

ALESSANDRO DOS SANTOS FARIAS

**EVOLUÇÃO CLÍNICA DA
ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL AUTO-IMUNE
EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE
MODIFICADOS (KNOCKOUT) PARA A ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE INDUZIDA**

**CAMPINAS
2004**

C 1
22
CPA, 16/1
FCM

ALESSANDRO DOS SANTOS FARIAS

**EVOLUÇÃO CLÍNICA DA
ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL AUTO-IMUNE EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS
(KNOCKOUT) PARA A ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
INDUZIDA**

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. LEONILDA M. B. SANTOS

**CAMPINAS
2004**

DADE BC
CHAMADA
NICAMP F225e
BO BCI 82845
OC. 16-148-09
CO 11.00
A 10108109
D. TIT. 448012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

✓ F225e

Farias, Alessandro dos Santos

Evolução clínica da encefalomielite experimental auto-imune em camundongos geneticamente modificados (knockout) para a óxido nítrico sintase induzida / Alessandro dos Santos Farias. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Macrófagos. 2. Resposta imune. 3. Esclerose múltipla. I. Leonilda Maria Barbosa dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Mestrado

Orientadora: *Profa. Dra. Leonilda M. Barbosa dos Santos.*

Membros:

1. Prof. Dra. Luciana de Deus Vieira de Moraes
2. Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa
3. Prof. Dr. Tomomasa Yano (*Suplente*)
4. Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (*Suplente*)

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

Trabalho realizado com apoio recebido da

FAPESP

Epígrafe

Grandes Pessoas Falam sobre Idéias.

Pessoas Comuns Falam Sobre Coisas.

Pessoas Mediócras Falam Sobre Outras Pessoas...

Agradecimentos

À minha mãe Naide dos Santos, pois se essa tese é parte de uma realização profissional para mim, faz parte também da realização do sonho de uma vida, que infelizmente não está mais aqui para desfrutá-lo. E também por toda a sua dedicação e apoio incondicional; a quem realmente eu dedico essa tese e todas as minhas conquistas.

À minha Vó Maria do Carmo dos Santos, pelo apoio e preocupação comigo, assim como uma mãe, o que realmente sempre foi e continua sendo.

Aos meus tios Luis Carlos, Neide, Jorge e Ilka, por todo o apoio e incentivo durante toda a vida, e especialmente nesse período.

Aos meus amigos Java, Fabi e Bruno, por todo apoio, incentivo e por serem também parte da minha família, conquistada em Campinas.

Aos inúmeros amigos, que fiz durante esse tempo que estou em Campinas, que infelizmente não tenho condições de citar um por um, pois precisaria de muitas páginas.

À Claudia Bottcher (CAU), por ter estado ao meu lado nestes últimos anos, dando o seu apoio e incentivo a todo tempo, além da felicidade com que recebia cada realização minha. Agradeço também à sua família por ter me recebido de braços abertos e com muito carinho.

À minha Orientadora Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, por tudo e mais um pouco, pela total liberdade de trabalho que me proporcionou nesse tempo todo em que estou em seu laboratório, sempre incentivando e estimulando o desenvolvimento de uma formação ampla e correta. Além de ser uma grande profissional, também uma grande pessoa, foi uma mãe todo esse tempo, e em muitas vezes mais preocupada com as minhas adversidades do que eu mesmo. Acho realmente que, além de um grande prazer, é uma grande sorte poder trabalhar e aprender com uma pessoa da qualidade da Leo.

*Ao professor **Francesco Langone**, que co-orientou essa tese, colocando seu laboratório à disposição, e também aos seus alunos, principalmente a Cristiane, que me receberam de braços abertos, estando sempre dispostos a me ajudar.*

*Ao professor **Fábio Costa**, por toda a ajuda e incentivo neste período em que nos conhecemos.*

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Neuroimunologia, Elaine, Dannie, Carlos Otávio, Juliana, Patrícia e José Roberto por todo apoio recebido, e especialmente à Gislaine, por ter me ajudado muito e demonstrando sempre boa vontade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente à Lucia, Lourdes, José Raimundo, Dirce e Marcos, por serem sempre prestativos.

Dizem que não se deve esperar agradecimentos quando ajudamos alguém, e que devemos ficar felizes apenas por termos a consciência de ter ajudado. Então, a todos que têm consciência que me ajudaram, de qualquer forma, meus agradecimentos.

ABREVIATURAS

AICD	Morte celular induzida pelo antígeno
BCR	Receptor de célula B
BHE	Barreira hematoencefálica
CFA	Adjuvante completo de Freund
EAE	Encefalomielite Experimental Auto-imune
EM	Esclerose Múltipla
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
MBP	Proteína básica de Mielina
KO	<i>knockout</i>
MOG	Glicoproteína de Mielina do Oligodendrócito
NK	“Natural killer”
PBS	Tampão Salino Fosfato
PE	Ficoeritrina
PLP	Proteolipoproteína
SCM	“Score” Clínico Médio
SFB	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
TCR	Receptor de célula T para o antígeno

ÍNDICE

I.	Resumo	11
II.	Abstract	14
III	Introdução.	17
IV	Objetivos.	33
V	Materiais e Métodos	35
VI	Resultados	42
VII	Discussão	51
VIII	Conclusões.	57
IX	Referências Bibliográficas.	59
X	Anexo I : Nitric Oxide and TNF α effects on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis demyelination	69

Resumo

RESUMO

A Esclerose múltipla (EM) é doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que mais acomete adultos jovens. Baseado principalmente nas similaridades clínicas e histopatológicas a Encefalomyelite experimental auto-imune (EAE) tem sido usada extensivamente como modelo de estudo da EM. A EAE é uma doença auto-imune, que pode ser induzida em animais suscetíveis, pela imunização com mielina ou alguns componentes da mielina ou ainda por transferência adotiva de linfócitos T CD4 do tipo Th1. Os linfócitos Th1 produzem preferencialmente citocinas pró inflamatórias como $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ e linfotóxina ($TNF\beta$). Assim, a EAE é caracterizada histologicamente pela presença de células mononucleares no SNC, dano na bainha de mielina e dos oligodendrócitos.

Embora as principais células envolvidas EAE sejam linfócitos T, células mononucleares como os macrófagos que migram dos órgãos linfóides periféricos para o SNC, assim como as células da glia, participam ativamente da reação inflamatória, que resulta no dano à bainha de mielina. Vários relatos sugerem a participação dos metabólitos do oxigênio, principalmente o óxido nítrico nos processos desmielinizantes. Há evidências mostrando o aumento na produção do NO via óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nas lesões desmielinizantes. No entanto, a participação do NO gera polêmica; por um lado as evidências apontam

para o efeito neuroprotetor, enquanto outras mostram a atuação desse mediador na patogênese da EAE.

O presente estudo, visa investigar o papel do NO, produzido via iNOS, na regulação da EAE, para isso utilizamos camundongos deficientes de iNOS ("knockout") e comparamos a evolução clínica e a presença de mediadores inflamatórios, com os animais correspondentes não modificados geneticamente. O animal "knockout" (iNOS^{-/-}) apresentou significativa diminuição na evolução clínica, acompanhada da diminuição de células positivas para TNF α na lesão inflamatória, na fase aguda da doença. Trata-se de observação relevante pois o TNF α é citocina com comprovado efeito mielinotóxico. Esses resultados demonstram a fundamental contribuição do NO em associação com TNF α , no controle da EAE na fase aguda, também confirmam a importante participação dos macrófagos na patogênese EAE, nessa fase da doença, ainda que a EAE seja desencadeada por linfócitos TCD4.

Abstract

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is the most common human demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Based on the fact that it shares similarities in relation to course of the disease and histology, Experimental auto-immune encephalomyelitis (EAE) has been used extensively as an animal model for MS. EAE is a Th1 cell-mediated autoimmune disease induced by immunization with myelin components or by adoptive transfer of autoreactive T cells. This leads to a characteristic relapsing and remitting paralytic disease in mice model of EAE. The Th1 cells, characteristically produce IL2, IFN γ , TNF α and lymphotoxin (TNF β), which participate in the inflammatory reactions. Histological examination of the CNS generally reveals the presence of both a rich inflammatory mononuclear cell infiltrate and demyelination resulting from bystander activation of resident microglia and recruited, infiltrating monocytes.

Antigen-presenting cells generate the reactive oxygen and nitrogen species that may damage different cell types. Despite knowledge about the induction and regulation of NO production, the role of NO in tissue in demyelination is highly controversial. While many investigators have concluded that NO is involved in the pathogenesis of EAE, others have reported quite opposing protective effects.

The present study was conducted to investigate the specific role of NO induced by iNOS in the regulation of EAE in iNOS knockout C57BL/6 and wild-type mice.

A less severe form of the disease than did the wild type control mice was observed in the iNOS $-/-$ mice. Although the levels of TNF α diminished in the periphery for both groups, an increase in the number of TNF α positive cells was detected in the central nervous system during the acute phase of EAE induced in the WT mice, whereas no production of TNF α was detected in the KO mice. These findings suggest that NO and TNF α contribute to the pathogenesis during acute EAE.

Introdução

INTRODUÇÃO

O desafio da convivência com os microrganismos certamente representou uma pressão evolutiva importante na modelagem do sistema imunológico na defesa contra organismos potencialmente patogênicos para os organismos superiores. No entanto, essa não é a única função do sistema imunológico. A vigilância contra o aparecimento das células tumorais, a remoção de células senescentes, a participação nas interações neuroendócrinas são funções exercidas, com igual importância, pelo sistema imunológico.

Não perdendo de vista a complexidade das interações existentes no sistema imune, didaticamente podemos dividir os mecanismos de resposta imunológica em dois grupos principais: os mecanismos da resposta imune inata e adquirida.

