetilcolina e os ésteres relacionados da colina são agonistas tanto nos receptores muscarínicos quanto nicotínicos, porém atuam com maior potência sobre os muscarínicos. A vasodilatação também pode ser produzida secundariamente pela ACh, que inibe a liberação da noradrenalina pelas terminações adrenérgicas. Se o endotélio estiver lesado, a ACh pode estimular receptores das células musculares lisas dos vasos sanguíneos e causar vasoconstrição (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

**Carbacol (CCh):** o carbacol (éster carbamílico da colina) é um agonista não seletivo para receptores muscarínicos ( $M_3$ ), que causa vasodilatação, foi sintetizado e pesquisado na década de 30 (Bruning *et al*, 1994).

O carbacol, que é um éster carbamílico não substituído, é totalmente resistente à hidrólise pela AChE ou colinesterases inespecíficas; assim, sua meia-vida é tão longa que pode ser distribuído para as áreas com pouca circulação sanguínea. O carbacol é utilizado como instrumento experimental, não tem nenhum uso clínico (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

### 3.3- Outros agentes vasoativos

**Nitroprussiato de sódio:** o nitroprussiato de sódio é um vasodilatador não seletivo (independente de endotélio). É metabolizado pelas células musculares lisas em seu metabólito ativo, o NO, este ativa guanilato ciclase levando à formação de GMP cíclico e à vasodilatação (Murad, 1986).

A ativação metabólica do SNP é catalisada por um sistema gerador de NO diferente do da nitroglicerina, provavelmente responsável pela diferença na potência desses agentes nos diferentes locais vasculares e pelo desenvolvimento de tolerância à nitroglicerina, mas não ao nitroprussiato (Kowaluk *et al*, 1992).

O SNP é uma molécula instável que sofre decomposição em condições fortemente alcalinas e quando exposta à luz.

O metabolismo do SNP pelo músculo liso é iniciado por sua redução, que é seguida pela liberação de cianeto e de NO (Bates *et al*, 1991).

Embora o nitroprussiato de sódio seja conhecido desde 1850 e seu efeito hipotensivo nos seres humanos tenha sido descrito em 1929, sua segurança e utilidade no controle a curto prazo da hipertensão grave só foram demonstrados em meados dos anos de 1950. Posteriormente, vários pesquisadores mostraram que o SPN também é eficaz para melhorar a função cardíaca nos pacientes com insuficiência ventricular esquerda (Rang *et al*, 2004; Hardman *et al*, 1996).

### 3.4- Óxido Nítrico

Furchgott & Zawadzki descobriram em 1980, que o endotélio liberava um fator que relaxava a musculatura lisa vascular, a qual chamaram de “fator relaxante derivado do endotélio”, este fator posteriormente foi identificado como NO (Ignarro *et al*, 1987; Palmer *et al*, 1987; Furchgott *et al*, 1988; Myers *et al*, 1989).

O óxido nítrico constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morris & Billiar, 1994), consiste basicamente em um único átomo de nitrogênio que possui sete elétrons ligados a um átomo de oxigênio, que possui oito elétrons, tendo um elétron desemparelhado (Beckman & Koppenol, 1996).

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (James, 1995).

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, com meia vida de menos de 5 segundos. O caráter de radical livre confere-lhe propriedades químicas específicas de reatividade. Sendo um gás altamente difusível e lipofílico, o NO pode-se dispersar rapidamente da sua fonte e atravessar as múltiplas membranas celulares caminho a interagir e realizar atividades biológicas (Moncada *et al*, 1991).

Ao contrário de muitas outras moléculas sinalizadoras, os alvos do NO estão freqüentemente a alguma distância dos locais de síntese do NO. Os receptores moleculares para o NO incluem uma variedade de proteínas intracelulares e extracelulares, e o próprio NO pode servir como um segundo mensageiro como resultado direto de sua característica difusível e lipofílico.

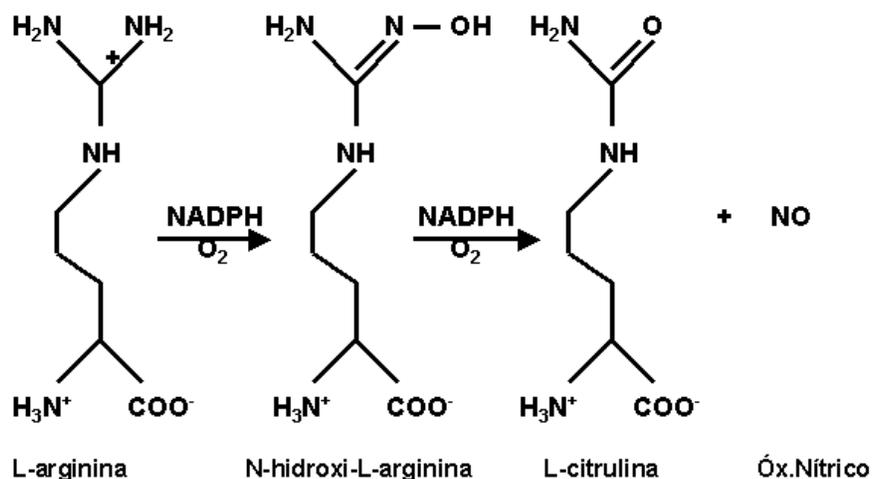
O NO tem um papel chave na biologia celular a qual é reflexo das suas propriedades químicas especiais (para revisão ver Dudzinski *et al*, 2005).

### **Síntese do Óxido Nítrico**

O óxido nítrico é um radical livre produzido endogenamente a partir da oxidação de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal do aminoácido L-arginina por oxigênio molecular.

A biosíntese do NO é catalisada por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), estas enzimas se apresentam na forma dimérica que contém um grupamento heme e requer de flavinas FAD e FMN, bem como o cofator pteridina

(6R)-5,6,7,8-tetrahydro- L-biopterina (H4 biopterina) para catalisar a oxidação da L-arginina (Huang *et al*, 1995; Steuhr, 1997), como mostrado na Figura 2.



**Figura 2-** Biosíntese do óxido nítrico.

Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificadas. Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas, produtos de três genes distintos mas têm aproximadamente de 50%-60% de similaridade na seqüência.

Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de Ca<sup>2+</sup> e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS, tipo II), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Moncada *et al*, 1991; Cho *et al*, 1992; Abu-Soud *et al*, 1994; Marletta, 1994).

A cNOS e a iNOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (Marletta, 1994) e já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os genes clonados (Bredt & Snyder, 1990; Lyons *et al.*, 1992; Nishida *et al.* 1992).

A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (nNOS, tipo I), que é expressada extensamente nos neurônios dos sistema nervoso central e periférico, mas encontrada também no músculo esquelético, na camada adventícia de alguns vasos sanguíneos, no epitélio pulmonar, no sistema gastrointestinal, e sistema genitourinário

(Bredt & Snyder, 1989; Knowles *et al*, 1989; Wang, 2004, Boissel, 2004) e a NOS endotelial (eNOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares (Moncada *et al*, 1991), nas plaquetas e nos cardiomiócitos (Radomski *et al*, 1990; Dekker, 2002; SenBanerjee, 2004).

A NOS induzível (iNOS, tipo II) foi primeiramente reconhecida em macrófagos ativados, mas têm sido identificada também em diferentes e numerosos tipos de células, incluindo monócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, músculo liso vascular, miócitos, osteoblastos, fibroblastos, epitélio (para revisão ver Dudzinski *et al*, 2005).

### **Relaxamento Vascular e o Óxido Nítrico**

O NO tem um papel importante na regulação do tônus vascular e da homeostasia, o que pode ser comprovado através de várias observações:

- Quando há inibição da NO sintase (NOS) diminui drasticamente a vasodilatação dependente de endotélio, principalmente nos vasos de condutância;
- A administração aguda de inibidores da NOS pode produzir vasoconstrição, em tratamento crônico de ratos com esses compostos induz hipertensão arterial;
- Camundongos que não possuem o gene da NOS endotelial (eNOS) apresentam pressão arterial mais elevada que seus Controles (Cowan & Cohen, 1991; Moncada *et al*, 1991).

Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da eNOS presente nestas células e à conseqüente produção de NO (Busconi & Michel, 1993).

A eNOS está estrategicamente ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às células sanguíneas circulantes.

A regulação das eNOS é dinâmica e envolve numerosas vias de fosforilação e de defosforilação. Todas as isoformas de NOS estão sujeitos à regulação pela fosforilação.

As eNOS são conhecidos por ser fosforilados em múltiplos sítios, incluindo Ser 1177 e Ser 635, que são sítios estimuladores, e Thr 495 e Ser 116, os quais são sítios inibidores (este sistema de numeração faz referência aos sítios de fosforilação da isoforma eNOS em humanos a Ser 1177 e Thr 495, que correspondem a Ser 1179 e Thr 497 em eNOS de Bovinos).

A proteína quinase Akt (também conhecido como proteína quinase B) parece ser a chave determinante na fosforilação da eNOS em Ser 1177 e a conseqüente ativação da eNOS em níveis basais e em resposta aos agonistas (Bauer *et al*, 2003).

A proteína quinase Akt está sob o Controle direto da fosfoinosetide-3-quinase (PI3K), a qual é controlada por agonistas das eNOS, esta via PI3K/Akt é de grande significância na regulação coordenada do estado de fosforilação das eNOS e da atividade enzimática (Vanhaesebroeck *et al*, 1997).

No contraste à fosforilação em Ser 1177, a fosforilação em Thr 495 parece atenuar a atividade da enzima das eNOS impedindo a ligação à calmodulina (Flemming, *et al*, 2001).

A Ser 635 pode representar um segundo estímulo de fosforilação em resposta ao estímulo basal, tal como *shear-stress*, e agonistas da proteína quinase A (Boo *et al*, 2002).

A Ser 617 pode ser um outro sítio de fosforilação da Akt e pode servir para sensibilizar a eNOS para a ligação com calmodulina e modular a fosforilação em outros locais das eNOS (Bauer *et al*, 2003; Michell *et al*, 2002).

Além desta via regulatória de fosforilação existem vias regulatórias que envolvem a acilação e o cálcio/calmodulina, e o recentemente reconhecido regulação por S-nitrosilação da eNOS. (Erwin *et al*, 2005; Ravi *et al*, 2004; para revisão ver Dudzinski *et al*, 2005)

O NO é conhecido por reagir com numerosas hemoproteínas como a guanilato ciclase. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (aGC).

A sGC é uma proteína heterodimérica que contém dois sub-unidades de: 73kDa  $\alpha_1$  e 70kDa  $\beta_1$ , ambos são requeridos para a atividade catalítica. No geral, o domínio N-terminal da sGC (especialmente monomeros  $\beta$ ) ligam-se ao grupamento heme, entretanto as funções catalíticas residem no domínio C- terminal da sGC.

A Exposição da sGC a 10-100 nM de NO resulta na ligação ao grupamento heme deslocando o ligante axial histidina, deixando um ferro do pentacoordenado, e deslocando o átomo do ferro fora do plano de seu anel do porfirina.

Esta mudança conformacional conduz à ativação alostérica do dímero sGC e de aumento de 500 vezes na sua atividade.

A aGC catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (Fleming & Busse, 1999; Lopez-Ongil *et al*, 2001; Rivero-Vilches *et al*, 2003).

Na parede dos vasos, o NO deriva das eNOS difunde-se do endotélio através das membranas das células para o músculo liso vascular.

O alvo do cGMP no músculo liso vascular é a PKG, esta mesma PKG ativa a MLCP (Etter *et al*, 2001).

O cGMP média a defosforilação da miosina do músculo liso revogando a contração tônica do aparelho contráctil resultando em relaxamento e vasodilatação (Surks *et al*, 1999).

As propriedades relaxantes do cGMP são realçadas pela habilidade da MLCP de dessensibilizar os elementos contrácteis do músculo liso ao cálcio (Bolz *et al*, 2003).

O cGMP diretamente e indiretamente modula também outros alvos, como: GPCRs, canais do íons, PLC, fosfodiesterases (o qual pode modular os níveis celulares de cGMP ou de cAMP), tirosina quinases, e fosfatases de tirosina (Gewaltig & Kojda, 2002).

O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para a célula, a inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e o aumento do seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático (Gewaltig & Kojda, 2002).

A proteína quinase dependente de GMP cíclico (PKG) ativa canais de  $\text{K}^+$  induzindo hiperpolarização ou estimula a saída  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma da célula.

Varias sub classes de canais de  $\text{K}^+$  são relacionadas dos quais os mais importantes identificados são como: de grande condutância, canal de  $\text{K}^+$   $\text{Ca}^{2+}$ -ativado (MaxiK, BK), canal de  $\text{K}^+$  sensível a ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), canal de  $\text{K}^+$  voltagem-dependente (Kv) (Beech, 1997; Nelson & Quayle, 1995; Standen & Quayle, 1998; Waldron & Cole, 1999), e canais internos retificadores de  $\text{K}^+$  (Kir) (Edwards *et al*, 1998; Savage *et al*, 2003).

A ativação de canais de  $\text{K}^+$  diretamente pelo NO sem envolver a participação do GMP cíclico também já foi descrita (Lincoln *et al*, 1994).

### **Citotoxicidade do Oxido Nítrico**

Ficou demonstrado que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (Hibbs *et al*, 1988; Marletta *et al*, 1988), capaz de modular a permeabilidade da BHE, difundindo-se de células para o SNC, e a resposta local no sítio inflamatório (Pender & Sears 1984).

A NOS induzível (iNOS), é independente de  $\text{Ca}^{2+}$ , sem expressão sob condições normais, foi primeiramente reconhecida em macrófagos ativados, é expressa em situações patológicas induzida em resposta a estímulos inflamatórios por algumas citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, monócitos,

neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, músculo liso vascular, miócitos, osteoblastos, fibroblastos, epitélio, linfócitos T, células endoteliais, condriócitos e plaquetas (Moncada *et al*, 1991; Marín & Rodríguez-Martínez, 1997; Cho *et el*, 1992).

A iNOS para sua expressão demanda algumas horas, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a cNOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular (Dusting & MacDonald, 1995).

O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais.

A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório.

A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (James, 1995; Moncada *et al*, 1991).

Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular.

Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio.

Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido ( $O_2^-$ ) resulta na formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante de proteínas.

O  $ONOO^-$  pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio ( $H^+$ ), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil ( $HO^-$ ), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do  $O_2^-$  (Beckman & Koppenol, 1996).

A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas.

A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

### **Interações entre o Óxido Nítrico e a Ciclooxygenase**

Existem diferentes interações entre NOS e a Ciclooxygenase (COX).

Sob circunstâncias basais, na modulação de muitas funções celulares, as prostaglandinas (PGs) e o Óxido Nítrico (NO) representam alguns dos mediadores locais mais relevantes.

Isto, ocorre em conseqüência da biosíntese e da liberação constitutiva de ambos mediadores através dos complexos bioenzimáticos identificados como [ciclooxygenases (COX-1) para a síntese de PGs e de Óxido Nítrico Sintases (cNOS) para síntese do NO], estas forma constitutivas, são encontrados virtualmente em todos os órgãos. Por outro lado, no processo inflamatório, as isoformas induzíveis destas enzimas (iNOS e COX-2) são detectadas em uma variedade de células, tendo por resultado a produção de grandes quantidades de NO e PGs (Mitchell *et al*, 1995).

A liberação do NO e a PGs em grandes quantidades pelas isoformas induzíveis podem ser prejudiciais para a sobrevivência da célula, por isso associa-se patologicamente estes mediadores com diferentes doenças que acompanham processos inflamatórios tais como: doenças reumáticas, desordens degenerativas crônicas, doenças neuro-inflamatórias: ***Esclerose Múltipla***, desmielinização, doença de Alzheimer, etc. (Genis *et al*, 1992; Salvemini *et al*, 1994, 1993 a,b; Mitchell *et al*, 1995; Cao *et al*, 1996; Salvemini & Masferrer, 1996; Schwab *et al*, 2000a,b; Pereira *et al*, 2000; Almer *et al*, 2001; Araki *et al*, 2001).