Entende-se por imunidade adquirida, a atuação de um conjunto de elementos que permite uma resposta específica, devido principalmente à diversidade das populações de linfócitos T e B, caracterizadas por seus receptores TCR e BCR respectivamente, que são moléculas com regiões variáveis para o reconhecimento do antígeno, geradas pela recombinação gênica.

Na resposta imune inata, o conjunto de elementos tem condições de responder aos antígenos de forma não específica, não envolvendo os receptores com regiões variáveis. Dessa resposta participam principalmente as proteínas do

sistema complemento, as células natural *killer* (NK), os granulócitos e as células do sistema fagocítico-monocitário.

O conhecimento atual sobre o reconhecimento do antígeno pelas células T é o resultado de décadas de estudos, que tiveram início com o entendimento das características físicoquímicas dos antígenos que estimulam a resposta imune adquirida. A especificidade dos linfócitos T para o antígeno (peptídeo) apresenta várias características de reconhecimento, que difere fundamentalmente do reconhecimento do antígeno pelas moléculas de anticorpos (JANEWAY *et al.*, 2002).

Enquanto as células B reconhecem como antígeno, os peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e pequenos produtos químicos, os linfócitos T reconhecem apenas os peptídeos dispostos numa sequência primária de amino ácidos. Um aspecto fundamental do reconhecimento do antígeno pelas células T CD4 ou *helper* ou pelas T CD8 ou células citotóxicas é que os linfócitos T reconhecem o peptídeo apenas quando o mesmo está unido a uma forma alélica das moléculas do complexo MHC do próprio indivíduo, expressa na superfície das células apresentadoras do antígeno (MCDEVITT, 2000).

As células apresentadoras do antígeno (macrófagos, células dendríticas, ou linfócitos B) convertem antígenos protéicos em peptídeo acoplando-os às moléculas MHC, mecanismo conhecido por processamento do antígeno. O complexo formado pelas moléculas do MHC e peptídeo migram para a superfície celular onde podem ser reconhecidos pelos linfócitos T CD4 ou CD8, dependendo do alelo de MHC ao qual o peptídeo está acoplado. Essa interação é conhecida

como o primeiro sinal indispensável para a ativação dos linfócitos T. O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas células apresentadoras do antígeno. As moléculas mais estudadas na atualidade são CD28 e CD152 (CTLA4) expressas nos linfócitos, que se ligam às moléculas CD80 e CD86 presentes nas células apresentadoras do antígeno (LENSCHOW *et. al.*, 1996). A inibição da expressão dessas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T, mecanismo conhecido como anergia (SCHWARTZ *et. al.*, 2003). A primeira evidência demonstrando que a ligação do TCR com o peptídeo no contexto da molécula de MHC não era suficiente para a ativação dos linfócitos T foi feita por Jenkins and Schwartz no final da década de 80 (MUELLER, JENKINS e SCHWARTZ, 1989). Esses autores demonstraram que os clones de linfócitos T que recebiam somente o sinal do TCR não se tornavam ativados, mas entravam num estado de não resposta para o antígeno, que podia ser revertida pela adição exógena de IL2 *in vitro*. Hoje, há concordância na literatura, que o sinal dado pela molécula CD28, influencia positivamente a ativação linfocitária, enquanto o sinal dado pela molécula co-estimulatória CTLA4 (CD152) é negativo na ativação de linfócitos (SCHWARTZ *et. al.*, 2003).

A mais dramática evidência da função inibidora da molécula CTLA4 veio de experimentos realizados em camundongos. Camundongos deficientes geneticamente para a molécula CTLA4 desenvolveram uma desordem linfoproliferativa fatal (CHAMBERS *et. al.*, 1996). Essas evidências mostraram que a molécula CTLA4 regula negativamente, de forma crucial a ativação linfocitária.

Essa molécula é expressa em baixos níveis nas células não ativadas, aumentando durante a ativação celular; embora haja controvérsias, acredita-se que um dos mecanismos pelos quais a molécula CTLA4 regule negativamente a ativação linfocitária é através da estimulação da produção de citocinas com efeito anti-inflamatório como IL 10 e TGF β (GOMES *et al.*, 2000).

Na sequência de eventos que vão culminar com a ativação linfocitária, a participação dos produtos celulares solúveis é fundamental. As células T CD4 secretam certos tipos de citocinas que as diferenciam em sub-populações celulares do tipo Th1 e Th2. Os linfócitos T CD4, do tipo Th1, secretam citocinas como IL-2, IFN γ e TNF α que medeiam as reações de hipersensibilidade tardia (DTH) e induzem a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas. As células do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos IgG1 e IgE. (MOSSMAN *et al.*, 1986) As células Th0 produzem um padrão combinado de citocinas Th1 e Th2, enquanto o subtipo designado Th3, identificado na mucosa intestinal, produz quantidades consideráveis de fator transformador de proliferação (TGF β) (CHEN *et al.*, 1996).

Vários fatores, incluindo a dose do antígeno, tipo de células apresentadoras de antígeno, a presença de moléculas co-estimuladoras e as citocinas presentes no microambiente, influenciam a diferenciação do subtipo Th1 em subtipo Th2. Há evidências de que as citocinas IL-12 e IFN γ , presentes no microambiente onde a resposta imune está acontecendo, induzem a diferenciação do tipo Th1, enquanto que a IL-4 é essencial para a diferenciação das células do tipo Th2 (ROMAGNANI, 2000)

Colocados de uma forma simplista, os mecanismos citados garantem que o sistema imunológico atue, de forma eficiente, contra as diferentes agressões causadas pelos microorganismos ou qualquer outro tipo de antígeno. No entanto, devido à grande diversidade do repertório imunológico, esses componentes podem vir a agredir os componentes do próprio organismo. Ehrlich, no início do século XX, introduz o termo *autoimunidade* ao descrever que os potentes mecanismos efetores utilizados na defesa do hospedeiro podiam, se voltados contra ele, levar a grave lesão tecidual, o que denominou inicialmente como *horror autotoxicus*. Essas agressões, no entanto, são verificadas apenas em condições patológicas, graças aos mecanismos de tolerância imunológica.

Tolerância imunológica pode ser entendida como a não resposta imune específica para um determinado tipo de antígeno. A tolerância aos auto-antígenos é ativamente conseguida e os linfócitos, tanto B como T, potencialmente auto-reativos são, de certa forma, inativados. Normalmente esse processo de inativação das células potencialmente auto-reativas ocorre durante a maturação celular, que acontece no timo, para as células T e na medula óssea para os linfócitos B. Os antígenos encontrados nesses órgãos (linfóides primários) são normalmente antígenos próprios. Assim, os linfócitos, nessa etapa de maturação, encontrarão apenas os antígenos próprios, associados às moléculas de MHC, tornando-se tolerantes, num processo conhecido como tolerância central (SAKAGUCHI, 2004). A tolerância central, no entanto, não garante que as células que deixam os órgãos linfóides primários e vão popular os órgãos linfóides secundários, não

atuem como células auto-reativas (MORAHAN, 1992). Assim, a autoimunidade pode ser entendida como um processo fisiológico normal, onde o organismo convive com as células e os anticorpos potencialmente auto-reativos, sem necessariamente desenvolver doenças auto-imunes. Alguns autores, inclusive, acreditam que a presença de auto anticorpos e células que reconhecem o próprio são indispensáveis para a homeostase do organismo (SCHWARTZ & COHEN, 2000).

As doenças auto-imunes surgem quando há anormalidade nos mecanismos responsáveis pela manutenção da tolerância periférica. Como a tolerância imunológica é uma não resposta imune específica, os mecanismos de tolerância são obtidos quando há favorecimento para a não ativação tanto dos linfócitos B, como os linfócitos T específicos para o auto-antígeno. A deleção de células auto-reativas, a indução de anergia e o desvio da resposta imune causado pela polarização da produção de determinadas citocinas são exemplos de mecanismos que favorecem a não resposta aos auto-antígenos. A *deleção* de linfócitos potencialmente auto-reativos, pode acontecer normalmente na periferia, em condições especiais como excesso de antígeno e é acompanhado de aumento de mediadores de morte celular como a molécula Fas, processo conhecido com morte celular induzida pela antígeno (AICD) (LENARDO, 1991; LENARDO *et al.*, 1999). A anergia de linfócitos auto-reativos, como já foi mencionado, é conseguida pela inibição da expressão das moléculas costimulatórias e o desvio da produção de citocinas pro-inflamatórias para citocinas com efeito anti-inflamatório, que parece

ser originado na dependência da expressão das moléculas co-estimulatórias (SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Apesar dos mecanismos citados, alguns indivíduos provavelmente devido à bagagem genética e aos fatores ambientais, como as infecções, desenvolvem doenças auto-imunes.

Em animais de experimentação, doença auto-imune pode ser induzida artificialmente pela injeção de tecidos próprios misturados com fortes adjuvantes, demonstrando que o dano tissular, pode ser provocado pela resposta imune adaptativa específica aos auto-antígenos. Nos seres humanos, a resposta danosa contra os próprios tecidos, surge espontaneamente; os eventos que iniciam esse tipo de resposta ainda não estão totalmente elucidados. Em algumas situações patológicas como a febre reumática e a doença de Chagas o aparecimento de doença auto-imune está associado com infecções por bactérias e parasitas, respectivamente (LEON *et al.*, 2003 e GUILHERME *et al.*, 2002). Animais transgênicos, que apenas expressam linfócitos T com TCR específicos para o auto-antígeno proteína básica de mielina (MBP), normalmente não desenvolvem espontaneamente a Encefalomielite experimental auto-imune, acontecendo apenas após uma infecção. Essas observações reforçam a participação dos agentes infecciosos na gênese das doenças auto-imunes, o que pode ser explicado pelo possível aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias tanto nas células apresentadoras de antígenos, como nos linfócitos auto-reativos, levando à quebra da tolerância imunológica.

Além do efeito direto nas membranas de superfície, os agentes infecciosos podem dar origem às doenças auto-imunes através do mimetismo molecular. O mimetismo molecular é explicado pela presença de estruturas moleculares similares entre microrganismos e os componentes próprios do hospedeiro, o que leva a uma reação imunológica cruzada, com conseqüente dano tecidual. Mesmo na ausência de estruturas moleculares em comum com o hospedeiro, as infecções (virais, bacterianas etc) podem desencadear uma resposta inflamatória com dano tissular, e conseqüente exposição dos componentes próprios, em um ambiente ideal para a ativação da resposta imunológica. A infecção com o *Theiler's* vírus por exemplo, em animais experimentais causa uma encefalomielite crônica e grave desmielinização (OLESZAK *et al.*, 2004).

Por outro lado, a literatura mostra que agentes infecciosos ou estruturas componentes dos mesmos podem reduzir a gravidade de algumas doenças auto-imunes. A possibilidade de bactérias pertencentes à flora comensal contribuir para o estabelecimento e /ou a manutenção da tolerância periférica tem sido sugerido em achados experimentais de animais criados em situação livre de patógenos. Foi observado que ratos Fisher são relativamente resistentes à indução de artrite experimental, após imunização com micobactérias ou parede de estreptococos, e a colonização da mucosa intestinal com *E. coli* ou com bactérias da flora normal também induz resistência nessa doença experimental (KOHASHI *et al.*, 1986).

No modelo de diabetes, foi demonstrada a contribuição positiva das bactérias comensais, no sentido de induzir resistência ao desenvolvimento da

doença. Camundongos criados em condições livres de patógenos tiveram a incidência da doença aumentada cerca de 100%, em relação aos animais criados em ambiente convencional. Reforçando essas observações, há os relatos de que imunização com adjuvante completo de Freund também reduz a gravidade da diabetes experimental (SHEHADEH *et. al.*, 1994) e existe a possibilidade de componentes de agentes infecciosos, serem utilizados na terapia da diabetes em humanos e na Esclerose Múltipla (ROOK *et al.*, 2000).

A Esclerose múltipla (E.M). é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC), e caracteriza-se por apresentar infiltração de células imunes, destruição da bainha de mielina com perda eventual de oligodendrócitos (WAKSMAN, 1985 e STEINMAN, 1996). As manifestações clínicas são muito variáveis, não existindo nenhum sintoma ou sinal específico da doença. Sua ocorrência é em adultos jovens, entre 20 e 45 anos, manifestando-se raramente antes dos 15 ou após os 50 anos. A evolução é imprevisível e polimórfica, conhecendo-se formas evoluindo em surtos (com ou sem remissão) ou cronicamente progressivas (NAVIKAS & LINK, 1996). A etiologia dessa condição é desconhecida, mas admite-se que se trata de uma doença de natureza auto-imune, onde o fator ambiental, provavelmente de origem infecciosa e a susceptibilidade genética parecem ter um papel essencial na sua determinação.

Muito de conhecimento adquirido sobre a resposta imunológica na E.M., é devido ao estudo desenvolvido no modelo experimental a Encefalomielite Experimental Auto-imune (EAE). A EAE começou a ser estudada após a

descoberta da vacina contra a raiva, por Pasteur, em 1875. Esse tratamento anti-rábico consistia em injetar, na pessoa mordida, a medula triturada do animal infectado. No entanto, devido a resposta imune cruzada com estruturas do encéfalo do animal hospedeiro, muitos indivíduos apresentavam uma encefalite pós vacinal, muitas vezes fatal. Estudos posteriores mostraram que a injeção de um extrato de mielina do sistema nervoso central provocava encefalomielite também em primatas (WEKERLE 1993). A EAE passou então a ser considerada modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunopatológicos nas doenças inflamatórias desmielinizantes de natureza auto-imune.

A EAE é mediada por linfócitos T CD4, manifesta-se clinicamente por deficiência neurológica, histologicamente caracteriza-se por infiltração perivascular de células mononucleares no encéfalo e imunologicamente pela presença de resposta celular e humoral aos componentes da mielina (HALLAL *et al.*, 2003).

A doença pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis, pela imunização com mielina e seus componentes como a proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) e peptídeos encefalitogênicos derivados desses antígenos. A doença também pode ser transferida para animais *naïves* por clones de linfócitos sensibilizados a estes componentes. (BEN-NUN & COHEN, 1982; HOLOSHITZ *et al.*, 1983).

Dependendo do animal utilizado, a doença se apresenta de forma aguda monofásica ou crônica com surtos e remissões. Os ratos Lewis desenvolvem a forma aguda e monofásica da doença. A EAE aguda, monofásica é caracterizada pelas lesões inflamatórias e sinais clínicos reversíveis. Ela reproduz clinicamente, em ratos, um episódio de exacerbação da Esclerose Múltipla. Observa-se uma instalação ascendente típica de sinais clínicos: hipotonia distal da cauda evoluindo rapidamente para uma paraplegia completa com hipoestesia das patas dianteiras e incontinência. Após 2 a 3 dias, os sinais clínicos desaparecem progressivamente. O quadro clínico completo evolui em 20 dias. Na transferência passiva de linfócitos auto-reativos, o quadro clínico evolui em uma semana (LIDER *et al.*, 1989). Os camundongos são mais resistentes ao desenvolvimento da doença e apresentam a forma surto e remissões da doença.

A EAE ativamente induzida consiste de uma fase indutora e de uma fase efetora. A fase indutora envolve a apresentação de epítomos de mielina a linfócitos T CD4⁺ nos órgãos linfóides e a subsequente expansão e diferenciação dessas células em células efetoras que secretam de forma predominante as citocinas pró-inflamatórias. A fase efetora da doença compreende a migração de linfócitos T CD4 específicos para mielina para o SNC, após a quebra da barreira hematoencefálica (BHE). No parênquima ocorre a apresentação dos epítomos da mielina às células T, por células apresentadoras de antígeno do SNC. Concomitantemente, há expressão de quimiocinas e citocinas por células T encefalitogênicas e por células residentes do sistema nervoso central, como

astrócitos e micróglia, que recrutam fagócitos mononucleares para o parênquima do SNC. Acontecendo deste modo a desmielinização axonal pela atividade fagocítica de células mononucleares, provocadas pelos efeitos citotóxicos diretos ou indiretos de moléculas efetoras solúveis como IFN γ , linfotoxina β (Lt β), TNF α , enzimas proteolíticas e radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) liberados principalmente macrófagos e micróglia ativados (KHOURY *et al.*, 1992, KUCHROO *et al.*, 1993).

Dentre as citocinas pro-inflamatórias produzidas na lesão, o TNF α merece destaque especial, pelo fato de induzir apoptose. Dependendo da célula que recebe o sinal de morte, tanto a proteção, como a indução de dano tissular pode ser observado na EAE e EM. Há relatos na literatura mostrando que a maior produção de TNF α pode reduzir a gravidade da EAE, ao eliminar os clones de linfócitos encefalitogênicos (WEISHAUPT *et al.*, 2000). No entanto, existem mais evidências do papel danoso que protetor do TNF α nas doenças desmielinizantes. Essa citocina atua de forma essencial na cascata de eventos que resultam na desmielinização e na lesão axonal, devido ao sua ação mielinotóxica (SELMAJ *et al.*, 1991, D'SOUZA *et al.*, 1996). A administração de TNF α exógeno causa uma forma muito grave de EAE (KURODA *et al.*, 1991), enquanto a administração de anticorpos neutralizantes do TNF α reduz a gravidade da doença (BAKER *et al.*, 1994 e SELMAJ *et al.*, 1995). Estudo realizado em camundongos transgênicos, que produzem TNF α em grande quantidade no sistema nervoso central, apresentaram 100% de desmielinização espontânea (PROBERT *et al.*, 1995). Alta expressão de

TNF α nas lesões cerebrais de pacientes com esclerose múltipla em fase aguda também foi associado com a indução de apoptose em oligodendrócitos *in vitro* (SELMAJ *et al.*, 1991 e D'SOUZA *et al.*, 1995). A produção de TNF α , no sítio da inflamação, é normalmente acompanhada da produção de outros mediadores como o IFN γ , e da óxido nítrico sintase (iNOS), com conseqüente aumento na produção de óxido nítrico (NO) (WILLENBORG *et al.*, 1999).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, solúvel em água e lipídeo, gerado pela atividade catalítica da óxido nítrico sintase (NOS), através da conversão da L-arginina, potente oxidante, podendo causar danos a proteínas, lipídeos, membranas, DNA e organelas sub-celulares (SAHRBACHER *et al.*, 1998). Três diferentes isoformas de NOS, codificadas por genes distintos, estão descritas: a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS) são isoformas que fisiologicamente levam a baixa produção de NO, normalmente na ordem de nanomolar, e estão associadas, entre outros mecanismos, à regulação do fluxo sanguíneo e participação na transmissão sináptica (BORDERIE *et al.*, 2002). A terceira isoforma, tem como principais indutores citocinas como TNF α e IFN γ , e uma vez induzida resulta na produção altas molaridades de NO principalmente nos sítios inflamatórios (SMITH e LASSMANN 2002).