O mecanismo pelo qual o NO exerce algum efeito benéfico ou maléfico, inclui a ativação da guanilato ciclase, formação de peroxinitrito, apoptose e regulação da ciclooxigenase (Bargetta *et al*, 1998).

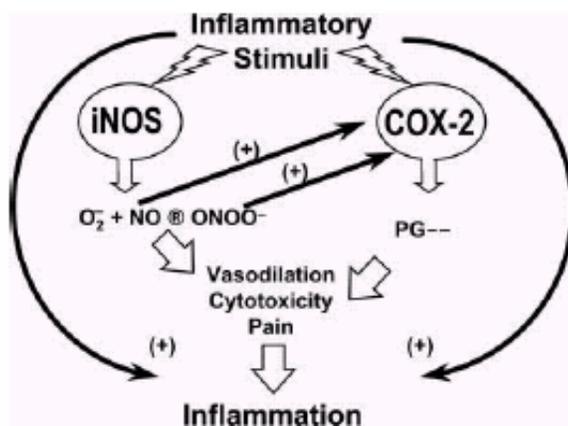
O NO não somente estimula a síntese da PG, mas também regula a expressão da proteína COX-2 (Hughes *et al*, 1999).

A possível interação entre as vias biossintéticas do NO e da PG foi estudada para verificar uma aproximação combinada possível no tratamento de muitas doenças (Abramson *et al*, 2001; Mebazaa *et al*, 2001; Beierwaltes, 2002; Davel *et al*, 2002; Gallo *et al*, 2002; Naoki *et al*, 2002; Sanchez *et al*, 2002; Shinmura *et al*, 2002; Takeuchi *et al*, 2002; Vayssettes-Courchay *et al*, 2002; Kawabe *et al*, 2003; Slomiany & Slomiany, 2003).

Evidências sugerem que há "uma **comunicação cruzada** considerável" entre as vias biossintéticas do NO e da PG que envolvem uma modulação ativa operada por reação e produtos, incluindo o NO, e as PGs, e nucleotídeos cíclicos. Entretanto, o efeito final destas interações não estão claros, e o efeito do NO na biossíntese e na liberação da PG falta ser melhor elucidado. A interação entre a maquinaria do NO e geração de PG ocorre em vários níveis.

Uma ligação importante entre as vias das NOS e de COX foi feita em 1993 por Salvemini *et al*, quando demonstraram que a liberação aumentada de PGs, nos mecanismos inflamatórios, foram dirigidos quase inteiramente pelo NO. Este estudo levantou a possibilidade que as enzimas COX representam alvos "receptores" endógenos importantes para modulação pelo papel multifacético do NO.

A exposição de fibroblastos estimulados pela IL-1 $\beta$  ao gás NO ou outro doador de NO (doador SNP e GTN) aumentou a atividade da COX-2 pelo menos em 4 vezes; isto resultou na produção aumentada de PGs (Fig. 3). (Salvemini *et al*, 1993a).



**Figura 3-** Formação do NO e promoção da atividade de COX-2 (Mollace *et al*, 2005)

Também foi apresentado que o NO aumenta a liberação de PGI<sub>2</sub> nas células endoteliais (Salvemini *et al*, 1996).

Neste sentido, células macrófagos de rato da linha Raw-264.7 foram estimuladas com endotoxina para induzir as enzimas iNOS e COX-2. Isto resultou na produção de grandes quantidades de NO e de PGs. A inibição da atividade de iNOS por inibidores de NOS não seletivos tais como o L-NMMA ou inibidores mais seletivos de iNOS tal como Aminoguanidina (Corbett *et al*, 1992; Misko *et al*, 1993; Moore *et al*, 1994; Connor *et al*, 1995) atenuou, como esperado, a liberação do NO destas células.

O achado notável foi que quando a liberação de NO foi inibida, havia uma inibição simultânea da liberação de PG. Estes resultados sugeriram que a liberação de NO endógeno dos macrófagos exercem uma ação estimulatória na atividade da COX-2 que eleva a produção de PGs. (Salvemini *et al*, 1993a), isto foi confirmado também em células do SNC (Mollace *et al*, 1995, 1997, 1998), o NO não somente estimula a síntese da PG, mas também regula a expressão da proteína COX-2 (Hughes *et al*, 1999).

Por outro lado, a ativação de COX, por sua vez, modula a via L-arginina-NO e mostrou-se que a inibição de COX diminui a atividade dos NOS em plaquetas humanas (Chen *et al*, 1997). Ambas vias COX e NOS regulam a função plaquetária; o tromboxane A<sub>2</sub> induz a agregação plaquetária, entretanto o NO a inibe.

A razão para as discrepâncias encontradas por diversos observadores na avaliação da **comunicação cruzada** entre a biossíntese do NO e da PG é ainda pouco clara. Assim, os mecanismos moleculares envolvidos em ambas, ativação de NOS e COX podem ter um papel crucial na compreensão das interações recíprocas entre o NO e o COX.

Nas primeiras observações, NO foi sugerido como ativador direto das enzimas de COX. Entretanto, é improvável que o NO ative o COX ligando-se diretamente a seu grupo prostético heme (Tsai *et al*, 1994), outros mecanismos foram sugeridos ao respeito:

A primeira possibilidade é que o NO atua como um antioxidante. A atividade de COX fornece também uma fonte do ânion superóxido, e postulou-se que o superóxido poderia estar envolvido na autoinativação de enzimas COX (Egan *et al*, 1976). O NO interage com o aniôn superóxido e limita as quantidades do radical necessário para a autoinativação (Gryglewski *et al*, 1986). Consequentemente, uma possibilidade poderia ser que NO aumente a atividade de COX removendo o superóxido e agir como um antioxidante que impede a autoinativação de COX.

A segunda possibilidade é a formação dos nitrosotióis. Resíduos de cisteína nitrosilatos de NO no domínio catalítico das enzimas COX conduzem à formação de nitrosotióis; estes podem produzir mudanças na estrutura da enzima que resulta na eficiência catalítica aumentada (Hajjar *et al*, 1995).

A terceira possibilidade é a geração do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o produto do acoplamento do aniôn superóxido e do NO. O Peroxinitrito estimulou a atividade COX-1 em células do músculo liso aórtico (Upmacis *et al*, 1999). O papel relativo do NO e do peroxinitrito na ativação de COX faltam ser definidos, embora não haja dúvida que ambas as espécies estão envolvidas ao menos *in vitro*.

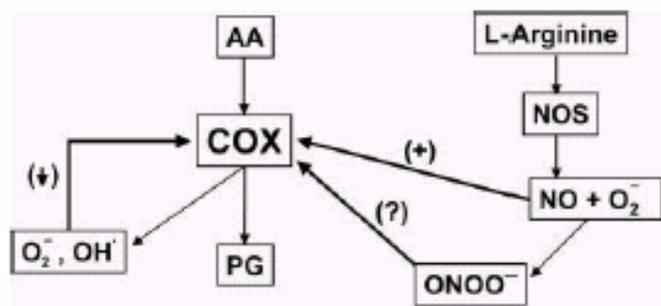
Ultimamente, evidências crescentes sugerem que as concentrações intracelulares do NO e do PGs podem ser relevantes em células inflamatórias como um interruptor de liga/desliga modulando sua própria biossíntese e das enzimas NOS/COX.

Sugerindo que a liberação constitutiva da PG através de COX-1 modula, em uma maneira oposta, as enzimas induzíveis NOS e COX (para revisão ver Minghetti & Levi, 1998). Assim, os níveis basais de NO e PGs modulam sua própria liberação afetando o NOS e COX constitutivo.

O NO modula assim a produção de eicosanóides agindo em diversos níveis. Assim, nas condições inflamatórias onde ambos os sistemas iNOS e COX-2 são induzidos, há uma indução mediada pelo NO que conduz a COX-2 à formação aumentada das PGs proinflamatórias tendo por resultado uma resposta inflamatória exacerbada.

Novos dados sugerem que o peroxinitrito, o produto da reação entre o NO e o anião superóxido, joga um papel importante na regulação das enzimas COX. Certamente o NO contribui à ativação de iNOS e COX-2. Assim, as enzimas de COX são claramente alvos "receptor" importantes para a ação do NO e outras espécies reativas de oxigênio tal como o peroxinitrito (para revisão ver Mollace *et al*, 2005)

Para resumir certamente, o NO pode interferir diretamente na expressão de COX e na biossíntese das PGs. Por outro lado, o AA e seus metabólitos gerados por isoformas de COX podem também interferir na biossíntese do NO. Além disso, a expressão dos NOS parece correlacionar-se com os receptores da PG e os mensageiros intracelulares, tais como o cAMP (Fig.4). Além disso, ambos NO e PGs interagem com sua própria via biossintética respectiva modulando os eventos molecular e expressão subjacente dos NOS e COX (para revisão ver Mollace *et al*, 2005)



**Figura 4-** Possível Mecanismo pelo qual o NO modula a COX (Mollace *et al*, 2005)

### Participação do Óxido Nítrico na EAE

Evidências acumuladas sugerem o envolvimento do NO na patogênese da EAE.

O estudo mostrando o aumento da produção de intermediários reativos do nitrogênio bem como do oxigênio por células mononucleares e leucócitos polimorfonucleares periféricos, provenientes do SNC, e sistêmico de ratos com EAE, foi a

primeira demonstração da participação do NO na encefalomielite alérgica experimental (MacMicking *et al*, 1992).

A detecção de aumento na expressão de iNOS foi observada no sistema nervoso central de ratos Lewis com EAE (Koprowski *et al*, 1993; Okuda *et al*, 1995; Calza *et al*, 1997; Cross *et al*, 1996), assim como resultados obtidos no nosso laboratório mostraram que ratos com EAE apresentam aumento da expressão de iNOS e da produção sistêmica de NO (Teixeira *et al*, 2002).

Recentemente nosso grupo tem visto que animais recuperados dos sinais clínicos de EAE não são diferentes dos Controles em termos da atividade de NOS no cérebro, da atividade inibitória endógena (EIA) de NOS, ou a expressão de 3-nitrotirosina (NT). Estes resultados sugerem que paralelo à reversão dos sintomas da doença, ocorre a normalização da produção do óxido nítrico e de espécies relacionadas (Teixeira *et al*, 2005).

Outra evidência que sugere a participação do NO no desenvolvimento da EAE foi indicada após o estudo que mostra que oligodendrócitos são mortos após exposição ao NO, sugerindo uma função citotóxica para o NO (Merrill *et al*, 1993; Xiao *et al*, 1996) ao mesmo tempo que participa da degeneração neuronal e a desmielinização (Skaper *et al*, 1995; Smith *et al*, 2001).

Da mesma forma que na EAE há evidências que envolvem a presença de NO e a expressão da iNOS em estudos com a condição patológica da esclerose múltipla (Bagasra *et al*, 1995).

Johnson *et al*, 1995, comparou níveis de nitrato e nitrito, tendo como resultado altos níveis destes em pacientes com EM quando comparados com indivíduos normais.

Uma demonstração importante da participação da iNOS nos pacientes com EM foi através do estudo onde o mRNA para iNOS foi detectado em cem por cento dos cérebros de pacientes com EM e não nos indivíduos normais examinados.

Esses resultados demonstraram que iNOS, uma das enzimas responsáveis pela produção de NO, é expressado significativamente no cérebro de pacientes com EM e pode contribuir para a patologia associada com a doença (Bagasra *et al*, 1995).

Em vista dos estudos mencionados, o uso de inibidores da produção de NO tem sido realizado mostrando efeitos em várias patologias (Moilanen & Vappatalo, 1995; Kröncke, 1997; Szabó, 1995 ).

Os resultados dos tratamentos da EAE com inibidores de NOS mostram-se divergentes (Cross *et al*, 1994; Zhao *et al*, 1996; Zielasek *et al*, 1995; Ruuls *et al*, 1996; Gold *et al*, 1997; Cowden *et al*, 1998), devido em grande parte a algumas variáveis, como: período e via de administração dos inibidores, especificidade e dosagem das mesmas, forma de indução do modelo da doença, espécie e sexo do animal, etc.

A maioria dos estudos tem investigado o envolvimento do NO derivado de células inflamatórias em EAE tanto *in-vivo* ou *ex-vivo* (Willenborg *et al*, 1999). Entretanto, estudos *in-vitro* são geralmente carentes e tem sido pouco realizados. Nosso grupo tem examinado a reatividade do músculo liso em Aorta e Artéria Pulmonar de animais com EAE *in-vitro*.

## ***2- OBJETIVOS***

Considerando a importância do NO e seus derivados na homeostasia cardiovascular e os relatos limitados sobre este aspecto fisiológico no modelo da EAE, os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar a evolução temporal de parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca) ao longo do desenvolvimento da doença;
2. Verificar a importância da produção endógena de NO e a participação de produtos derivados de ciclooxigenase na resposta vascular dos animais com EAE;
3. Estudar a reatividade vascular *in vitro* de anéis de aorta e artéria pulmonar provenientes de ratos com EAE.

### *3- MATERIAL E MÉTODOS*

## **Animais**

Ratos Lewis (provenientes do Biotério Central - CEMIB, UNICAMP), de ambos os sexos, com peso corporal compreendido entre 200 – 250g, foram utilizados para a indução da EAE.

Todos os procedimentos envolvendo manipulação dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP, pelo processo n° 483-1.

Parte dos animais utilizados, os destinados ao estudo de reatividade, foi mantida no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em sala com ciclos luz/escuro de 12 horas a  $22 \pm 2$  °C. Os animais foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

A outra parte dos animais, destinados ao estudo de telemetria, foi mantida no próprio Biotério Central - CEMIB, UNICAMP também em sala com ciclos luz/escuro de 12 horas a  $22 \pm 2$  °C, mas separados individualmente em gaiolas. Os animais foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

## **Indução da EAE**

A EAE foi induzida em ratos Lewis sob anestesia por inalação de halotano, através da inoculação de 100 µl de emulsão contendo proteína básica de mielina de cobaia (GP-MBP, 250 µg/ml) e adjuvante completo de Freund suplementado com *Mycobacterium tuberculosis* (Mt, 1.5 mg/ml) em cada pata posterior, no coxim plantar (sub-cutâneo).

Os animais foram pesados e examinados diariamente. Os sintomas da doença foram determinados por estágios conforme segue: sem sinais clínicos (estágio 0), perda do tônus da cauda (estágio 1), paralisia leve dos membros posteriores (estágio 2), paralisia severa dos membros posteriores (estágio 3), tetraplegia (estágio 4) e moribundos ou morte (estágio 5). Ao final do estágio 3, um grupo de 3 a 5 animais foi anestesiado com halotano. As artérias aorta e pulmonar dos animais foram retiradas, imediatamente dissecadas e submetidas aos estudos de reatividade vascular.

## **Tratamentos Farmacológicos**

Os animais foram separados em quatro grupos: Controle, EAE, EAE+AG, EAE+ETO, tanto para o estudo de reatividade e de telemetria. O grupo EAE+AG corresponde ao grupo que recebeu aminoguanidina (AG), um inibidor seletivo para iNOS, (250 mg/Kg/dia preparada em água de bebida e administrada por gavagem) durante todo o período de indução da EAE até atingir o estágio 3. O grupo EAE+ETO corresponde ao tratamento com etoricoxibe (ETO), um inibidor seletivo para COX-2 (10 mg/kg/dia preparado em solução de carboximetil celulose 1% e administrado por gavagem) durante todo o período de indução da EAE até alcançar o estágio 3. Os outros dois grupos Controle e EAE não tiveram nenhum tipo de tratamento.