Trabalhos mais recentes mostram que o NO tem um papel importante na regulação do processo inflamatório, onde participam principalmente as citocinas como TNF α e IFN γ , cuja produção pode ser inibida por IL10 e TGF β (BORDERIE *et al.*, 2002). Na EAE, vários estudos foram realizados, ao longo dos anos, sobre a

ação do NO, existindo porém divergências, que vão desde a não participação desse mediador na doença (ZIELASEK *et al.*, 1995), até a participação levando à redução da gravidade da mesma (RUULS *et al.*, 1996, BO *et al.*, 1994, COWDEN *et al.*, 1998 e GOLD *et al.*, 1997) ou na exacerbação dos sinais clínicos (MERRILL *et al.*, 1993, CROSS *et al.*, 1994, BAGASRA *et al.*, 1995, ZHAO *et al.*, 1997, DING *et al.*, 1998, e TEIXEIRA *et al.*, 2002). Os resultados contraditórios podem ser explicados pelos protocolos de pesquisa utilizados, a fase da doença estudada, ou ao uso de inibidores da iNOS. Normalmente a iNOS não está presente no SNC, sendo que sua expressão ou produção coincide temporal e quantitativamente com o agravamento dos sinais clínicos da EAE (KOPROWSKI *et al.*, 1993 e OKUDA *et al.*, 1998).

Assim como foi descrito para o TNF α , o NO produzido via iNOS, tem uma função bem ampla na gênese da EAE, atuando tanto nos processos inflamatórios que levam a desmielinização, no controle da inflamação e neuroproteção. Atualmente, há concordância na literatura sobre a participação do NO, produzido via iNOS, na exacerbação dos sinais clínicos na fase aguda e não na fase crônica tanto da EAE, como na EM (OKUDA *et al.*, 1998, SMITH e LASSMANN, 2002; AHN *et al.*, 2001 e TEIXEIRA *et al.*, 2002). A exemplo do que acontece com TNF α , o óxido nítrico está implicado na indução de apoptose, sendo provavelmente esse o mecanismo responsável pela resposta clínica observada nos animais. A apoptose dos oligodendrócitos na fase aguda da doença, está associada com a piora clínica, enquanto a morte dos linfócitos encefalitogênicos resulta na melhora das

manifestações da doença (MERRILL *et al.*, 1993 e KURODA *et al.*, 1991). Assim, as modificações observadas entre as fases aguda e crônica da EAE e na EM podem ser atribuídas ao duplo papel exercido por esses mediadores. Exemplo de atuação integrada do NO e TNF α no modelo de desmielinização foi dado pelo trabalho de Ahn e colaboradores (2001), que demonstraram que ratos Lewis fazem uma EAE hiper-aguda após a administração da toxina pertussis, sendo que 100% dos animais morreram no 14^o dia após a imunização com o neuro-antígeno. Nesse grupo de animais, foi demonstrado significativo aumento na expressão de iNOS e na produção de TNF α , comparados com animais que apresentavam a EAE monofásica. Esses resultados reforçam a participação efetiva, tanto da iNOS como do TNF α na exacerbação da EAE.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a participação da produção de NO na evolução clínica da EAE, assim como estudar alguns parâmetros da resposta inflamatória. Para tanto, utilizamos animais geneticamente deficientes (*knockout*) para a óxido nítrico sintase induzida, que substituiu com vantagens os inibidores de síntese da iNOS.

Objetivos

OBJETIVOS

- Participação do óxido nítrico, produzido via iNOS, na evolução da Encefalomielite Experimental Auto-imune induzida tanto em animais *knockout* para iNOS, como nos correspondentes não modificados geneticamente (C57BL/6).
- Estudar alguns parâmetros da resposta imune nos dois grupos de animais como: resposta proliferativa de linfócitos e produção de citocinas, sendo que a produção de TNF α foi avaliada nos linfonodos e no local da inflamação.

Materiais
e
Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Camundongos C57BL/6 e camundongo *NOS2^{tm1Lau}* (C57BL/6 iNOS -/- obtido do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine-USA), de 8 semanas, fêmeas foram mantidas, durante a fase de experimentação, no biotério de manutenção do depto de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP em condições livres de patógenos.

Neuro-antígenos

Peptídeo MOG (35-55 N-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-C) foi sintetizado pela Genemed Synthesis – CA- USA.

Indução de EAE

Os camundongos foram imunizados, por via subcutânea, com 60 µg/0.2 ml PBS do peptídeo de MOG (35-55) em emulsão com igual volume de adjuvante completo de Freund, em 2 pontos distintos, nos flancos e duas doses de 200 ng de *pertussis* 0 e 48 horas após a imunização.

Evolução clínica da EAE

Os camundongos foram observados diariamente, a partir do nono dia após a imunização, para os sinais clínicos da EAE. A avaliação foi feita da seguinte forma: grau 0 = não doente; grau 1= perda do tônus da cauda; grau 2= fraqueza parcial dos membros posteriores e dificuldade de voltar à posição inicial quando colocados em decúbito dorsal; grau 3= paralisia graves dos membros posteriores; grau 4= paralisia graves dos membros anteriores e posteriores; grau 5= morte. As observações foram feitas por 60 dias. Atribui-se graus clínicos a cada animal do grupo, o qual foi composto por sete camundongos.

ELISA

Para a quantificação das citocinas: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1 e IL-6 e IL-10 foram utilizados os anticorpos monoclonais específicos para as diferentes citocinas (PharMingen, San Diego, CA). Brevemente, as microplacas (Immulon I, Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram cobertas com 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do anticorpo de captura de cada citocina, em 0.1 M NaHCO_3 (pH=8.5) e incubadas por 18 h a 4°C. Após o bloqueio de reações inespecíficas com 2% de BSA em PBS as amostras e os padrões de citocinas $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1, IL-6 e IL-10 foram adicionados e incubados por duas horas em temperatura ambiente. A seguir, após as devidas lavagens, 0.5-2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticorpos monoclonais (biotinilado) específicos para a detecção de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1, IL-6 e IL-10 foram adicionados, seguido de avidina-peroxidase

na concentração de 1:400 (Sigma Chem., MO, USA). Após as lavagens, o substrato foi adicionado e as placas lidas a 492 nm.

Cérebros para cortes histológicos

Os animais, dos diferentes grupos estudados, foram anestesiados com pentobarbital, 50mg/Kg e decapitados. Os cérebros e cordão espinhal foram removidos cirurgicamente, fixados em nitrogênio líquido e mantidos em bio-freezer a -85°C.

Análise morfológica

Os cérebros e cordão espinhal foram cortados em criostato -23°C, do Departamento de Fisiologia Animal da UNICAMP, colocados em lâminas silanizadas e corados com hematoxilina e eosina (HE). Após a desidratação seriada, em álcool, os cortes foram montados em Entelan (Merck) e observados em microscopia de luz. Os preparados histológicos foram fotografados em fotomicroscópio Carl-Zeiss/Jeneval. Parte desses cortes foram marcados para detecção de TNF- α . Para isso foi utilizado anticorpo primário anti-TNF α biotinilado, seguido pela incubação com avidina-FITC. Os cortes foram montados em glicerol/PBS (3:1) contendo 1,4 diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO; Sigma, MO, USA). A imunofluorescência foi analisada em sistema de dois canais Bio-Rad laser confocal (MRC 1024UV) montado em microscópio invertido Axiovert 100 Zeiss com Ar-Kr lasers.

Obtenção das células de linfonodo

Linfonodos regionais foram removidos assepticamente e suspensões de células foram preparadas usando uma malha de inox. As células foram lavadas 3 vezes com solução balanceada de Hanks e ressuspensas em meio RPMI 1640 enriquecido com Soro Fetal Bovino (Microbiológica - RJ) a 5% e gentamicina (4,25 mg/l), glutamina , 2 Mercaptoetanol. Para determinação da viabilidade celular utiliza-se o método de exclusão com Azul de Trypan.

Cultura de células dos linfonodos

Para a resposta proliferativa específica para MOG (35-55) utilizou-se células de linfonodos de animais imunizados, obtidas de acordo com o item descrito anteriormente. A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células /poço, em microplacas de cultura de 96 poços. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chem. MO, USA) enriquecido de 5% de soro bovino fetal (Microbiológica - RJ) e gentamicina (4,25 mg/litro). O ensaio foi realizado em triplicata. Avaliou-se a transformação blástica de linfócitos estimulados por diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/ml}$) de MOG (35-55) e Con-A a 2,5 $\mu\text{g/ml}$. As células foram incubadas 96-144 horas com o antígeno e 72 horas com mitógeno, em incubadora com sistema constante de CO_2 , numa tensão de

5% a 37° C. Aproximadamente 18 horas antes do término da incubação, foi adicionado em cada poço 1 μ Ci de timidina tritiada (AMERSHAN). Após esse período, o excesso radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor de células (Cell Harvester- modelo 200 A - Cambridge Technology , MA, USA). As células livres de excesso radioativo foram depositadas em papel de fibra de vidro (Cambridge - Technology, MA, USA) e colocadas em tubos padronizados na presença de líquido de cintilação. O conteúdo radioativo foi avaliado em cintilador Beta (Beckman LS 6000 - Liquid Scintillation System). Os resultados estão expressos em contagens por minuto (CPM), sendo considerada a média das triplicatas.

Western blot

Macrófagos intraperitoniais, dos dois grupos experimentais (animais selvagens e iNOS -/-) estimulados e não estimulados com LPS foram homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 sec com 5 sec de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g a 4 °C por 45 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Alíquotas com concentrações protéicas semelhantes foram aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora para diminuir a

ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-iNOS (Santa Cruz), por 4 hs. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Sigma) por 2 hs. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia.

Resultados

RESULTADOS

Efeito do NO na evolução clínica da EAE

Para a análise do efeito do NO na evolução clínica EAE dois grupos de animais (7/grupo) iNOS -/- e não modificados geneticamente C57BL/6 foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅/CFA. A incidência da doença foi de 100% em ambos os grupos após um período pré-clínico de 15 dias para os animais iNOS -/- e 12 para os animais selvagens. Os escores médios máximos foram 1.29 ± 0.48 e 3.43 ± 0.78 para os animais iNOS -/- e selvagens respectivamente, mostrando uma significativa redução ($p < 0.001$) dos sinais clínicos dos animais iNOS -/- quando comparados com os selvagens, durante a fase aguda da EAE. Essa diferença não se manteve na fase crônica da doença (Figura 1A). No sentido de confirmar a não produção da iNOS nos animais iNOS -/- foi realizada cultura de macrófagos intraperitoniais, de animais naive, estimulados ou não com LPS, que sabidamente induz a expressão de iNOS. A presença desse enzima foi detectada por Western Blot. A figura 1B mostra que apenas os macrófagos dos animais não modificados geneticamente, quando estimulados com LPS, produziram iNOs, enquanto não se observou produção da enzima nos animais geneticamente modificados.

Análise histológica dos cortes de medula espinhal dos camundongos iNOS^{-/-} e os correspondentes C57BL/6 não modificados geneticamente após a indução da EAE.

No sentido de confirmar os achados clínicos nos dois grupos de animais estudados, a análise da presença de infiltrado inflamatório foi realizada, na medula dos camundongos, retiradas no 15º dias após a imunização. No grupo de animais não modificados geneticamente pode-se observar a presença de células mononucleares, principalmente na região perivascular. (Figura 4E). No grupo de camundongos iNOS^{-/-} a presença desse infiltrado inflamatório está significativamente reduzida se comparado ao grupo selvagem (Figura 4F)

Resposta linfoproliferativa dos linfócitos de animais KO para iNOS e correspondents não modificados geneticamente.

A resposta proliferativa para Con-A e para o peptídeo de MOG₃₅₋₅₅ foi avaliada para os 4 grupos: Camundongos não modificados geneticamente, nas fases aguda e crônica e camundongos iNOS^{-/-} fases aguda e crônica (6 animais/grupo). Na fase aguda da doença, o grupo dos animais iNOS^{-/-} teve significativa redução ($p < 0.01$) na proliferação de linfócitos estimulados pelo peptídeo encefalitogênico quando comparado com o grupo selvagem (6025.0 ± 427.03 cpm versus 10904.0 ± 3643.48 cpm) respectivamente. Com relação ao mitógeno inespecífico (Con-A) não se observou mudança significativa (Figura 2A). Na fase crônica não houve modificação significativa para ambos os estímulos (Figura 2B).

Produção de citocinas.

Os leucócitos foram estimulados com MOG₃₅₋₅₅ e o sobrenadante das culturas retirados para a análise das citocinas (IL-1, IL-6, IL-10 TNF- α e IFN γ), pelo método de ELISA de captura. O sobrenadante dos 4 grupos experimentais foram coletados. Não foi detectada diferença significativa na secreção de IL-1, IL-6, IL10 e TNF- α no sobrenadante tanto nos animais selvagens, como nos iNOS -/- em nenhuma das duas fases (aguda e crônica). A secreção de IFN γ está significativamente reduzida ($p < 0.01$) no grupo iNOS -/- na fase aguda quando comparado com o grupo selvagem (1104.17 ± 70.74 $\mu\text{g/ml}$ versus 1691.54 ± 299.00 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente; Figura 3A). Durante a fase crônica há redução significativa ($p < 0,05$) desta citocina no sobrenadante de cultura de leucócitos dos animais selvagens quando comparados com os iNOS -/- (548.41 ± 59.87 versus 962.92 ± 136.24 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente; Figure 3B).

Deteção de TNF α em cortes da medula espinhal dos camundongos iNOS-/- e não modificados geneticamente. O TNF α foi descrito como principal citocina envolvida nos processos de desmielinização, por ser tóxico para a mielina. Assim, a presença dessa citocina foi pesquisada nos cortes de medula espinhal dos dois grupos de camundongos estudados, retirados tanto na fase aguda, como na fase crônica da EAE. Os resultados mostram que na fase aguda da EAE induzida em animais C57BL/6 selvagens, há um significativo aumento no número de células que expressam TNF α , (Figura 4A); enquanto se observa poucas células expressando

essa citocina na medula dos animais iNOS $-/-$ (Figura 4B). Na fase crônica da doença não se observa a presença de células expressando $\text{TNF}\alpha$ nos dois grupos de camundongos estudados (Figura 4C e 4D).

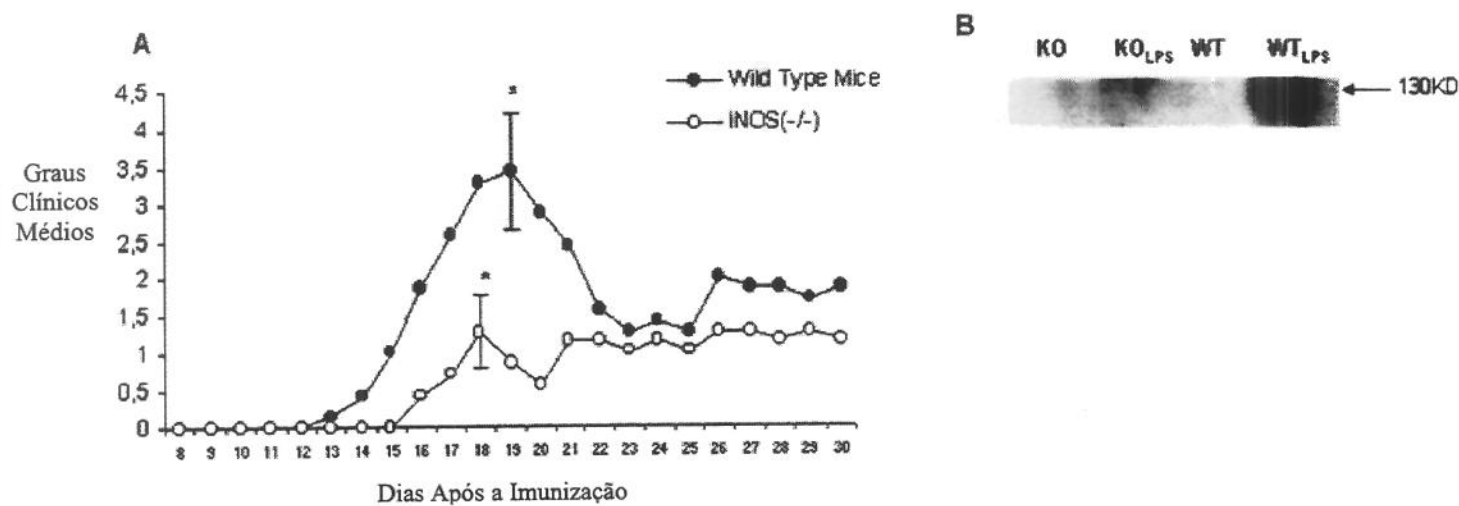


Figure 1. Encefalomielite experimental auto-imune induzida por imunização com peptídeo de MOG₃₅₋₅₅ em camundongos *knockout* para óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-/-}) e camundongos correspondentes C57Bl/6 não modificados (A). Identificação da expressão da iNOS por macrófagos estimulados e não estimulados com LPS, nos animais iNOS^{-/-} e selvagens (B).

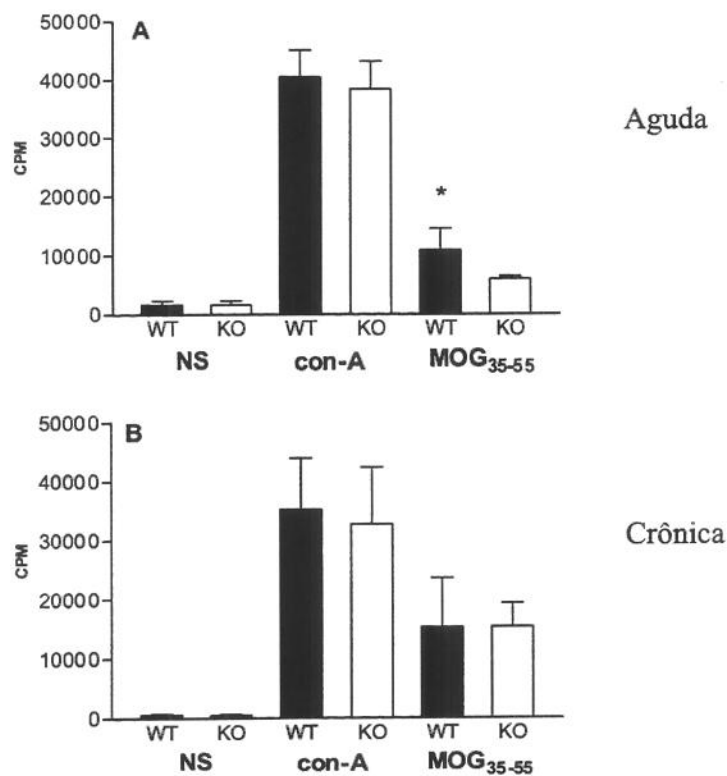


Figure 2. Resposta linfoproliferativa de células de linfonodo de animais iNOS^{-/-} e selvagens estimulados com MOG₃₅₋₅₅ e Concanavalina A, avaliada pela incorporação de timidina tritiada nas fases aguda (A) e crônica (B).