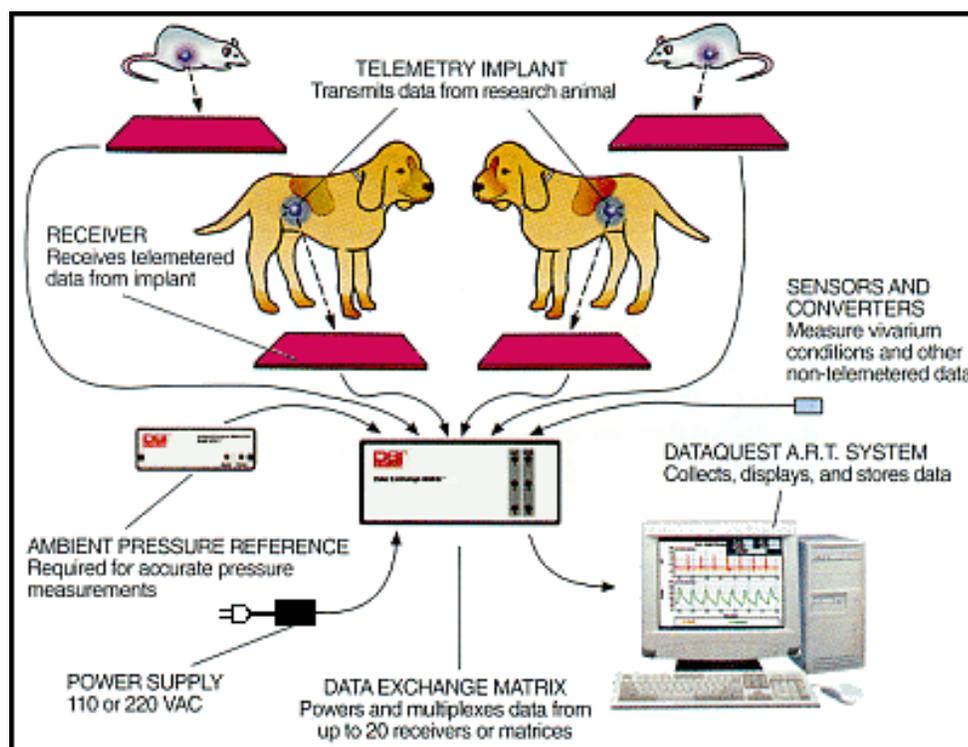
## **Medida da pressão arterial e frequência cardíaca**

Os valores de pressão arterial (sistólica, diastólica e média) e de frequência cardíaca foram medidos através de técnica de telemetria (sistema DataScience International, EUA).

Antes da indução da EAE e da separação dos animais em grupos de tratamento, os animais foram submetidos à uma cirurgia para o implante dos sensores responsáveis pela detecção dos valores hemodinâmicos.

Após anestesia com pentobarbital (50 mg/kg. i.p., como manda o protocolo usado no laboratório para este tipo de procedimentos), sensores específicos para medida simultânea de pressão arterial, frequência cardíaca e atividade motora foram implantados nos animais anestesiados (através de canulação da aorta abdominal descendente). Estes sensores, após ativação por magneto, enviam os dados das variáveis mencionadas acima através de ondas de radiofrequência para o receptor acoplado a computador (Figura 5). Este sistema tem a principal vantagem de permitir mensurar de forma muito precisa as variáveis hemodinâmicas em animais conscientes evitando qualquer possível alteração devida a estresse por manipulação ou contato com o investigador.

Uma semana após o implante dos sensores, os animais tiveram seus valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca determinados. Neste momento, os animais foram separados em 4 grupos, conforme mencionado anteriormente, e realizada a indução da EAE. Os grupos EAE+AG e EAE+ETO iniciaram no mesmo dia da indução da EAE a administração do respectivo tratamento: aminoguanidina (250 mg/Kg/dia) ou eteroxibite (10 mg/Kg/dia). As variáveis hemodinâmicas foram registradas diariamente até que o estágio 3 da doença foi alcançada, quando os animais foram sacrificados.



**Figura 5-** Aquisição dos dados por telemetria

### **Estudo da reatividade *in vitro* de tecido vascular isolado**

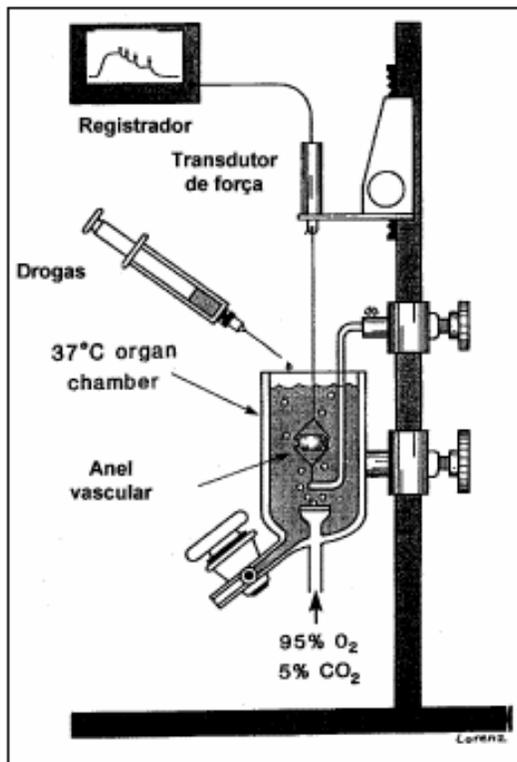
Após anestesia dos animais com halotano, as cavidades torácica e abdominal foram abertas para retirada das artérias aorta e artéria pulmonar. Os vasos foram dissecados para remoção de tecido adiposo e o endotélio em alguns casos foi removido pela

inserção de uma cânula de polietileno. A remoção do endotélio foi avaliada pela ausência de relaxamento vascular após adição de acetilcolina (1  $\mu$ M) em tecidos pré-contraídos por fenilefrina (1  $\mu$ M).

As preparações vasculares das artérias aorta torácica e pulmonar foram cortadas na forma de anéis (3-4 mm) e montadas em banhos de 10 ml contendo solução de Krebs-Henseleit (em mM: NaCl, 118.4; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0 e glicose, 11.1), mantida a 37°C e borbulhada com uma mistura de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>.

Os anéis foram então suspensos entre duas pontas de metal em “L” e uma das pontas foi conectada a um transdutor de força, enquanto a outra foi fixada a uma unidade móvel, permitindo, assim, o ajuste preciso da tensão. A tensão aplicada aos tecidos (10 mN) foi periodicamente ajustada até estabilização e a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (software versão 4.0, AD Instruments, MA, EUA).

Após 60 minutos de estabilização, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M) para obtenção de curvas concentração-resposta (1 nM - 10  $\mu$ M) para acetilcolina (relaxamento dependente do endotélio), carbacol e nitroprussiato de sódio (relaxamento independente do endotélio). Em outra série de experimentos, foram avaliados os efeitos de agentes contráteis, como noradrenalina (10 nM - 100  $\mu$ M), fenilefrina (100 pM - 30 nM), adicionados cumulativamente ao banho. Os resultados obtidos com agentes contráteis foram expressos como valores absolutos (em mN), enquanto os resultados advindos de experimentos com agentes relaxantes foram expressos como percentagem da contração induzida pela fenilefrina (1  $\mu$ M). Os valores de pD<sub>2</sub> (valor do logaritmo negativo da concentração do agonista que causa 50% da resposta máxima), e E<sub>max</sub> (resposta máxima) foram calculados para cada agente vasoativo estudado.



**Figura 6-** Representação esquemática dos banhos orgânicos.

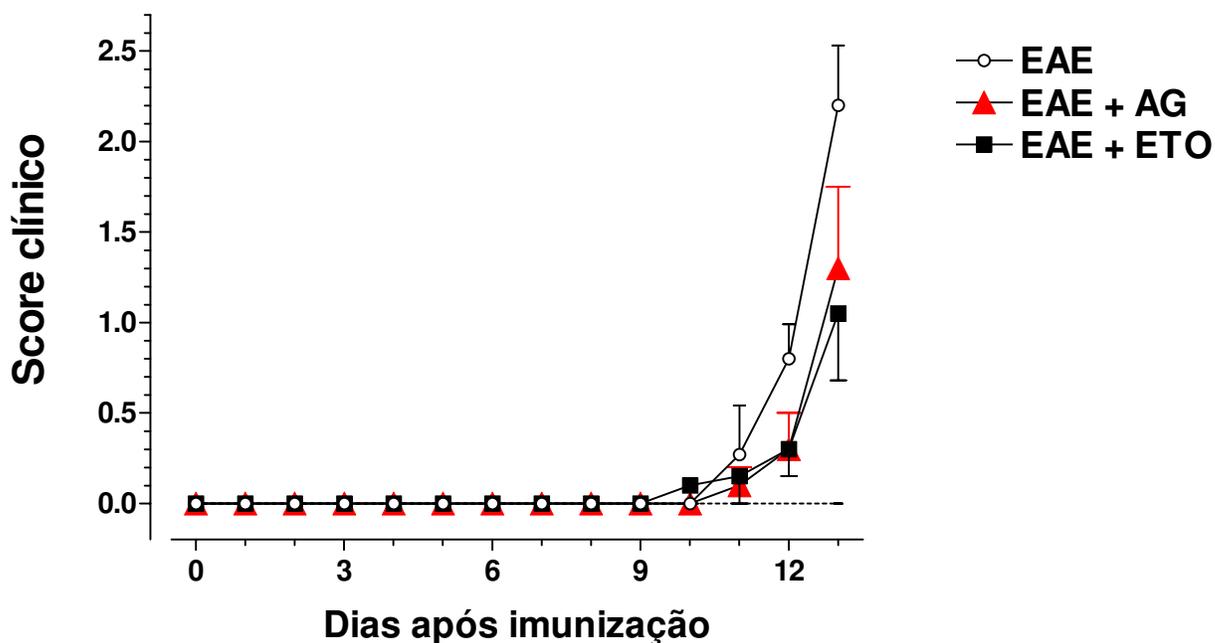
### **Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Student-Neuman-Keuls para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como de significância estatística.

## ***4- RESULTADOS***

## Evolução Clínica

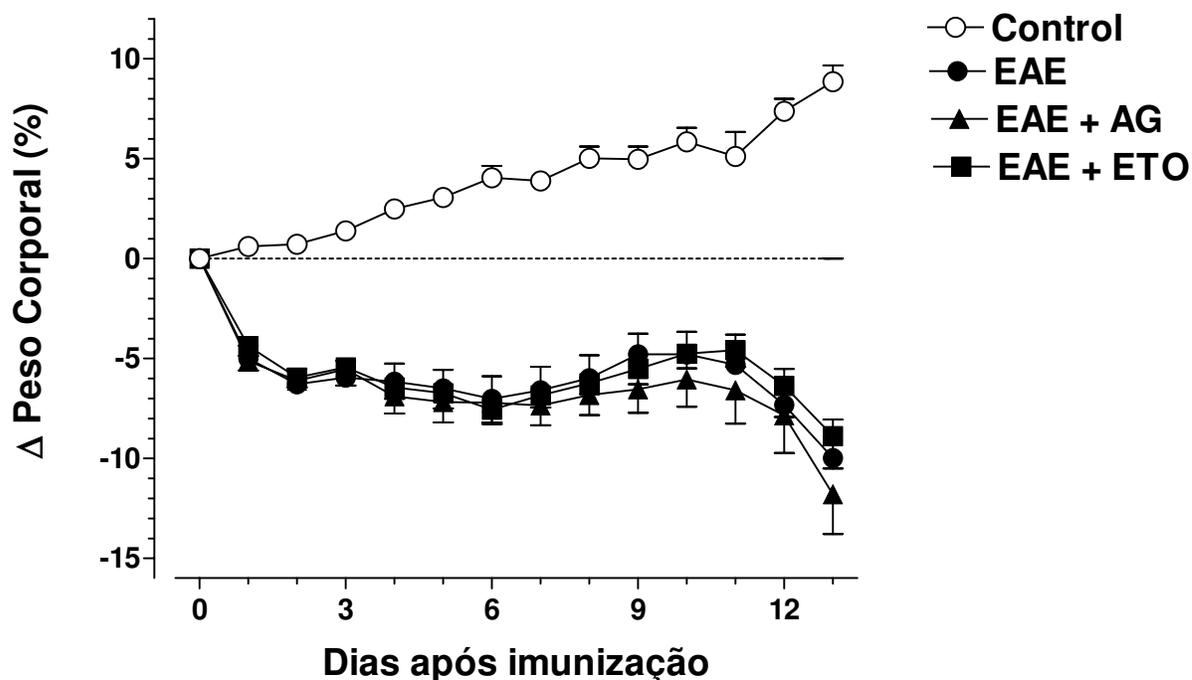
A figura 7, mostra a evolução dos sinais clínicos em função do tempo aproximado que dura a doença EAE. Observamos que no décimo dia após a indução da doença, os animais portadores da EAE sem tratamento começam a apresentar os sinais clínicos com uma progressão rápida da doença, enquanto que os submetidos aos tratamentos tanto com aminoguanidino ou com etoricoxibe tiveram um retardo na manifestação e na severidade dos sinais clínicos.



**Figura 7-** Avaliação temporal dos sinais clínicos (como média  $\pm$  dos valores de score, conforme detalhado em Material e Métodos) de animais com EAE tratados (ou não) com aminoguanidina (EAE+AG) ou etoricoxibe (EAE+ETO).

### Evolução da variação do peso corporal

Na avaliação da variação do peso corporal (Figura 8), observamos que animais com EAE perdem peso de acordo com a progressão da doença quando comparados com os animais controle (que mostram ganho de peso). Observamos ainda, que os animais com EAE e tratados com aminoguanidina (AG; 250 mg/kg/dia, p.o) ou etoricoxibe (ETO, 10 mg/kg/dia, p.o) também apresentam uma significativa perda de peso mostrando que o tratamento não promove qualquer tipo de influência sobre esse fator.

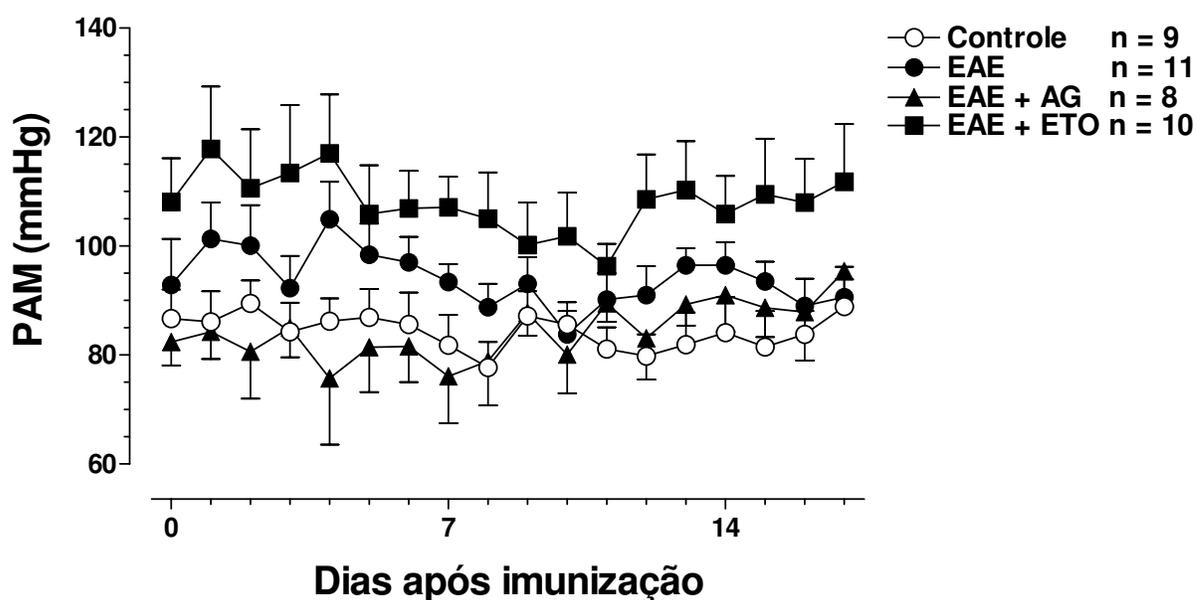


**Figura 8-** Avaliação temporal da variação de peso corporal (como percentual do valor pré-imunização) de animais com EAE tratados (ou não) com aminoguanidina (EAE+AG) ou etoricoxibe (EAE+ETO). Os animais do grupo Controle não receberam qualquer tipo de tratamento.