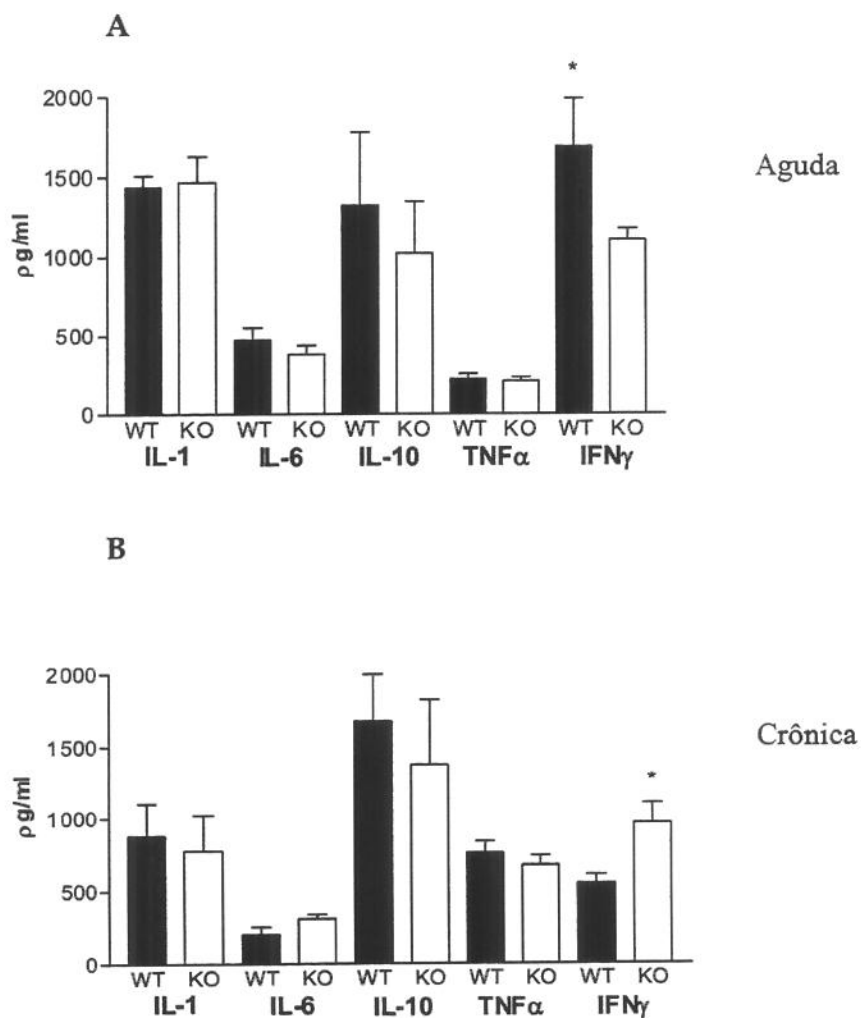


Figure 3. Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos de animais iNOS^{-/-} e selvagens, estimulados com MOG₃₅₋₅₅, quantificadas na fase aguda (A) e crônica (B) por ELISA de captura.

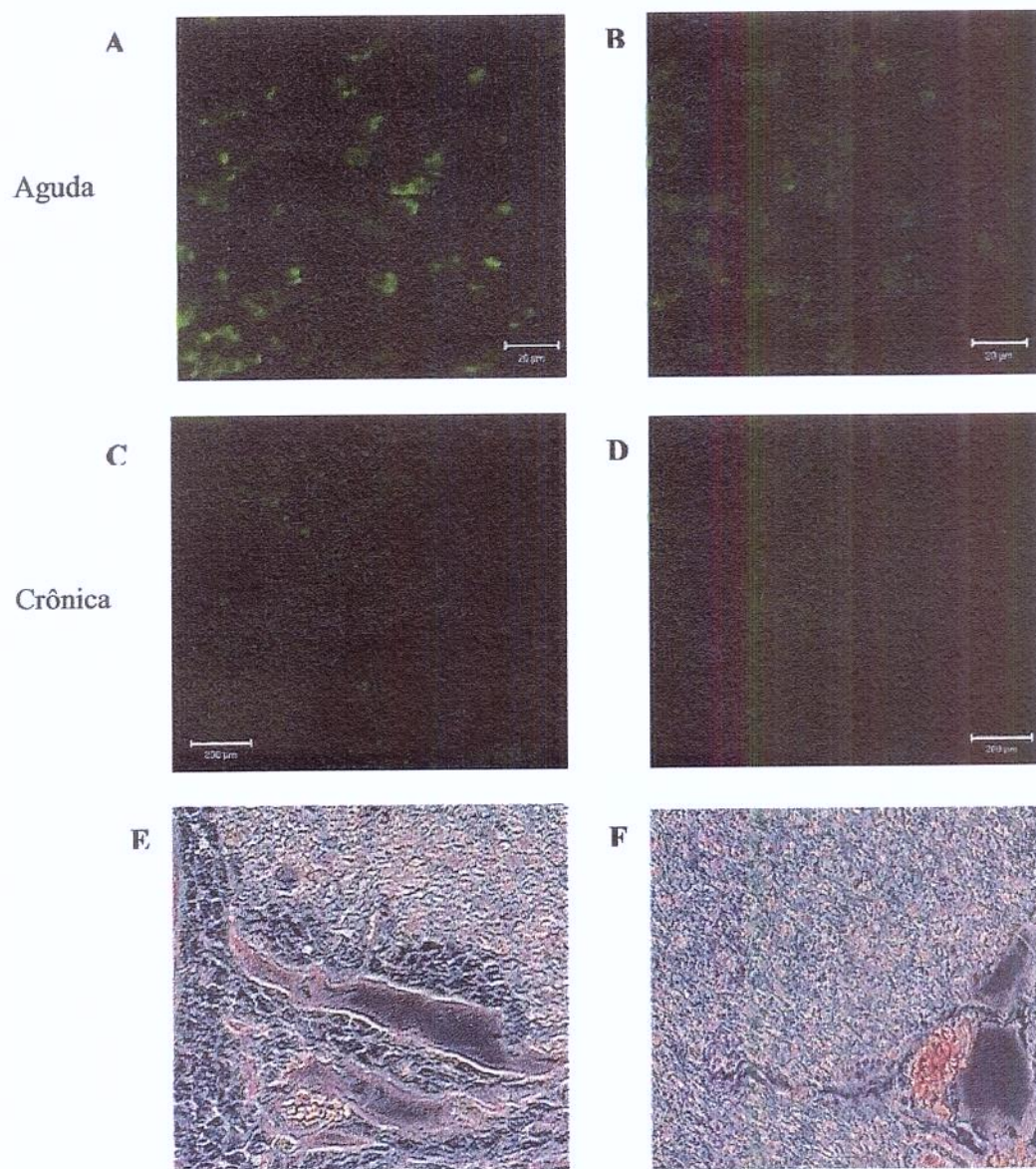


Figure 4. Produção de TNF α em cortes de medula espinhal de animais selvagens nas fases aguda (A) e crônica (C), e nos animais *iNOS*^{-/-}, nas fases aguda (B) e crônica (D). Identificação de infiltrados inflamatórios em animais selvagens (E) e *iNOS*^{-/-} (F).

Discussão

DISCUSSÃO

O fato de a EAE ser transferida adotivamente por linfócitos T CD4 do tipo Th1, faz com que esse modelo seja considerado um protótipo de doença auto-imune mediada por reações de hipersensibilidade tardia. No entanto, a participação direta dos linfócitos T na gênese dos processos desmielinizantes é questionada; ao contrário do esperado, a injeção intratecal de linfócitos encefalitogênicos, não necessariamente causa desmielinização (SUN e WEKERLE 1986). Portanto, vários outros tipos de células como os macrófagos, astrócitos e microglias participam da reação inflamatória, que resulta no dano à mielina.

Após a ruptura da barreira hemato-encefálica, linfócitos T sensibilizados aos neuroantígenos migram dos linfonodos e reconhecem a mielina do SNC através de apresentação feita principalmente pelos astrócitos e as células microgliais (FONTANA, FIERZ e WEKERLE, 1984). Essas células expressam os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas e moléculas de MHC de classe II. São células fagocitárias e podem mediar o dano à mielina e aos oligodendrócitos através da liberação de proteases e citocinas pro-inflamatórias ou ainda através de reação oxidativa desencadeada pelos radicais livres.

No presente trabalho, estudamos o efeito da liberação do óxido nítrico (NO) na evolução clínica da EAE induzida em camundongos C57Bl/6. Esses camundongos são normalmente resistentes à indução de EAE, no entanto, o fato de peptídeo de MOG 35-55 (MENDEL, *et. al* 1995) selecionar clones de linfócitos

encefalitogênicos para essa linhagem, possibilitou o uso de animais geneticamente modificados (*knockout*) para a iNOS. A utilização desse grupo de animais permite o estudo do NO sem as inconveniências da administração dos inibidores de síntese da iNOS.

Para confirmar a não expressão de iNOS pelos camundongos KO para essa enzima, macrófagos desses animais e de animais selvagens foram estimulados com LPS, que sabidamente induz a expressão de iNOS. A figura 1b mostra claramente que macrófagos de animais iNOS^{-/-}, mesmo após o estímulo com LPS, não produzem iNOS, sendo que nos camundongos não modificados geneticamente observou-se a produção normal dessa enzima.

A imunização dos animais KO para iNOS com o epitopo encefalitogênico da molécula de MOG, induziu uma doença (EAE) muito menos grave que a observada nos animais selvagens. A redução da gravidade clínica foi confirmada pela diminuição do infiltrado inflamatório no SNC desses animais. Esses dados sugerem, portanto, a participação do NO no processo inflamatório e desmielinizante da EAE. A participação do NO na EAE e EM é polêmica, havendo relatos da não participação, do efeito protetor ou ainda do agravamento da doença causada por esse mediador. É possível que todas essas observações façam sentido, se analisadas nas diferentes fases clínicas da doença.

A produção de NO pode interferir em diferentes níveis da cascata inflamatória. Por exemplo, há relatos de que o NO pode inibir a apresentação de antígeno e conseqüentemente a proliferação linfocitária (VAN DER VEEN, 2001,

ALBINA E HENRY 1991), participando também da indução da apoptose de linfócitos auto-reativos (ZETTL, *et. al.* 1997). O predomínio desses mecanismos limitam a reação inflamatória e consequentemente a evolução da doença. No entanto, há evidências de que a diminuição da liberação do NO pode inibir o recrutamento de células T e macrófagos para a lesão inflamatória (SICHER, *et. al.* 1994 e KUBES, *et. al.* 1991), além de poder induzir apoptose dos oligodendrócitos, e causar degradação direta da mielina, bloqueando a condução de impulsos nervosos, contribuindo para perda de funções motoras (CROSS *et. al.* 1996).

O efeito do NO também foi estudado na resposta proliferativa de linfócitos estimulados com o peptídeo encefalitogênico. Significativa redução da resposta blastogênica de linfócitos foi observado nos animais KO para iNOS com relação aos animais não modificados geneticamente. Essas observações reforçam a idéia sobre a cooperação das entre as células nos processos de desmielinização. A associação entre a produção do NO e a liberação de citocinas também foi analisada. As evidências mostram que citocinas do tipo Th1 ou proinflamatórias como IFN γ e TNF α contribuem no processo de desmielinização, enquanto citocinas do tipo Th2 ou antiinflamatórias como IL4, IL10 e TGF β reduzem a reação inflamatória levando à remissão da EAE (YOUNG, *et. al.* 2000). Essas citocinas são extremamente importantes na regulação da doença tanto no modelo experimental, como na esclerose múltipla. No entanto, quando a síntese de IL1 e IL6 pelas células dos linfonodos foi quantificada, não se observou alteração significativa tanto em animais selvagens, como em animais iNOS -/- na fase aguda da EAE, contrastando

com significativa redução na síntese dessas citocinas na fase crônica em ambos os grupos experimentais. Citocinas do tipo Th1, como IFN γ , amplificam a reação inflamatória uma vez que são potentes estimuladoras dos macrófagos e indutoras da produção de iNOS (YOUNG, *et. al.* 2000). Neste estudo, foi demonstrado significativa redução da síntese desta citocina, pelas células dos linfonodos, em animais iNOS $-/-$, durante a fase aguda da doença. Durante a fase crônica da EAE, a síntese de IFN γ pelas células do linfonodo de animais iNOS $-/-$ não sofre alteração, enquanto há redução na produção pelas células dos camundongos não modificados geneticamente. Nesses camundongos, a síntese de TNF α pelas células dos linfonodos está reduzida, de forma significativa, na fase aguda, enquanto pode-se observar um grande número de células expressando essa citocina no sítio inflamatório. Esses resultados sugerem que na fase aguda da doença, as células ativadas que produzem TNF α migram dos órgãos linfóides periféricos para o sítio inflamatório no sistema nervoso central. Os camundongos iNOS $-/-$, no entanto, praticamente não apresentam células produzindo TNF α tanto nos órgãos linfóides periféricos, como no sistema nervoso central, na fase aguda da doença. Essa observação pode explicar a redução dos sinais clínicos da EAE, uma vez que o efeito mielinotóxico do TNF α é bem descrito (SELMAJ *et. al.* 1991 e D'SOUZA, *et. al.* 1996). A expressão de TNF α na fase crônica, em ambos os grupos experimentais, no sistema nervoso central é praticamente nula. Esses resultados demonstram a importante participação do TNF α no processo de desmielinização, reforçando estudos anteriores que demonstraram a alta expressão gênica de TNF α no sistema

nervoso central, durante a fase aguda da EAE (SELMAJ *et. al.* 1991, SELMAJ *et. al.* 1995 e POLLAK, *et. al.* 2003).

Os dados apresentados mostram a associação do $\text{TNF}\alpha$ e NO no processo de degradação da mielina, na fase aguda da doença. A redução desses mediadores proinflamatórios na fase crônica da EAE pode ser explicada pelo aumento de citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-10 e $\text{TGF}\beta$. A recuperação da EAE está associada à maior síntese das citocinas antiinflamatórias produzidas pelos linfócitos Th2/Th3 (KHOURY *et. al.* 1992), essas mesmas citocinas inibem a ativação de macrófagos/microglias e a produção de NO (BORDERIE, *et. al.* 2002 e OSWALD, *et. al.* 1992) reduzindo, conseqüentemente, a gravidade da doença.

Os achados deste estudo demonstram o importante papel do NO em associação com o $\text{TNF}\alpha$, na patogênese da EAE. Por um lado, citocinas proinflamatórias são indutoras de NO, amplificam a resposta inflamatória e a degradação da mielina. Por outro lado, a ausência do NO diminui a intensidade da reação inflamatória e conseqüentemente a liberação de citocinas envolvidas na destruição da bainha de mielina, como o $\text{TNF}\alpha$, resultando na redução dos sinais clínicos da EAE. Esse estudo reforça a participação dos macrófagos/microglias e mediadores inflamatórios liberados por essas células na patologia da EAE, ainda que essa doença seja desencadeada por linfócitos T CD4^+ .

Conclusões

CONCLUSÕES

- *O ÓXIDO NÍTRICO PARTICIPA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA FASE AGUDA DA EAE.*
 - Houve significativa redução da gravidade da doença, avaliada tanto clínica, como histologicamente nos animais KO para iNOS, quando comparado ao grupo de camundongos correspondentes, não modificados geneticamente.
 - O NO interferiu na apresentação do antígeno, uma vez que os animais KO apresentaram redução da resposta proliferativa para o neuroantígeno.
 - O NO atua em associação com $\text{TNF}\alpha$ nas lesões desmielinizantes, pois animais KO para iNOS praticamente não produziram essa citocina, no local da inflamação, na fase aguda da doença.

Referências

REFERÊNCIAS

- AHN M., KANG J., LEE Y., RIU K., KIM Y., JEE Y., MATSUMOTO Y., SHIN T. Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett.* 2001 Jul 27;308(1):41-4
- BAGASRA O., MICHAELS F.H., ZHENG Y.M., BOBROSKI L.E., SPITSIN S.V., FU Z.F., TAWADROS R., KOPROWSKI H. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12041-5.
- BAKER D., BUTLER D., SCALLON B.J., O'NEILL J.K., TURK J.L., FELDMANN M. Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur J Immunol.* 1994 Sep;24(9):2040-8.
- BEN-NUN, A. & COHEN, I.R. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mediated By T Cells Lines: Process of Lines and Characterization of the Cell. *J.Immunol.* 1982 129:303-308.

- BO, L., DAWSON, T.M, WESSELINGH, S., MORK, S., CHOI, S., KONG, P.A. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brain. *Ann Neurol*. 1994 36 778-786.
- BORDERIE, D., HILLIQUIN, P., HERNVANN, A., LEMARECHAL, H., KAHAN, A., MENKES, C.J., EKINDJIAN, O.G. Inhibition of inducible NO synthase by Th2 cytokines and TGF β in Rheumatoid arthritic synoviocytes: Effects on nitrosothiol production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 2002 10:1-12.
- CHAMBERS, C.A., KRUMMEL, M.F., BOITEL, B., HURWITZ, A., SULLIVAN, T.J., FOURNIER, S., CASSELL, D., BRUNNER, M., and ALLISON, J.P. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev*. 1996 153:27-46.
- CHEN, Y., KUCHROO, V.K., INOBE, J-I, HAFLER, D.A., WEINER, H.L. Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance: Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. *Science* 1994 265:1237-1240.
- COWDEN, W.B., CULLEN, F.A., STAYKOVA, M.A., WILLENBORG, D.O. Nitric oxide is a potential down-regulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE, *J Neuroimmunol*. 1998 Aug 1;88(1-2):1-8.
- 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*. 1994 Jun;93(6):2684-90.

- DING, M., ZHANG, M., WONG, J.L., ROGERS, N.E., IGNARRO, L.J., VOSKUHL, R.R. Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol.* 1998 Mar 15;160(6):2560-4.
- D'SOUZA, S.D., ALINAUSKAS, K.A., ANTEL, J.P. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res.* 1996 Feb 1;43(3):289-98.
- GOLD, D.P., SCHRODER, K., POWELL, H.C., KELLY, C.J. Nitric oxide and the immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1997 Nov;27(11):2863-9.
- GOMES, N.A., GATTAS, C.R., BARRETO-DE-SOUZA, V., WILSON, M.E., DOS REIS, G.A. TGF- β mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J.Immunol.* 2000 164, 2001-2008.
- GUILHERME, L., KALIL, J. Rheumatic fever: the T cell response leading to autoimmune aggression in the heart. *Autoimmun Rev.* 2002 Oct;1(5):261-6.
- HALLAL, D.E., FARIAS, A.S., OLIVEIRA, E.C., DIAZ-BARDALES, B.M., BRANDAO, C.O., PROTTI, G.G., PEREIRA, F.G., METZE, I.L., SANTOS, L.M. Costimulatory molecule expression on leukocytes from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with IFN-beta. *J. Interferon Cytokine Res.* 2003 Jun;23(6):293-8.
- HOLOSHITZ, J., FRENKEL, A., BEN-NUN, A., COHEN, I.R.. Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mediated or prevented by lymphocyte lines

- directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein. Vaccination is determinant specific. *J.Immunol.* 1983 131, 2810-2813.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M. SHLOMCHIK, M., Immunobiologia: O sistema immune na saúde e na doença, ARTMED, 5ª Ed., Porto Alegre -RS 2002.
 - KHOURY, S., AKALIN, E., CHANDRAKER, A., TURKA, L.A., LINSLEY, P.S., SAYEGH, M.H., HANCOCK, W.W. CD28-B7 Costimulatory Blockade by CTLA4 ig Prevents Actively Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits Th1 but Spares Th2 Cytokines in the Central Nervous System. *J. Immunol.* 1995 155:4521-4524,.
 - KOHASHI, O., KOHASHI, Y.; TAKAHASHI, T.; OZAWA, A.; SHIGEMATSU, N. Suppressive Effect of *Escherichia coli* on Adjuvant-induced Arthritis in Germ-free Rats. *Arthritis Rheum* 1986, 29 (4),547-552.
 - KOPROWSKI, H., ZHENG, Y.M., HEBER-KATZ, E., FRASER, N., RORKE, L., FU, Z.F., HANLON, C., DIETZSCHOLD, B. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jun 1;90(11):5378.
 - KUCHROO, V.K.; MARTIN, C.A, GREER, J.M., JU, S.T., SOBEL, R.A., DORF, M.E. Cytokines and Adhesion Molecules Contribute to the Ability of Myelin Proteolipid in-Specific T Cells Clones to Mediated Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 151: 4371-4382,1993.