## Variáveis Hemodinâmicas

### *Pressão Arterial Média*

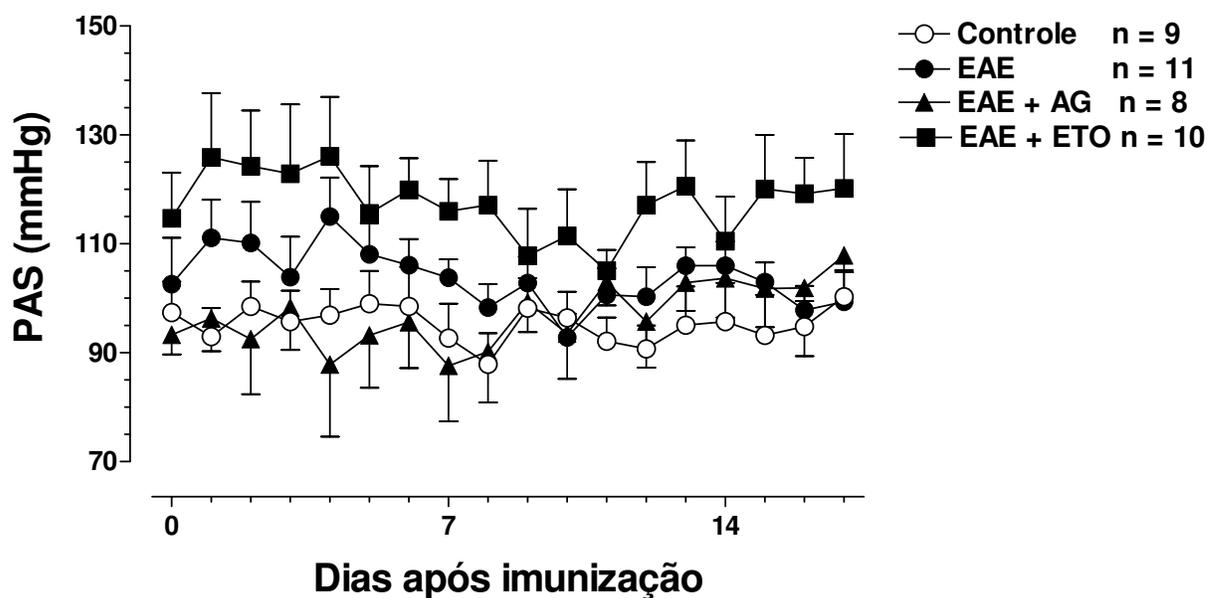
Com relação às variáveis hemodinâmicas e conforme mostrado na figura 9, os animais com EAE apresentam variações na pressão arterial média que estatisticamente não diferem quando comparadas com os animais controle. Também observamos que tanto o tratamento com aminoguanidina ou com etoricoxibe não promoveu alterações que sejam estatisticamente diferentes das obtidas no grupo controle e no grupo com EAE nos diferentes estágios da doença.



**Figura 9-** Medida da pressão arterial média dos diversos grupos experimentais ao longo da duração da doença EAE até alcançar o estágio 3. Os animais do grupo Controle não receberam qualquer tipo de tratamento. Nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos experimentais.

### *Pressão Arterial Sistólica*

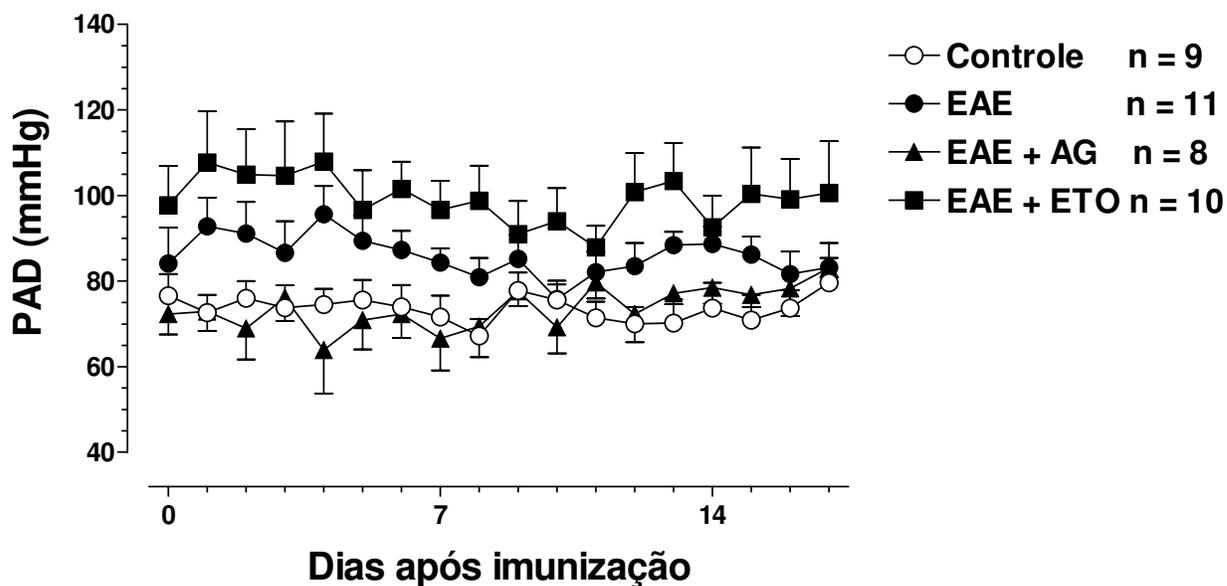
A figura 10, mostra a resposta da pressão arterial sistólica dos 4 grupos experimentais: a) Controle, b)EAE, c)EAE+AG, d)EAE+ETO, ao longo do desenvolvimento da doença que demora aproximadamente em média 17 dias. Não foi observada diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 10-** Medida da pressão arterial sistólica nos diferentes grupos experimentais ao longo do desenvolvimento da EAE, até alcançar o estágio 3. Os animais do grupo Controle não receberam qualquer tipo de tratamento. Nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos.

### *Pressão Arterial Diastólica*

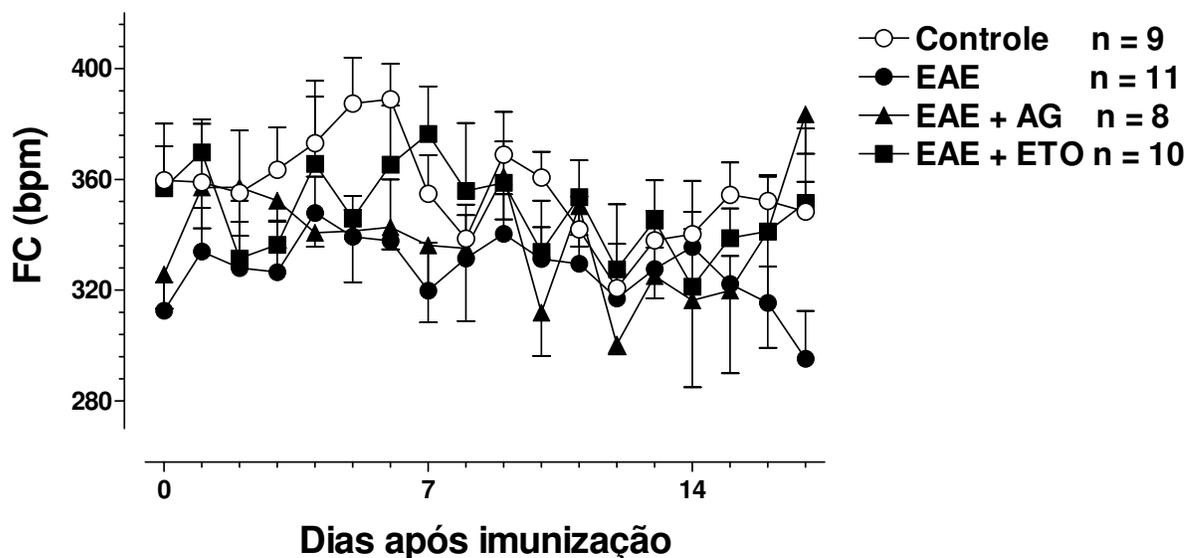
Na figura 11, mostramos valores da pressão arterial diastólica dos diferentes grupos experimentais: a)Controle, b)EAE, c)EAE+AG, d)EAE+ETO. Da mesma forma que nas respostas anteriores, nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos.



**Figura 11-** Medidas da pressão arterial diastólica nos diferentes grupos experimentais ao longo do desenvolvimento da EAE, até o estágio 3. Os animais do grupo Controle não receberam qualquer tipo de tratamento. Nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos experimentais.

### *Frequência Cardíaca*

As medidas da frequência cardíaca conforme evidenciadas na figura 12, não apresentaram alterações significativas quando comparados entre os diferentes grupos experimentais.

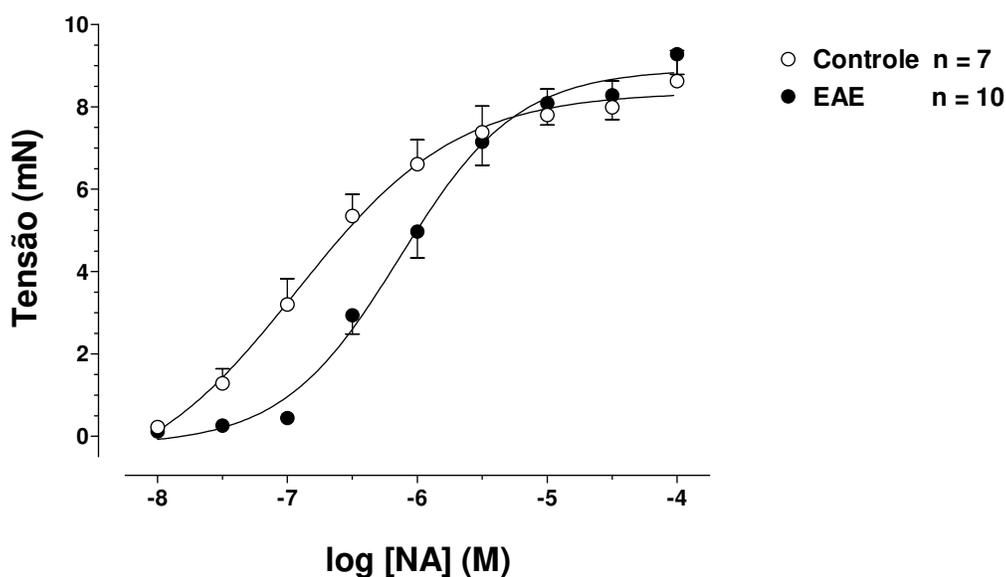


**Figura 12-** Medidas da frequência cardíaca nos diferentes grupos experimentais ao longo da EAE, até alcançar o estágio 3. Os animais do grupo Controle não receberam qualquer tipo de tratamento. Nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos.

## Respostas da reatividade vascular

### Resposta à Noradrenalina em aorta de rato

Na figura 13, podemos observar através da Curva concentração – resposta à Noradrenalina (10 nM – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato com EAE, que estes tecidos apresentam uma menor resposta significativa ( $pD_2$ ), quando comparados aos anéis de ratos **controle**.



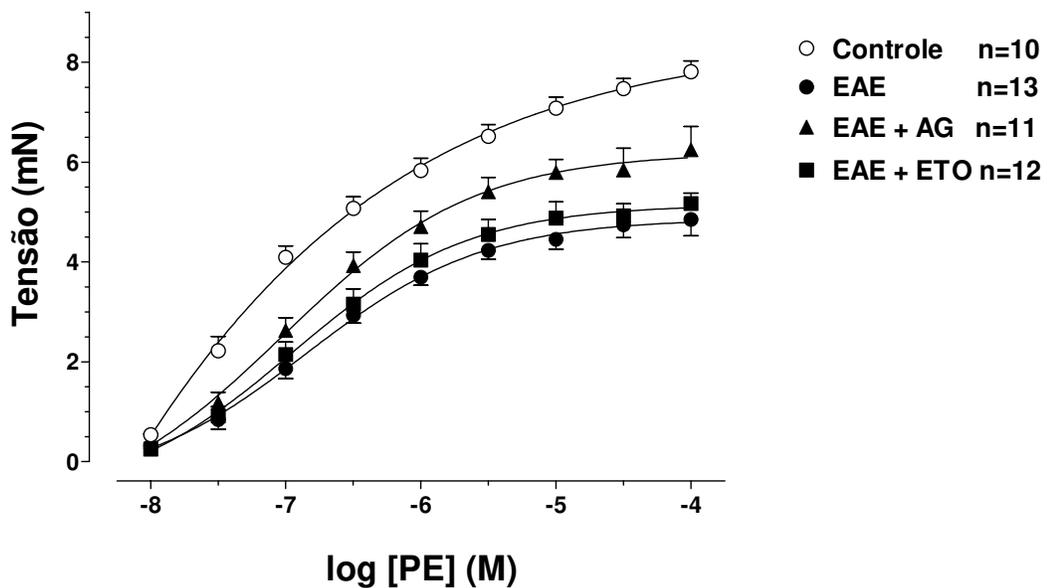
	Controle	EAE
$pD_2$	$7,37 \pm 0,35$	$6,13 \pm 0,09$ ***
$E_{max}$	$8.35 \pm 0.60$	$8.77 \pm 0.51$

\*\*\* $P < 0.001$ , comparado ao controle.

**Figura 13-** Curva concentração – resposta à Noradrenalina (10 nM – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato.

### Resposta a Fenilefrina em aorta de rato

Na figura 14, observamos a Curva concentração – resposta à Fenilefrina (10 nM – 100 µM) em anéis de aorta de rato. As alterações das respostas vasculares foram significativas entre todos os grupos em função da resposta máxima, quando comparados ao controle, quando comparados os grupos EAE vs. EAE+ETO não houve diferenças significativas. Observou-se que houve uma recuperação na contração no grupo tratado com aminoguanidina (EAE+AG) em resposta a fenilefrina. Quando o valor de pD<sub>2</sub> foi avaliado, observamos diferenças muito significativas entre todos os grupos quando comparados ao controle .



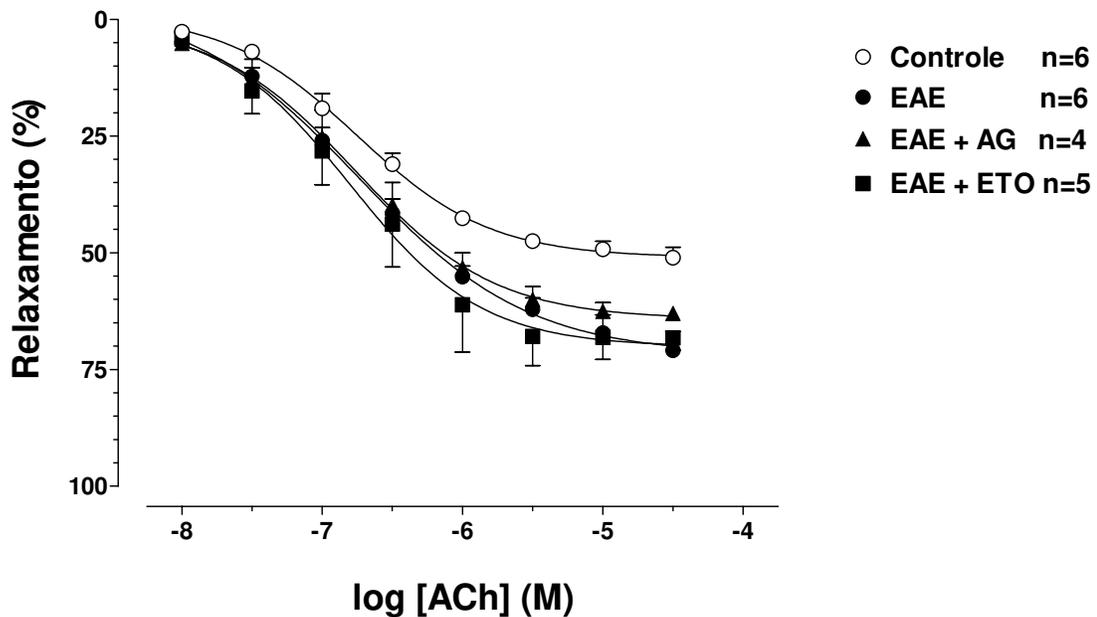
	Controle	EAE	EAE +AG	EAE+ETO
pD <sub>2</sub>	9,24 ± 0,43	6,90 ± 0,10 ***	6,84 ± 0,15 ***	6,89 ± 0,08 ***
E <sub>max</sub>	8.26 ± 0.20	4.80 ± 0.22 ***	6.11 ± 0.23 ***, ++	5.22 ± 0.30***, &

\*\*\*P<0.001, comparado ao controle; ++P<0.01, comparado ao EAE; &P<0.05, comparado ao EAE + AG

**Figura 14-** Curva concentração – resposta à Fenilefrina (10 nM – 100 µM) em anéis de aorta de rato.

### Resposta à Acetilcolina em aorta de rato

Na figura 15, observamos a curva concentração – resposta à Acetilcolina (10 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato. Observamos diferenças significativas na resposta máxima em relação ao grupo Controle. Nenhuma alteração foi observada quando comparamos EAE vs. EAE+ETO e EAE vs. EAE+AG. Em função  $pD_2$ , não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos.



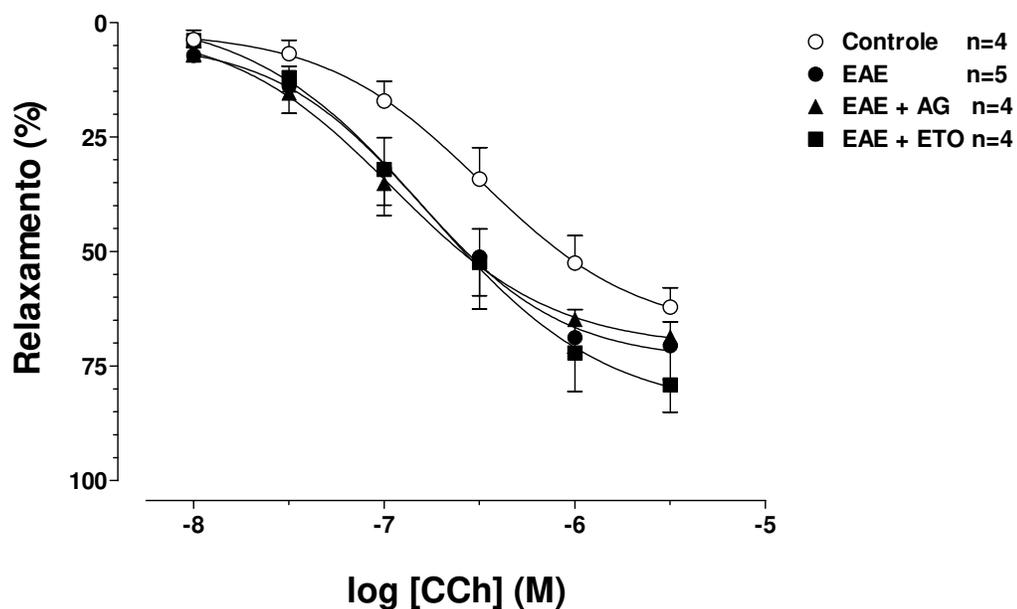
	Controle	EAE	EAE +AG	EAE+ETO
$pD_2$	$6,64 \pm 0,06$	$6,76 \pm 0,14$	$6,77 \pm 0,18$	$6,58 \pm 0,24$
$E_{max}$	$52,81 \pm 2,16$	$72,17 \pm 3,70$ ***	$64,50 \pm 1,61$ *	$77,11 \pm 3,26$ ***, +

\*\*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,05$ , comparado ao controle; +  $P < 0,05$ , comparado ao EAE + AG

**Figura 15-** Curva concentração – resposta à Acetilcolina (10 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato.

### Resposta a Carbacol em aorta de rato

Na figura 16 observamos a Curva concentração – resposta ao Carbacol (10 nM – 3  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato. Embora o perfil dessa resposta seja semelhante a curva dose – resposta à acetilcolina, nenhuma diferença significativa foi observada para valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  em relação ao grupo Controle.

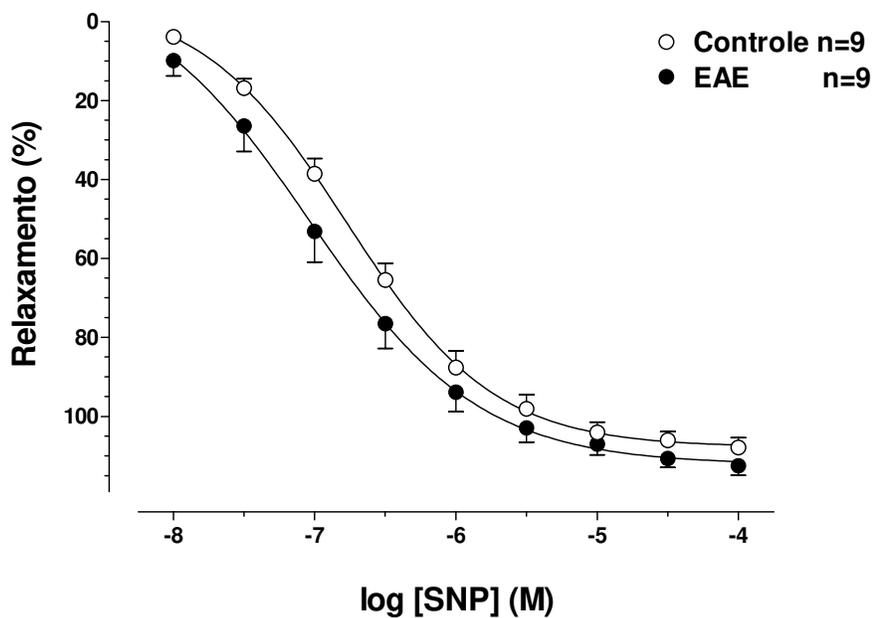


	Controle	EAE	EAE +AG	EAE+ETO
$pD_2$	$6.42 \pm 0.13$	$6.79 \pm 0.12$	$6.96 \pm 0.11$	$6.70 \pm 0.19$
$E_{max}$	$73.98 \pm 1.65$	$76.33 \pm 3.93$	$69.39 \pm 6.62$	$85.03 \pm 4.95$

**Figura 16-** Curva concentração – resposta a Carbacol (10 nM – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato.

### Resposta a Nitroprussiato de sódio

Na figura 17, observamos a curva concentração – resposta ao Nitroprussiato de sódio (10 nM – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato. Também nenhuma alteração significativa foi observada quando comparamos os valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  entre os EAE e o grupo Controle.

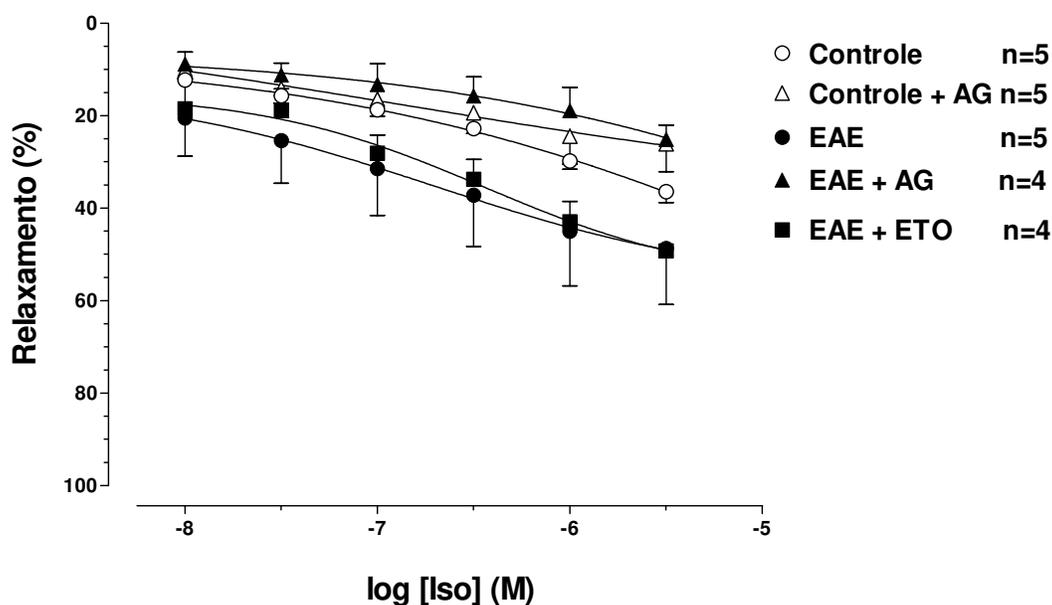


	Controle	EAE
$pD_2$	$6.73 \pm 0.09$	$6.99 \pm 0.14$
$E_{max}$	$107.94 \pm 1.97$	$111.28 \pm 2.21$

**Figura 17-** Curva concentração – resposta a nitroprussiato de sódio (10 nM – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato.

### *Resposta a Isoproterenol em aorta de rato*

A figura 18, mostra a Curva concentração – resposta a Isoproterenol (10 nM – 3  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato. Neste experimento foi adicionado um grupo que não manifestava o modelo EAE, mas tratado com aminoguanidina, foi chamado este grupo de Cont+AG. Nesta figura obtivemos resultados sem diferenças significativas em função da  $E_{max}$  e de  $pD_2$  entre todos os grupos, embora houve uma aparente maior potência do agonista nos tecidos dos animais com EAE, e a reversão no grupo tratado com aminoguanidina.

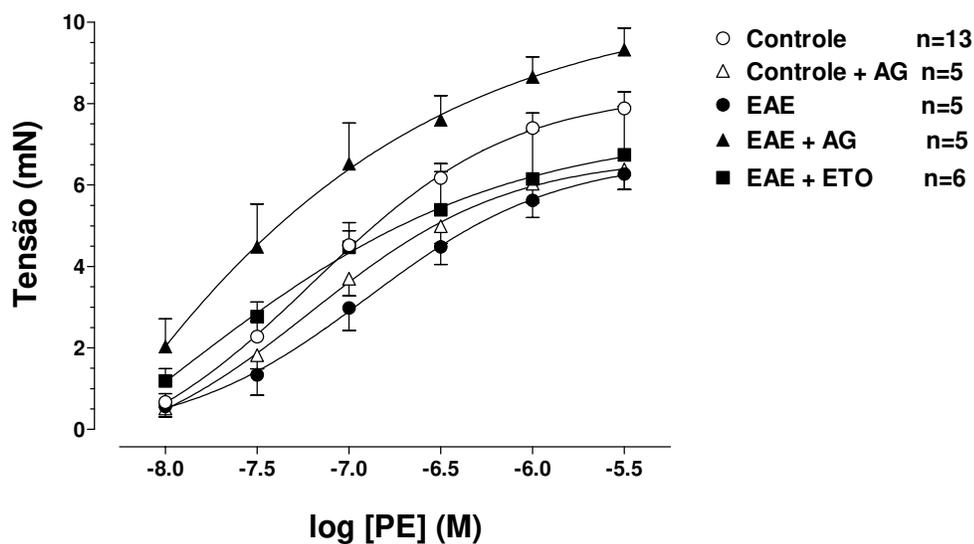


	Controle	EAE	EAE +AG	EAE+ETO	Controle +AG
$pD_2$	$6.06 \pm 0.20$	$6.71 \pm 0.27$	$7.38 \pm 0.71$	$6.74 \pm 0.16$	$6.75 \pm 0.37$
$E_{max}$	$50.10 \pm 5.57$	$63.80 \pm 18.62$	$23.60 \pm 5.02$	$48.02 \pm 5.95$	$44.33 \pm 4.04$

**Figura 18-** Curva concentração – resposta a Isoproterenol (10 nM – 3  $\mu$ M) em anéis de aorta de rato.

### Resposta a Fenilefrina em artéria pulmonar de rato

Na figura 19, observamos a Curva concentração – resposta à Fenilefrina (10 nM – 3 μM) em anéis de artéria pulmonar de rato. Neste experimento também incluímos o grupo Cont+AG. Diferenças significativas foram obtidas na resposta máxima entre alguns grupos experimentais. Com relação aos valores de pD<sub>2</sub>, diferenças significativas foram observadas entre os grupos: Cont vs. EAE+ETO e EAE vs. EAE+ETO.



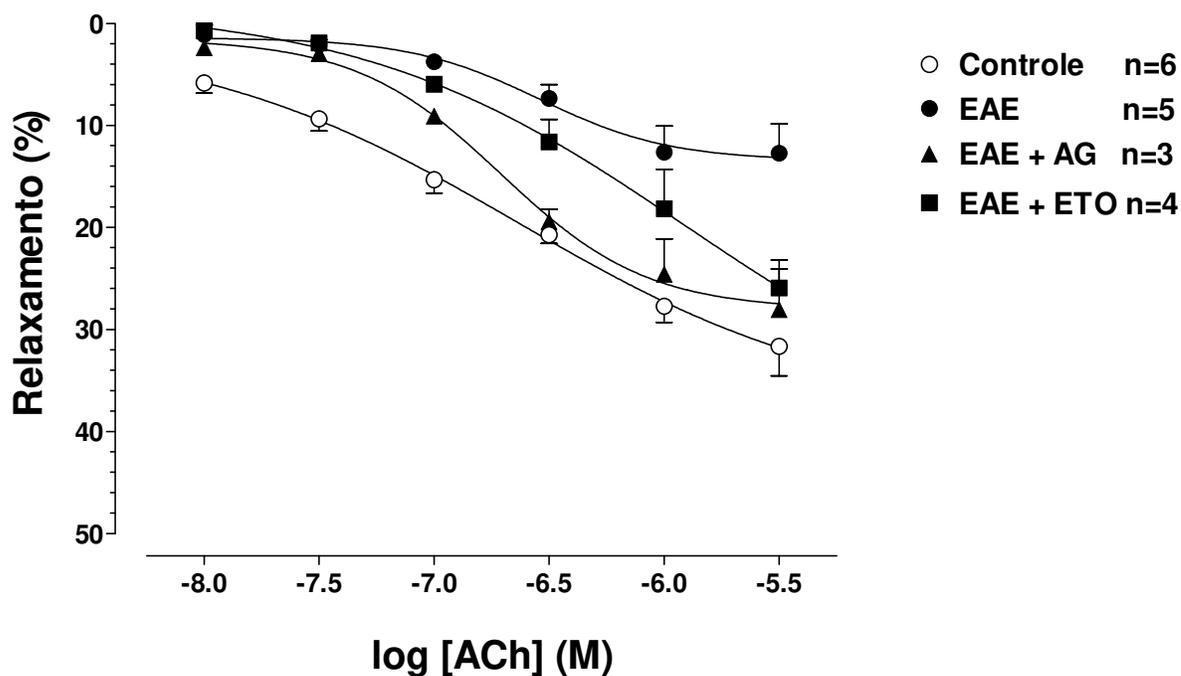
	<i>Controle</i>	<b>EAE</b>	EAE +AG	EAE+ETO	Controle + AG
pD <sub>2</sub>	7.32 ± 0.11	6.98 ± 0.20	8.71 ± 0.69	9.18 ± 0.65***, <sup>+</sup>	7.21 ± 0.14 <sup>+, #</sup>
E <sub>max</sub>	8.07 ± 0.59	6.90 ± 0.54 **	9.63 ± 0.50 <sup>+++</sup>	7.29 ± 1.16	6.68 ± 0.54 <sup>*, &amp;&amp;&amp;</sup>

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , comparado ao controle; <sup>+++</sup> $P < 0.001$ , <sup>+</sup> $P < 0.001$ , comparado ao EAE; &&& $P < 0.001$ , comparado ao EAE + AG <sup>#</sup> $P < 0.05$ , comparado ao EAE + ETO.

**Figura 19-** Curva concentração – resposta à Fenilefrina (10 nM – 3 μM) em anéis de artéria pulmonar de rato.

### Resposta à Acetilcolina em artéria pulmonar de rato

Na figura 20, observamos a curva concentração – resposta à Acetilcolina (10 nM – 3  $\mu$ M) em anéis de artéria pulmonar de rato. Nesta figura observamos diferenças significativas para valores de resposta máxima. Nenhuma diferença significativa foi observada para valores de  $pD_2$ .



	Controle	EAE	EAE +AG	EAE+ETO
$pD_2$	$6,77 \pm 0,13$	$6,17 \pm 0,28$	$6,72 \pm 0,04$	$6,80 \pm 0,23$
$E_{max}$	$36,36 \pm 4,08$	$18,36 \pm 2,73 *$	$28,06 \pm 4,61$	$21,21 \pm 4,40 *$

\* $P < 0.05$ , comparado ao controle.

**Figura 20-** Curva concentração – resposta à Acetilcolina (10 nM – 3  $\mu$ M) em anéis de artéria pulmonar de rato.

## RESUMO DOS RESULTADOS

1. O tratamento de ratos com o inibidor de iNOS aminoguanidina ou com o inibidor de COX-2 etoricoxibe resulta em retardo do aparecimento dos sinais clínicos da EAE, sem afetar o perfil de perda ponderal que segue à imunização com o antígeno de mielina.

2. Não há diferenças significativas nos parâmetros hemodinâmicos pressão arterial e frequência cardíaca entre os animais com EAE e controle. O tratamento com o inibidor de iNOS aminoguanidina ou com o inibidor de COX-2 etoricoxibe dos animais com EAE não resulta em qualquer efeito sobre estas variáveis hemodinâmicas.

3. Tanto anéis de aorta como de artéria pulmonar provenientes de animais com EAE mostraram uma resposta diminuída a agonistas adrenérgicos vasoconstritores, a qual pode ser parcial (no caso da aorta) ou totalmente revertida (no caso da artéria pulmonar) pelo tratamento com aminoguanidina, mas não pelo etoricoxibe.

4. Anéis de aorta provenientes de animais com EAE mostraram uma resposta aumentada ao vasorelaxante dependente de endotélio ACh, a qual pode ser revertida pelo tratamento com aminoguanidina ou etoricoxibe. Em contrapartida, as respostas dos tecidos provenientes de animais controle ou com EAE ao vasorelaxante (independente de endotélio) nitroprussiato de sódio não foram diferentes.

5. As ações vasorelaxantes do agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol não foram diferentes nos anéis de aorta provenientes dos diversos grupos experimentais, apesar da aparente maior potência do agonista nos tecidos provenientes dos animais com EAE, e a reversão pelo tratamento com aminoguanidina.

6. Contrariamente ao observado nos anéis de aorta, a ação vasorelaxante dependente de endotélio da ACh mostrou-se muito deprimida nos anéis de artéria pulmonar de ratos com EAE em relação aos animais controle. Neste tecido, a resposta máxima parece normalizar-se nos animais com EAE tratados com aminoguanidina ou etoricoxibe.

## *5- DISCUSSÃO*

De acordo com nossos resultados, o tratamento de ratos com aminoguanidina (o inibidor de iNOS) ou com etoricoxibe (o inibidor de COX-2) resulta em retardo do aparecimento dos sinais clínicos da EAE, sem afetar o perfil de perda ponderal que segue à imunização com o antígeno de mielina.

Embora os trabalhos utilizando inibidores sintéticos da NOS em animais com EAE sejam muito divergentes na literatura, nossos resultados obtidos com o tratamento aminoguanidina leva-nos em concordância com outros autores. Altos níveis de NO liberados pela enzima iNOS possui atividade patogênica na EAE. Zielasek *et al* em 1995, utilizaram quatro inibidores de NOS (N-monometil-L-arginina, L-MMA; N-nitro-L-arginina, L-NA; aminoguanidina, AG; e N-nitro-L-arginina metil éster, L-NAME) em ambas formas de indução de EAE em ratos Lewis (passiva, através da transferência de células T MBP-específicas, ou ativa, pela administração de MBP) e verificaram que nenhum dos inibidores testados mostrou efeito benéfico no curso clínico da doença. Por outro lado, Zhao *et al*, (1996), verificaram que a AG usada no tratamento de EAE passiva causava proteção à doença e Ruuls *et al*, (1996) verificaram que tratamento realizado com L-nitro arginina metil éster (L-NAME) ou L-nitro metil arginina (L-NMA) agravava a doença de forma ativa. Assim também foi observado por Gold *et al*, (1997) utilizando o N-(1-iminoetil) L-lisina (NIL) e por Cowden *et al*, (1998) utilizando AG e L-NMA.

Nossos resultados estão em concordância com Cross *et al*, (1994) que verificaram que a administração de aminoguanidina era capaz de retardar os sinais clínicos causados pela EAE em camundongos SJL. Resultados similares também foram obtidos por Brenner *et al*, (1997), e por Zhao *et al*, (1996) em ratos.

No entanto, nosso grupo acredita que as diferentes respostas aos tratamentos da EAE com inibidores de NOS mostram-se totalmente divergentes por diversos fatores: forma de indução da doença, especificidade e doses dos inibidores, espécie e sexo do animal, período de administração, entre outros.

Da mesma forma que há um aumento da expressão de iNOS, existe uma outra enzima que é induzível em situações patológicas, a COX-2 resultando na produção de grandes quantidades de prostaglandinas (PGs; Mitchell *et al*, 1995). Além disso, o NO

estimula a síntese de PG e também regula a expressão da proteína COX-2 (Hughes *et al*, 1999), o que está em concordância com nossos resultados.

Tanto a liberação de NO quanto a de PGs em grandes quantidades pelas isoformas induzíveis podem ser prejudiciais para a sobrevivência da célula, por isso associa-se patologicamente estes mediadores com diferentes doenças que acompanham processos inflamatórios como a esclerose múltipla (Genis *et al*, 1992; Salvemini *et al*, 1994, 1993 a,b; Mitchell *et al*, 1995; Cao *et al*, 1996; Salvemini & Masferrer, 1996; Schwab *et al*, 2000a,b; Pereira *et al*, 2000; Almer *et al*, 2001; Araki *et al*, 2001).

Interessantemente, apesar do modelo da EAE ter sido estabelecido em 1940, nós não temos visto na literatura estudos sobre o estado e a reatividade de leitos vasculares provenientes destes animais. Os únicos (e últimos) trabalhos nos quais foi estudada a resposta cardiovascular destes animais foram publicados pelo grupo de Marvin Rosenthale (Wyeth Laboratories, Inc.) entre 1966 e 1972 (quando ainda não se tinha conhecimento da ocorrência do NO em sistemas biológicos).

De acordo com Baum e Rosenthale (1966), animais com EAE tem valores de pressão arterial e frequência cardíaca menores aos dos animais controle. Os autores sugerem que isso se deve a uma menor liberação espontânea de norepinefrina dos terminais adrenérgicos. Contudo, e considerando o fenômeno de supersensibilidade aos agonistas adrenérgicos que ocorre após redução crônica do nível de estimulação destes receptores, a hipótese proposta pelos autores Baum e Rosenthale (1966) não justifica a resposta pressórica inalterada destes animais à norepinefrina exógena.

Quanto aos resultados sobre a diminuição da resposta ao agonista colinérgico metacolina, estes mesmos autores Baum e Rosenthale não explicam de forma satisfatória os achados, o qual é completamente justificável se considerarmos a falta de conhecimento, na época, sobre a participação do endotélio na mediação desta resposta.

Em função destes trabalhos verificamos as variáveis hemodinâmicas nos animais portadores ou não da EAE, como também a influência dos tratamentos nos animais com aminoguanidina (inibidor seletivo para iNOS) e etoricoxibe (inibidor de COX-2) através da técnica de telemetria. Observamos resultados sem diferenças significativas.

Tanto o tratamento com aminoguanidina como com etoricoxibe não resultou em qualquer efeito sobre estas variáveis hemodinâmicas, como pressão arterial média, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca.

Dentre nossos estudos de reatividade, o objetivo foi estudar a reatividade vascular *in vitro* de aorta e artéria pulmonar proveniente de animais com EAE e verificar a importância da produção endógena de NO (e/ou outras espécies relacionadas) sobre a resposta vascular destes animais portadores de EAE. Também, verificar a participação de prostanóides, explicando assim, parte das divergências sobre a participação do NO e/ou prostanóides encontrados na literatura.

Observamos que existe uma relação dose dependente na curva, mostrando a reatividade a agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos, como a fenilefrina e a noradrenalina, em anéis de aorta de ratos portadores e não portadores da EAE.

Também conforme descrito há mais de 30 anos, observamos que há alteração na regulação simpática na EAE, o qual é confirmado pelos nossos resultados de resposta contrátil diminuída de aorta e artéria pulmonar de ratos com EAE a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos noradrenalina e fenilefrina.

Em resultados anteriores foi mostrado que ratos com EAE apresentam aumento da expressão da NOS induzível (iNOS) e da produção sistêmica de NO (Teixeira *et al.*, 2002). A iNOS, é independente de  $Ca^{2+}$ , não é expressa sob condições normais, mas sim em situações patológicas (Moncada, *et al.*, 1991; Marín e Rodríguez-Martínez, 1997).

Acreditamos que a diferença nas respostas vasculares entre os animais Controles e os portadores da EAE exista em virtude principalmente do NO derivado de iNOS que parece mediar esta resposta contrátil deficiente nos animais portadores da EAE. Inferimos isto devido a importância do NO na manutenção e controle do tônus vascular (vasorelaxante) e as alterações na produção deste mediador nos ratos portadores da EAE.

As ações vasorelaxantes do agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol) não foram diferentes nos anéis de aorta provenientes dos diversos grupos experimentais, apesar da aparente maior potência do agonista nos tecidos provenientes dos animais com EAE, e a reversão pelo tratamento com aminoguanidina.

Interessantemente, a resposta vasodilatadora simpática mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos parece não estar substancialmente alterada; entretanto, experimentos adicionais deveriam ser realizados a fim de confirmar estas observações.

A adição de concentrações cumulativas de Acetilcolina (dependente de endotélio) em anéis de aorta e artéria pulmonar de ratas portadores ou não da EAE pré contraídos com fenilefrina induziu relaxamento dependente da concentração. Destacando-se uma significativa diferença na resposta vasodilatadora entre os animais portadores da EAE e os animais Controle, sendo que os animais EAE tem uma maior responsividade vasodilatadora no caso da aorta.

Contrariamente ao observado nos anéis de aorta, a ação vasorelaxante dependente de endotélio da ACh mostrou-se muito deprimida nos anéis de artéria pulmonar de ratos com EAE em relação aos animais controle. Neste tecido, a resposta máxima parece normalizar-se nos animais com EAE tratados com aminoguanidina ou etoricoxibe.

Em função que aorta e artéria pulmonar mostraram alterações em sentidos opostos que podem ser normalizados através da inibição de iNOS ou COX-2, podemos inferir que os efeitos do NO derivado de iNOS ou dos prostanóides sintetizados pela COX-2 são dependentes da função, fisiologia e/ou tipo particular de leito vascular.

## *6- CONCLUSÕES*

1. NO (derivado da iNOS) e/ou prostanóides (derivados da COX-2) podem estar envolvidos no aparecimento dos primeiros sinais clínicos (neurológicos) da EAE contribuindo com o grau de severidade dos mesmos. Porém, a participação destes mediadores parece não ser relevante no equilíbrio hemodinâmico geral.
2. Conforme descrito há mais de 30 anos, há alteração na regulação simpática nos animais portadores da EAE, o qual é confirmado pelos nossos resultados de resposta contrátil diminuída de aorta e artéria pulmonar de ratos com EAE a agonistas  $\alpha$  adrenergicos. O NO derivado de iNOS parece mediar esta resposta contrátil deficiente. A resposta vasodilatadora simpática mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos parece não estar substancialmente alterada, experimentos adicionais deveriam ser realizados a fim de confirmar estas observações.
3. Descrevemos ainda a ocorrência de resposta relaxante dependente de endotélio alterada na EAE; todavia, os diferentes leitos vasculares estudados mostraram alterações em sentidos opostos que podem ser normalizados através da inibição de iNOS ou COX-2, o qual demonstra que os efeitos do NO derivado de iNOS ou dos prostanóides sintetizados pela COX-2 são dependentes da função, fisiologia e/ou tipo particular de leito vascular.

***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ABOUD, R.; SHAFI, M.; DOCHERTY, J.R. - Investigation of the subtypes of  $\alpha_1$ -adrenoceptor mediating contraction of rat aorta, vas deferens and spleen. **Br J Pharmacol** 109:80–87, 1993.
- ABRAMSON, S.B.; ATTUR, M.; AMIN, A.R.; CLANCY, R. - NO and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. **Curr Rheumatol Rep** 3:535–41, 2001.
- ABU-SOUD, H.M.; FELDMAN, P.L.; CLARCK, P.; STUEHR, D.J. - Electron transfer in nitric-oxide synthases. Characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction. **J Biol Chem** 269:32318–26, 1994.
- AHLQUIST, R.F. - A study of the adrenotropic receptors. **Am J Physiol** 153:586– 600, 1948.
- ANDERSSON, P.B.; GOODKIN, D.E. - Outcome measures in multiple sclerosis clinical trials. **Baillieres Clin Neurol** 6:409-28, 1998.
- ANGUS, J.A.; COCKS, T.M.; SATOH, K. - The  $\alpha$ -adrenoceptors on endothelial cells. **Fed Proc** 45:2355–2359, 1986.
- ALEXANDER, S.P.H.; PETERS, J.A. - Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement, *10th ed*, **Trends in Pharmacological Sciences** Cambridge, UK, 1999.
- ALMER, G.; GUEGAN, C; TEISMANN, P.; NAINI, A.; ROSOKLIJA, G. HAYS, A.P. et. al. - Chen C, and Przedborski S. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol** 49:176–85, 2001.
- ARAKI, E.; FORSTER, C.; DUBINSKY, J.M.; ROSS, M.E.; LADECOLA, C. - Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity. **Stroke** 32:2370–75, 2001.
- BAGASRA, O.; MICHAELS, F.H.; ZHENG, Y.M.; BOBROSKI, L.E.; SPITSIN, S.V.; FU, Z.F. et al. Activation of inducible form of Inducible nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci** 92: 12041-5, 1995.
- BAGETTA, G.; CORASANITI, M.T.; PAOLETTI, A.M.; BERLIOCCHI, L.; NISTICO, R.; GIAMMARIOLI, A.M. et al. - HIV-1 gp120-induced apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2 (COX-2). **Biochem Biophys Res Commun** 244:819–24, 1998.

- BATES, J.N.; BAKER, M. T.; GUERRA, R. Jr.; HARRISON, D.G. - Nitric oxide geration from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem Pharmacol** 42: s157-s165, 1991.
- BAUER, P.M.; FULTON, D.; BOO, Y.C.; SORESCU, G.P.; KEMP, B.E. et al. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem** 278:14841–49, 2003.
- BAUER, J.; SMINIA, T.; WOUTERLOOD, F.G; DIJKSTRA, C.D. - Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neurosci Res** 38: 365-75, 1994.
- BAUM,T.; ROSENTHALE, M.E. - Cardiovascular and somatic reflexes in experimental allergic encephalomyelitis. **Circ Res** 18: 118-25, 1966.
- BAUM, T.; ROSENTHALE, M.E. - Centrally induced vasoconstriction in rats and the influence of allergic encephalomyelitis. **Am J Physiol** 212: 119-23, 1967.
- BAUM, T.; SHROPSHIRE, A.T.; ROSENTHALE, M.E. - Inhibition of efferent sympathetic activity in experimental allergic encephalomyelitis. **Proc Soc Exp Biol Med** 140: 1182-4, 1972.
- BEGONHA, R.; MOURA, D.; GUIMARÃES, S. - Vascular  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. **J Pharm Pharmacol** 47:510–513, 1995.
- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. - Nitric oxide, superoxide, and peroxinitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am J Physiol** 271: C1424-37, 1996.
- BEIERWALTES, W.H. - COX-2 products compensate for inhibition of NO regulation of renal perfusion. **Am J Physiol Renal Physiol** 283:F68–72, 2002.
- BIAN, K.; MURAD, F. - Nitric oxide (NO)-biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. **Front Biosci.** 8: d264–d278, 2003.
- BOISSEL, J.P.; OHLY, D.; BROS, M.; GODTEARMBRUST, U.; FORSTEAMANN, U.; FRANK, S. - The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. **J Invest Dermatol** 123:132–39, 2004.

- BOLZ, S.S.; VOGEL, L.; SOLLINGER, D.; DERWAND, R.; DE WIT, C. et al, - Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the rhoA/rho kinase pathway. **Circulation** 107:3081–87, 2003.
- BOO, Y.C.; HWANG, J.; SYKES, M; MICHELL, B.J; KEMP, B.E. et al, - Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. **Am J Physiol Heart Circ** 283:H1819–28, 2002.
- BREDET, D.S.; SNYDER, S.H. - Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 682-685, 1990.
- BRUNING, T.A.; HENDRIKS, M.G.; CHANG, P.C; KUYPERS, E.A.; VAN ZWIETEN, P.A. - In vivo characterization of vasodilating muscarinic-receptor subtypes in humans. **Circ Res** 74(5):912-9, 1994.
- BUSCONI, L.; MICHEL, T. - Endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem** 268 (12): 8410-3, 1993.
- BLUND, D.B.; BOND, R.A.; CLARKE, D.E.; EIKENBURG, D.C.; HIEBLE, J.P.; LANGER, S.Z. - Adrenoceptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification . **London: IUPHAR** ( pp. 58–74). 1998.
- CAZA, L.; GIARDINO, L.; POZZA, M.; MICERA, A.; ALOE, L. - Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1;94(7):3368-73, 1997.
- CAMPBELL, W.B.; GEBREMEDHIN, D.; PRATT, P.F.; HARDER, D.R. - Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ Res** 78: 415–423, 1996.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. - Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. **Brain Res** 733:263–72, 1996.

- CAVALLI, A.; LATTION, A.L.; HUMMLER, E.; NINNIGER, M.; PEDRAZZINI, T.; AUBERT, J.F. - Decreased blood pressure response in mice deficient of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:11589–11594, 1997.
- CHARCOT, J. - *Comptes rendus des séances et mémoires lus à la société de Biologie*. 1868a.
- CHARCOT, J. - Histologie de la sclérose en plaque. **Gazette des Hôpitaux**. 41:554–566. 1868b.
- CHARCOT, J. - Lectures on the diseases of the nervous system. **The New Sydenham Society** London, United Kingdom. 157–222, 1877.
- CHEN, L.Y.; SALAFRANCA, M.N.; MEHTA, J.L. - Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. **Am J Physiol** 273:H1854–59, 1997.
- CHO, H.J.; XIE, Q.W.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D. et al. - Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J Exp Med** 176:599–604, 1992.
- CHRUSCINSKI, A.; BREDE, M.E.; MEINEL, L.; LOHSE, M.J; KOBILKA, B.K.; HEIN, L. - Differential distribution of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -adrenergic receptors. **Mol Pharmacol** 60, 955–962, 2001.
- CLARK, J.M.; GLAGOV, S. - Transmural organization of the arterial media: the lamellar unit revisited. **Arteriosclerosis** 5:19-34, 1985.
- CLAUDIO, L.; RAINE, C.S.; BROSNAN, C.F. - Evidence of persistent blood-brain barrier abnormalities in chronic-progressive multiple sclerosis. **Acta neuropathol** 90: 228-238. 1995.
- COHEN, R.A.; SHEPHERD, J.T.; VANHOUTTE, P.M. - Neurogenic cholinergic prejunctional inhibition of sympathetic beta adrenergic relaxation in the canine coronary artery. **J Pharmacol Exp Ther** 229:417–421,1984.
- CONFAVREUX, C.; VUKUSIC, S.; MOREAU, T.; ADELEINE, P. - Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **N Engl J Med** 343:1430–1438, 2000.

- CONNOR, J.R.; MANNING, P.T.; SETLE, S.L; MOORE, W.M; JEROME, G.M.; WEBBER, R.K. et al. - Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible NO synthase. **Eur J Pharmacol** 273:15–24, 1995.
- CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; CHANG, K.; HASAN, K.S.; IDO, Y.; WANG, J.L. - Aminoguanidine, a novel inhibitor of NO formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes** 41:552–56, 1992.
- COWEN, C.L.; COHEN, R.A. - Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and independent responses. **Am J Physiol** 261: H830-H835, 1991.
- COWDEN, W.B.; CULLEN, F.A.; STAYKOVA, M.A.; WILLNBORG, D.O. - Nitric oxide is a potential downregulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE. **J Neuroimmunol** 88:1-8,1998.
- CROSS, A.H.; MISKO, T.P.; LIN, R.F.; HICKEY, W.F.; TROTTER, J.L.; TILTON, R.G. - Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. **J Clin Invest** 93: 2684-2690, 1994.
- DALE, H.H. - On some physiological actions of ergot. **J Physiol** 34:163–206, 1905.
- DAS, I.; KHAN, N.S.; PURI, B.K.; HIRSCH, S.R. - Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. **Neurosci Lett** 215: 209-211, 1996.
- DAVEL, L.; D'AGOSTINO, A.; ESPANOL, A.; JASNIS, M.A.; LAURIA DE CIDRE, L.; DE LUSTIGC, E.S. et al. - NO synthase-COX interactions are involved in tumor cell angiogenesis and migration. **J Biol Regul Homeostatic Agents** 16:181–89, 2002.
- DAVIS, E. - Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. **Lab Invest** 68: 89-99, 1993.
- D'AMELIO, F.E.; SMITH, M.E. - Sequence of tissue in the early stages of experimental allergic encephalomyelitis (EAE): immunohistochemical, light microscopie, and ultrastructural observations in the spinal cord. **Glia** 3:229-240, 1990.

- DEKKER, R.J.; VAN SOEST, S.; FONTIJN, R.D.; SALAMANCA, S.; DE GROOT P.G. et al, - Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). **Blood** 100:1689–98, 2002
- DE VRIES, H.E.; KUIPER, J.; DE BOER, A.G.; VAN BERKEL ,T.J.; BREIMER, D.D. - The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. **Pharmacol Rev.** 49(2): 143-155, 1997.
- DINGEMANS, KP; JANSEN, N.; BECKER, A.E, -Ultrastructure of the normal human aortic media. **Virchows Arch Pathol Anat** 392:199-216, 1981.
- DUDZINKSKI, D.M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. - The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthases. **Annu Ver Pharmacol Toxicol** 46: 235-76, 2006 (First published online as a Review in advance on September 7, 2005).
- DUSTING, G.J.; MACDONALD, P.S. - Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann Med** 27: 395-406, 1995.
- EBERS, G.C. et al. - A population-based study of multiple sclerosis in twins. **N Engl J Med** 315:1638–1642, 1986.
- EGAN, R.W.; PAXTON, J.; KUEHL, F.A.Jr. - Mechanism for irreversible selfdeactivation of PG synthetase. **J Biol Chem** 251:7329–35, 1976.
- ERWIN, P.A.; LIN, A.J.; GOLAN, D.E.; MICHEL, T. - Receptor-regulated dynamic Snitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. **J. Biol Chem** 280:19888–94, 2005.
- ETTER, E.F.; ETO, M;. WARDLE, R.L.; BRAUTIGAN, D.L.; MURPHY, R.A.- Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation. **J Biol Chem** 276:34681–85, 2001
- EWING, C.; BERNARD, C.C. - Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. **Immunol Cell Biol** 76:47-54. 1998.
- FILIPPI, M.; PATY, D.W.; KAPPOS, L.; BARKHOF, F.; COMPSTON, D.A.; THOMPSON, A.J. \_et al. - Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. **Neurology** 45:255–260, 1995.

- FLEMING, I.; FISSILTHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B.E.; BUSSE, R. - Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ Res** 88:E68–75, 2001.
- FLEMING, I.; BUSSE, R. - Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular Research** 43(3): 532-541, 1999.
- FRENCH RESEARCH GROUP ON MULTIPLE SCLEROSIS. - MS in 54 twinships: concordance rate is independent of zygosity. **Ann Neurol** 32:724–727, 1992.
- FREUND, J.; STERN, E.R. - Pisani TM. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. **J Immunol** 57: 179-194.
- FURCHGOTT, R.F. - Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis factor is inorganic nitrite and endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM (ed.). **Vasodilation** New York, Raven, 401-4, 1988.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288: 373-376, 1980.
- FURCHGOTT, R.F. - A research trail over half a century. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 35: 1–27, 1995.
- GALLO, O.; FABBRONI, V.; SARDI, I.; MAGNELLI, L.; BODDI, V.; FRANCHI, A. - Correlation between NO and COX-2 pathways in head and neck squamous cell carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun** 299:517–24, 2002.
- GENIS, P.; JETT, M.; BERNTON, E.W.; BOYLE, T.; GELBARD, H.A.; DZENKO, K.; et al. - Cytokines and arachidonic metabolites produced during human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophageastroglia interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease. **J Exp Med** 176:1703–18, 1992.
- GEWALTIG, M.T.; KODJA, G. - Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc Research** 55: 250-60, 2002.

- GOLD, D.P.; SCHRODER, K.; POWELL, H.C.; KELLY, C.J. - Nitric oxide and the immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis. **Eur J Immunol** 27: 2863-2869, 1997.
- GONCHAR, M.; SERGEEVA, M.; MEVKH, A.; VARFOLOMEYEV, S. - Kinetics of prostanoid synthesis by macrophages is regulated by arachidonic acid sources. **Eur J Biochem** 265, 779–787, 1999.
- GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. - Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature** 320:454–56, 1986.
- GUIMARÃES, S.; MOTA, A.; BEGONHA, R. - The effectiveness of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation and the contribution of  $\beta$ -adrenoceptors increase from the proximal to the distal part of the canine saphenous vein. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 347:596–600, 1993.
- GUIMARÃES, S.; MOURA, D. - Vascular Adrenoceptors: An Update. **Pharmacol Rev** 53:319-356, 2001.
- HAFLE, D.A.; KENT, S.C.; PIETRUSEWICZ, M.J.; KHOURY, S.J.; WEINER, H.L.; FUKAURA, H. - Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF-beta 1 secreting T cells in patients with multiple sclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, 835: 120-31, 1997.
- HAFLE, D.A. - Multiple Sclerosis. **J Clin Invest** 113:788-794 2004.
- HAIJAR, D.; LANDER, H.; PEARCE, F.; UPMACIS, R.; POMERANTZ, K.. - NO enhances prostaglandin-H synthase activity by a heme-independent mechanism: evidence implicating nitrosothiols. **J Am Chem Soc** 117:3340–46, 1995.
- HAN, C.; LI, J.; MINNEMAN, K.P. - Subtypes of  $\alpha$ 1-adrenoceptors in rat blood vessels. **Eur J Pharmacol** 190:97–104, 1990.
- HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. - Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics, 10th edn. **McGraw-Hill New York**.
- HAUSER, S.L. et al. - Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. **Ann Neurol** 19:578–587, 1986.
- HELTBERG, A.; HOLM, N. - Concordance in twins and recurrence in sibships in MS. **Lancet** 1:1068, 1982.

- HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. - Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys Res Commun** 157: 87- 94, 1988.
- HICKEY, K.A.; RUBANYI, G.; PAUL, R.J; HIGHSMITH, R.F. - Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am J Physiol** 248(5 Pt 1):C550-6, 1985.
- HOLMBERG, M.; FAGERHOLM, V.; SCHEININ, M. - Regional distribution of  $\alpha_2C$ -adrenoceptors in brain and spinal cord of control mice and transgenic mice overexpressing the  $\alpha_2C$ -subtype: an autoradiographic study with [3H]RX821002 and [3H]rauwolscine. **Neuroscience** 117, 875– 898, 2003.
- HUANG, P.L.; HUANG, Z.; MASHINO, H.; BLOCK, K.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BEVAN, J.A. et al. - Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature** 377: 239-42, 1995.
- HUGHES, F.J.; BUTTERY, L.D.; HUKKANEN, M.V.; O'DONNELL, A.; MACLOUF, J. POLAK, J.M. - Cytokine-induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 activity are regulated both by a NO-dependent and -independent mechanism in rat osteoblasts in vitro. **J Biol Chem** 274:1776–82, 1999.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. - Endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 9265-9, 1987.
- IGNARRO, L.J. - Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. **FASEB J.** 3: 31–36, 1989.
- JAMES, S.L. - Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol Rev** 59 (4): 533-47, 1995.
- JOHNSON, A.W.; LAND, J.M.; THOMPSON, E.J.; BOLANOS, J.P.; CLARK, J.B.; HEALES, S.J.R. - Letters to the editor. **J Neurol neurosurg Psychiatry** 58: 107-115, 1995.
- KABAT, E.A.; GUSMAN, M.; KNAUB, V. - Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. **Am J Med** 4:653-662, 1948.

- KABAT, E.A.; FREEDMAN, D.A.; MURRAY, J.P.; KNAUB, V. - A study of the crystalline albumin, gamma globulin and the total protein in the cerebrospinal fluid of one hundred cases of multiple sclerosis and other diseases. **Am J Med Sci** 219:55–64, 1950.
- KALLÉN, B.; NILSSON, O. - Effect of Bordetella pertussis vaccine on experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, 80: 95-99. 1986.
- KAWABE, T.; HARRIS, P.D.; ZAKARIA, E.L.; GARRISON, R.N. - Sepsis alters vessel contraction by adrenoceptor-induced NO and prostanoid. **J Surg Res** 110:352–59, 2003.
- KHOURY, S.J.; HANCOCK, W.W.; WEINER, H.L. - Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. **J Exp Med** 176:1355–1364, 1992.
- KHOURY, S.J. et al. - Longitudinal MRI imaging in multiple sclerosis: correlation between disability and lesion burden. **Neurology** 44:2120–2124, 1994.
- KINNUNEN, E.; KOSKENVUO, M.; KAPRIO, J.; AHO, K. - Multiple sclerosis in a nationwide series of twins. **Neurology** 37:1627–1629, 1987.
- KILLEN, J.A.; SWANBORG, R.H. - Autoimmune effector cells. Role of adjuvant and accessory cells in the *in vitro* induction of autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol** 129(2): 759-763, 1982.
- KNOWLES, R.G. et al. - Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 86: 5159-62, 1989.
- KOPROWSKI, H.; ZHENG, Y.M.; KATZ, E.H.; FRASER, N.; RORKE, L.; FU, Z.F.; et al. - In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 3024-3027, 1993.
- KOWALUK, E.A.; SETH, P.; FUNG, H.L. - Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther** 262: 916-922, 1992.
- KRÖNCKE, K.D. - Nitric oxide: Citotoxicity *versus* cytoprotection – How, why, when and where? **Nitric oxide: Biology and Chemistry** 1: 107-20, 1997.

- KUCHROO, V.K.; WEINER, H.L. - Antigen-driven regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Res Immunol** 149: 759-71; discussion 842-3, 855-60, 1998.
- LÄHDESMÄKI, J.; SALLINEN, J.; MACDONALD, E.; SIRVIO, J.; SCHEININ, M. -  $\alpha_2$ -Adrenergic drug effects on brain monoamines, locomotion, and body temperature are largely abolished in mice lacking the  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtype. **Neuropharmacology** 44, 882– 892, 2003a.
- LÄHDESMÄKI, J.; SCHEININ, M.; PERTOVAARA, A.; MANSIKKA, H. - The  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor subtype is not involved in inflammatory hyperalgesia or morphine-induced antinociception. **Eur J Pharmacol** 468, 183– 189, 2003b.
- LINCOLN, T.M.; KOMALAVILAS, P.; CORNWELL, T.L. - Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertension** 23: 1141-7, 1994.
- LOPEZ-ONGIL, S.; GONZALEZ-SANTIAGO, L.; GRIERA, M.; MOLPECERES, J.; RODRIGUEZ-PUYOL, M.; RODRIGUEZ-PUYOL, D. - Mechanisms involved in the relaxation of bovine aortic endothelial cells. **Life Sci** 70(6): 699-714, 2001.
- LUCCHINETTI, C.F.; BRUCK, W.; RODRIGUEZ, M.; LASSMANN, H. - Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. **Brain Pathol** 6:259–274, 1996.
- LUDWIN, S.K. - The pathobiology of the oligodendrocyte. **J Neuropathol Exp Neurol** 56:111-12, 1997.
- LUTTON, D.J.; WINSTON, R.; RODMAN, C.T. - Multiple Sclerosis: Etiological Mechanisms and Future Directions. **Exp Biol Med** 229: 12-20, 2004.
- MACEDO, W.H., et al. - Encefalomielite alérgica experimental. Modelo de doença inflamatória desmielinizante do SNC. **Rev Bras Neurol** 32(4):123-130, 1996.
- MACKAY, R.P.; MYRIANTHOPOULOS, N.C. - Multiple sclerosis in twins and their relatives. **Arch Neurol** 15:449–462, 1966.

- MACMICKING, J.D.; WILLENBORG, D.O.; WEIDEMANN, M.J.; ROCKETT, K.A.; COWDEN, W.B. - Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. **J Exp Med** 176: 303-307, 1992.
- MARÍN, J.R.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, A. - Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther** 75: 111-134, 1997.
- MARLETTA, M.A. - Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell** 78: 927-30, 1994.
- MARLETTA, M.A. et al. - Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry** 27: 8706-11, 1988.
- MEBAZA, A.; DE KEULENAER, G.W.; PAQUERON, X.; ANDRIES, L.J.; RATAJCZAK, P.; LANONE, S. et al. - Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, PGs and NO. **Circulation** 104:3137-44, 2001.
- MERRILL, J.E.; IGNARRO, L.J.; SHERMAN, M.P.; MELINEK, J.; LANE, T.E. - Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. **J Immunol** 151: 2132-2141, 1993.
- MINGHETTI, L.; LEVI, G. - Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. **Prog Neurobiol** 54:99-125, 1998.
- MILLER, S.D.; SHEVACH, E.M. - Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: editorial overview. **Res Immunol** 149: 753-759, 1998.
- MISKO, T.P.; MOORE, W.M.; KASTEN, T.P.; NICKOLS, G.A.; CORBETT, J.A.; TILTON, R.G. et al. - Selective inhibition of the inducible NO synthase by aminoguanidine. **Eur J Pharmacol** 233:119-25, 1993.
- MITCHELL, J.A.; LARKIN, S.; WILLIAMS, T.J. - COX-2: regulation and relevance in inflammation. **Biochem Pharmacol** 50:1535-42, 1995.

- MOLENAR, P.; MALTA, E.; JONES, C.R.; BUXTON, B.R.; SUMMERS, R.J. - Autoradiographic localization and function of b-adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. **Br J Pharmacol** 95:225–233, 1988.
- MOILANEN, E.; VAPPATALO, H. - Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann Med** 27: 359-67, 1995.
- MOLLACE, V.; COLASANTI, M.; MUSCOLI, C.; LAURO, G.M.; IANNONE, M.; ROTIROTI, D. et al. - The effect of nitric oxide on cytokine-induced release of PGE2 by human cultured astroglial cells. **Br J Pharmacol** 124:742–46, 1998.
- MOLLACE, V.; COLASANTI, M.; RODINO, P.; LAURO, G.M.; ROTIROTI, D.; NISTICO, G. - NMDA-dependent prostaglandin E2 release by human cultured astroglial cells is driven by NO. **Biochem Biophys Res Commun** 215:793–99, 1995.
- MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. - Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. **Pharmacol Rev** 57:217-52, 2005.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43: 109-42, 1991.
- MOORE, W.M.; WEBBER, R.K.; JEROME, G.M.; TJOENG, F.S.; MISKO, T.P.; CURRIE, M.G. - L-N6-(1-Iminoethyl) lysine: a selective inhibitor of inducible NO synthase. **J Med Chem** 37:3886–88, 1994.
- MORRIS, S.M.;BILLIAR, T.R. - New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am J Physiol** 266: E829-39, 1994.
- MUMFORD, C. et al. The UK study of MS in twins. **J Neurol** 239:62, 1992.
- MURAD, F. - Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J Clin Invest** 78:1-5, 1986.
- MYERS, P.R.; GUERRA, J.R.; HARRISSON, D.G. - Release of NO and EDRF from cultured endothelial cells. **Am J Physiol** 256: H1030-H1037, 1989.
- NAOKI, K.; KUDO, H.; SUZUKI, K.; TAKESHITA, K.; MIYAO, N.; ISHII, M. et al.- NOS and COX isoforms and abnormal microvessel responses to CO2 and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hyperoxia-injured lungs. **Eur Respir J** 20:43–51, 2002.

NAVIKAS, V.; LINK, H. - Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. **J Neurosci Res** 45:322-33, 1996.

NINDS - National Institute of Neurological Disorders and Stroke OFFICE OF COMMUNICATIONS AND PUBLIC LIAISON. - **Esclerosis Múltiple: Esperanza en la Investigación** 2003.

O'DONNELL, S.R.; WANSTALL, J.C. - *Beta-1* and *beta-2* adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary artery and aorta from young and aged rats. **J Pharmacol Exp Ther** 228:733-738, 1984.

OKUDA, Y.; NAKATSUJI, Y.; FUJIMURA, H.; ESUMI, H.; OGURA, T.; YANAGIHARA, T. et al. - Expression of the inducible isoform of nitric oxidem synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. **J Neuroimmunol** 62: 103-112, 1995.

OLSSON, T. -Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Neurology** 45: S11-S15, 1995.

PALMER, R. M. J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. - Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327: 524-6, 1987.

PATERSON, P.Y. - Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. **J Exp Med** 111: 119-133, 1960.

PENDER, M.P.; SEARS, T.A. - The pathophysiology of acute experimental allergic encephalomyelitis in the rabbit. **Brain** 107: 699-726, 1984.

PEREIRA, C.F.; BOVEN, L.A.; MIDDEL, J.; VERHOEF, J.; NOTTET, H.S. - Induction of cyclooxygenase-2 expression during HIV-1-infected monocyte-derived macrophage and human brain microvascular endothelial cell interactions. **J Leukoc Biol** 68: 423-28, 2000.

PHILIPP, M.; HEIN, L. - Adrenergic receptor Knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. **Pharmacology & Therapeutics** 101: 65-74, 2004.

PIERCE, K.L. - Premont RT & Lefkowitz RJ. - Seven-transmembrane receptors. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3, 639- 650, 2002.

PRINEAS, J.W.; WRIGTH, R.G. - Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. **Lab Invest** 38:409-421, 1978.

- PRINEAS, J. - Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. **Hum Pathol** 6:531–554, 1975.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. - An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 5193-7, 1990.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. - **Pharmacology** 5th edn. Elsevier, 2004.
- RAVI, K.; BRENNAN, L.A.; LEVIC, S.; ROSS, P.A.; BLACK, S.M. - S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 101:2619–24, 2004.
- RICHARD, V.; TANNER, F.C.; TSCHUDI, M.; LUSCHER, T.F. - Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin and clonidine in coronary arteries. **Am J Physiol** 259:H1433–H1439,1990.
- RIVERS, T.M., SPRUNT, D.H.; BERRY, G.P. - Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **J Exp Med** 58:39–53, 1933.
- RIVERO-VOLCHES, F.J.; DE FRUTOS, S.; SAURA, M.; RODRIGUEZ-PUYOL, D.; RODRIGUEZ-PUYOL, M. - Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cells: a mechanism dependent on PKG-I alpha activation by NO/cGMP. **Am J Physiol Cell Physiol** 285(4):C891-8, 2003.
- ROHRER, D.K.; KOBILKA, B.K. - Insights from in vivo modification of adrenergic receptor gene expression. **Ann Rev Pharmacol Toxicol** 38:351–373, 1998.
- ROHRER, D.K.; CHRUSCINSKI, A.; SCHAUBLE, E.H.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B.K. - Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both b1 and b2- adrenergic receptors. **J Biol Chem** 274:16701–16708, 1999.
- ROHRER, D.K. - Targeted disruption of adrenergic receptor genes. **Methods Mol Biol** 126, 259–277, 2000.
- RUULS, S.R.; VAN DER LINDEN, S.; SONTROP, K.; HUITINGA, I.; DIJKSTRA, C.D. - Aggravation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by administration of nitric oxide (NO) synthase inhibitors. **Clin Exp Immunol** 103: 467-474, 1996.

- SALVEMINI, D.; MASFERRER, J.L. - Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo and in vivo studies. **Methods Enzymol** 269:12–25, 1996.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. - Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:7240–44, 1993a.
- SALVEMINI, D.; PISTELLI, A.; ANGGARD, E. - Vascular anti-platelet action of 1,2- and 1,3-glycerol dinitrate. **Br J Pharmacol** 110:937–42, 1993b.
- SALVEMINI, D.; SEIBERT, K.; MASFERRER, J.L.; MISKO, T.P.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. - Endogenous nitric oxide markedly enhances prostaglandin production in a model of hydronephrosis. **J Clin Invest** 93:1940–47, 1994.
- SANCHEZ, S.; MARTIN, M.J.; ORTIZ, P.; MOTILVA, V.; HERRERIAS, J.M.; ALARCON DE LA LASTRA, C. - Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. **Inflamm Res** 51:385–92, 2002.
- SCHWAB, J.M.; BRECHTEL, K.; NGUYEN, T.D.; SCHLUESENER, H.J. - Persistent accumulation of COX-1-expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. **J Neuroimmunol** 111:122–30, 2000a.
- SCHWAB, J.M.; NGUYEN, T.D.; POSTLER, E.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H.J. - Selective accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells/macrophages in lesions of human focal cerebral ischemia. **Acta Neuropathol** 99: 609–14, 2000b.
- SENBANERJEE, S.; LIN, Z.; ATKINS, G.B.; GRIEF, D.M.; RAO, R.M.; KUMAR, A. et al. - KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. **J Exp Med** 199:1305–15, 2004.
- SHINMURA, K.; XUAN, Y.T.; TANG, X.L.; KODANI, E.; HAN, H.; ZHU, Y.; BOLLI, R. -Inducible NO synthase modulates COX-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. **Circ Res** 90:602–608, 2002.
- SLOMIANY, B.L.; SLOMIANY, A. - Platelet-activating factor modulates gastric mucosal inflammatory responses to Helicobacter pylori lipopolysaccharide. **Biochem Biophys Res Commun** 306:261–66, 2003.

- SHEN, Y.T.; ZHANG, H.; VATNER, S.F. - Peripheral vascular effects of *beta*-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. **J Pharmacol Exp Ther** 268: 466–473, 1994.
- SHEN, Y.T.; CERVONI, P.; CLAUS, T.; VATNER, S.F. - Differences in  $\beta$ 3-adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs. **J Pharmacol Exp Ther** 278:1435–1443, 1996.
- SKAPER, S.D.; FACCI, L.; LEON, A. - Inflammatory mediator stimulation of astrocytes and meningeal fibroblasts induces neuronal degeneration via the nitridergic pathway. **J Neurochem** 64(1):266-76, 1995.
- SMITH, K.J.; HALL, S.M. - Factors directly affecting impulse transmission in inflammatory demyelinating disease: recent advances in our understanding. **Curr Opin Neurol** 14(3):289-98, 2001.
- STHEUHR, D.J. - Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 37:339–59, 1997.
- STHEBENS, W.E. - Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. **Acta Anat** 157:261-74, 1996.
- SURKS, H.K.; MOCHIZUKI, N.; KASSAI, Y.; GEORGESCU, S.P.; TANG, K.M.; ITO, M. et al. - Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$ . **Science** 286:1583–87, 1999.
- SZABÓ, C. - Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. **New Horizons** 3(1): 2-32, 1995.
- TEIXEIRA, S.A.; CASTRO, G.M.; PAPES, F.; MARTINS, M.L.; ROGÉRIO, F.; LANGONE, F. et al. - Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Brain Res*, 99: 17-25, 2002.
- TEIXEIRA, S.A.; VARRIANO, A.A.; DIAS, A.A.; MARTINS PORTO, R.; MUSCARÁ, M.N. - Nitric oxide synthase activity and endogenous inhibitors in rats recovered from allergic encephalomyelitis **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100(Suppl.I): 25-27, 2005.

- TAKEUCHI, K.; KAGAWA, S.; MIMAKI, H.; AOI, M.; KAWAUCHI, S. - COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. **Dig Dis Sci** 47:2116–24, 2002.
- TRAPP, B.D. *et al.* - Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. **N Engl J Med** 338:278–285, 1998.
- TRAUGOTT, U., REINHERZ, E.L.; RAINE, C.S. - Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. **Science** 219:308–310, 1983.
- TSAI, A.L.; WEI, C.; KULMACZ, R.J. - Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. **Arch Biochem Biophys** 313:367–72, 1994.
- UPMACIS, R.K.; DEEB, R.S.; HAJJAR, D.P. - Regulation of PGH<sub>2</sub> synthase activity by nitrogen oxides. **Biochemistry** 38:12505–13, 1999.
- UTZ, U.; BIDDISON, W.E.; MCFARLAND, H.F.; MCFARLIN, D.E.; FLERLAGE, M.; MARTIN, R. - Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. **Nature** 364:243–247, 1993.
- VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J. *et al.* - Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Pharmacology** 91: 2046-2050, 1994.
- VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.J.; PANAYOTOU, G.; WATERFIELD, M.D.; - Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. **Trends Biochem Sci** 22:267–72, 1997
- VANHOUTTE, P.M.; MILLER, V.M. - Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. **Am J Med** 87:1S–5S, 1989.
- VAYSSETTES-COURCHAY, C.; BOUYSSSET, F.; VERBEUREN, T.J. - Involvement of COX and NOS induction in the sympatho-activation during sepsis. **Auton Neurosci** 98:33–36, 2002.
- WANG, Y.; KODANI, E.; WANG, J.; ZHANG, S.X.; TAKANO, H.; TANG, X.L. *et al.* 2004. - Cardioprotection during the final stage of the late phase of ischemic preconditioning is mediated by neuronal NO synthase in concert with cyclooxygenase-2. **Circ Res** 95(1):84–91, 2004.

- WEINSHENKER, B.C. - Epidemiology of multiple sclerosis. **Neurol Clin** 14(2):291-308, 1996.
- WILLENBORG, D.O.; STAYKOVA, M.A.; COWDEN, W.B. - Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. **J Neuroimmunol** 100: 21-35.1999.
- WILLIAMS, A.; ELDRIDGE, R.; MCFARLAND, H.; HOUFF, S.; KREBS, H. MCFARLIN, D. - Multiple sclerosis in twins. **Neurology** 30:1139–1147, 1980.
- WOLINSKY, H.; GLAGOV, S. - A lamellar unit of aortic medial structure function in mammals. **Circulation Res** 20:99-111, 1967.
- WUCHERPFENNIG, K.W.; *et al.* - T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. **J Exp Med** 175:993–1002, 1992.
- WUCHERPFENNIG, K.W.; *et al.* - Gamma delta Tcell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. **Proc Natl Acad Sci USA** 89:4588–4592, 1992.
- XIAO, B.G.; ZHANG, G.X.; MA, C.G.; LINK, H. - The cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis promotes neuronal and oligodendrocyte damage by delayed production of nitric oxide in vitro. **J Neurol Sci** 142: 114-120, 1996.
- ZHAO, W.; TILTON, R.G.; CORBETT, JA.; MCDANIEL, M.L.; MISKO, TP.; WILLIAMSON, J.R. *et al.* - Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. **J Neuroimmunol** 64: 123-133, 1996
- ZIELASEK, J.; JUNG, S.; GOLD, R.; LIEW, FY.; TOYKA, KV.; HARTUNG, HP. - Administration of nitric oxide synthase inhibitors in experimental autoimmune neuritis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol** 58: 81-88, 1995.