- KURODA, Y., SHIMAMOTO, Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol.* 1991 Nov;34(2-3):159-64.
- LENARDO, M.J. Interleukin 2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis *Nature* 1991 353:858-861.
- LENARDO, M.J., CHAN, K.M., HORNUNG, F., McFARLANE, H., SIEGEL, R., WANG, J., ZHENG, L., Mature T lymphocyte apoptosis immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annual. Rev. Immunol.* 1999 17: 221-53.
- LENSCHOW, D.J., WALUNAS, T.L., BLUESTONE, J.A. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Ann. Review of Immunol.* 1996 Apr; 14: 233-258.
- LEON, J.S., ENGMAN, DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci.* 2003 May 1(8):315-22.
- LIDER, O., SANTOS, L.M.B., LEE, C.S.Y., HIGGINS, P.J. & WEINER, H.L. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by the Oral Administration of Myelin Basic Protein. II. Suppression of the Disease and in vitro Immune Responses Mediated by Antigen-Specific CD8+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* 1989 141: 7480753.
- MCDEVITT, H.O. Discovering the Role of the Major Histocompatibility Complex in the Immune Response. *Ann. Review of Immunol.* 2000 Apr. 18: 1-17.

- MERRILL, J.E., IGNARRO, L.J., SHERMAN, M.P., MELIMEK, J., LANE, T.E. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunology* 1993 151 2132-2141.
- MORAHAN, M.G. Peripheral T cell tolerance. *Annu. Review of Immun.* 1992 Apr. 10: 51-69.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L.,. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986 136: 2348-2357.
- MUELLER, D.L., JENKINS, M.K. AND SCHWARTZ, R.H.,. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a coestimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 1989 7: 445-480.
- NAVIKAS, V., LINK, H.,. Review: Cytocines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neurosc. Res.* 1996 45:322-333.
- OKUDA, Y., SAKODA, S., FUJIMURA, H., YANAGIHARA, T. Aminoguanidine, a selective inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, has different effects on experimental allergic encephalomyelitis in the induction and progression phase. *J Neuroimmunol.* 1998 Jan;81(1-2):201-10.
- OLESZAK, E.L., CHANG, J.R., FRIEDMAN, H., KATSETOS, C.D., PLATSOUKAS C.D. Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Jan;17(1):174-207.

- PROBERT, L., AKASSOGLOU, K., PASPARAKIS, M., KONTOGEORGOS, G., KOLLIAS, G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 21;92(24):11294-8.
- ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000 Jul;85(1):9-18; quiz 18, 21.
- 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*. 1996 Mar;103(3):467-74.
- SAHRBACHER, U.C., LECHNER, F., ENGSTER, H.P., FREI, K., LASSMANN, H. & FONTANA, A. Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol*. 1999 28:1332-1338.
- SAKAGUCHI, S. Naturally Arising CD4⁺ Regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Review of Immun*. 2004 Apr. 22: 531-562.
- SCHWARTZ M., COHEN I.R. Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today*. 2000 Jun;21(6):265-8. Review
- SCHWARTZ, R.H. T Cell anergy. *Ann. Review of Immun*. 2003 Apr; 21: 305-334.

- SELMAJ, K., PAPIERZ, W., GLABINSKI, A., KOHNO, T. Prevention of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble tumor necrosis factor receptor I. *J Neuroimmunol.* 1995 Feb;56(2):135-41.
- SELMAJ, K., RAINE, C.S., CANNELLA, B., BROSNAN, C.F. Identification of lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis Lesions. *J. Clin. Invest.* 1991 87: 949.
- SHEHADEH, N.; CALCINARO, F.; BRADLEY, B.J.; BRUCHLIM, I.; VARDI, P.; LAFFERTY, K.J. Effect of Adjuvant Therapy on Development of Diabetes in Mouse and Man. *Lancet* 1994 , 343 (8899),706-707.
- SMITH, K.J., LASSMANN, H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002 Aug;1(4):232-41. Review
- TEIXEIRA, S.A., CASTRO, G.M., PAPES, F., MARTINS, M.L., ROGERIO, F., LANGONE, F., SANTOS, L.M., ARRUDA, P., DE NUCCI, G., MUSCARA, MN. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002 Feb 28;99(1):17-25.
- WAKSMAN, B. Mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 1985, 318, 104-105.
- WEISHAUPT, A., GOLD, R., HARTUNG, T., GAUPP, S., WENDEL, A., BRUCK, W., TOYKA, K.V. Role of TNF-alpha in high-dose antigen therapy in experimental autoimmune neuritis: inhibition of TNF-alpha by neutralizing antibodies reduces T-cell apoptosis and prevents liver necrosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 May;59(5):368-76.

-
- 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.* 1999 Dec;100(1-2):21-35. Review.
 - ZHAO, W., TILTON, R.G., CORBETT, J.A., MCDANIEL, M.L., MISKO, T.P., WILLIAMSON, J.R., CROSS, A.H., HICKEY, W.F. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol.* 1996 Feb;64(2):123-33.
 - ZIELASEK, J., JUNG, S., GOLD, R., LIEW, F.Y., TOYKA, K.V., HARTUNG, H.P. Administration of nitric oxide synthase inhibitors in experimental autoimmune neuritis and experimental autoimmune encephalomyelitis *J. Neuroimmunol.* 1995 Apr;58(1):81-8.

Nitric oxide and TNF α effects in Experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination

Alessandro S. Farias,^a Cristiane de la Hoz,^b Fabiano R. Castro,^a Jose R. Ribeiro dos Reis,^a João S. Silva,^c Francesco Langone,^b Leonilda M.B.Santos^a.

Neuroimmunology unit, Dept. Microbiology and Immunology (a), Dept. Physiology (b), University of Campinas – Campinas- SP – Brazil. Dept. Immunology, University of São Paulo(c) – Ribeirão Preto – SP- Brazil

Key words: EAE, NO, macrophages activation

Running title: NO aggravation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Address for correspondence: Leonilda M.B. Santos Ph.D. – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia- UNICAMP- Campinas – SP- Brazil- CEP 13083-970 – Phone:55.19.37886262; FAX # 55.19. 37886276; E mail: leonilda@unicamp.br

ABSTRACT

The involvement of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which plays several roles in the progression of autoimmune diseases was studied in iNOS knockout (KO) mice and wild type (WT) controls for the Experimental autoimmune encephalomyelitis. The iNOS $-/-$ mice presented a less severe form of the disease than did the wild type control mice. Although the levels of $\text{TNF}\alpha$ diminished in the periphery for both groups, an increase in the number of $\text{TNF}\alpha$ positive cells was detected in the central nervous system during the acute phase of Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced in the WT mice, whereas no production of $\text{TNF}\alpha$ was detected in the KO mice. These findings suggest that NO and $\text{TNF}\alpha$ contribute to pathogenesis during acute EAE.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is the most common human demyelinating disease of the central nervous system (CNS) [1]. Based on the fact that it shares similarities in relation to course of the disease and histology, EAE has been used extensively as an animal model for MS [2]. EAE is a Th1 cell-mediated autoimmune disease induced by immunization with myelin components or by adoptive transfer of autoreactive T cells. The Th1 cells characteristically produce IL2, IFN γ , TNF α and lymphotoxin (TNF β), which participate in inflammatory reactions [3]. This leads to a characteristic relapsing and remitting paralytic disease, in EAE model induced in mice [4]. Histological examination of the CNS reveals the presence of both a rich inflammatory mononuclear cell infiltrate and demyelination resulting from bystander activation of resident microglia and recruited, infiltrating monocytes[5].

Antigen-presenting cells generate the reactive oxygen and nitrogen species that may damage different cell types including oligodendrocytes, leading to consequent damage of the myelin sheath, thus resulting in demyelination and cell death. Despite knowledge about the induction and regulation of NO production, the role of NO in tissue in demyelination is highly controversial. While many investigators have concluded that NO is involved in the pathogenesis of EAE [6-14], others have reported quite opposing protective effects [15,16]. Constitutive neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (e NOS) participate in normal physiological events [17,18] whereas an excess in NO production, via inducible nitric oxide synthase (iNOS) may causes tissue damage. The iNOS expression can be induced by a combination of factors, including the presence of lipopolysaccharide (LPS), TNF α , IFN γ , IL1 and PGE2 [19,20]. Recently we have demonstrated the upregulation of iNOS during the acute form of EAE induced in Lewis rats [21]. Inducible NOS has also been demonstrated in the brain of patients with MS associated with demyelinated plaques [22].

The present study was conducted to investigate the specific role of NO induced by iNOS in the regulation of EAE in iNOS knockout C57BL/6 and wild-type mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six to eight-week-old female C57BL/6 and *NOS2^{tm1Lau}* mice (C57BL/6 iNOS(-/-)) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine-USA). The animals were housed and maintained pathogen free in the university animal facility. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care and approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (CEEa/UNICAMP).

Antigens and induction of EAE.

Each animal received a s.c. injection of 60 µg of MOG35-55 (N-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-C) (Genemed Synthesis, CA, USA), emulsified in an equal volume of complete Freund's adjuvant containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI, USA). Each animal received 200 ng/mouse of pertussis toxin i.p. (List Biochemicals, CA, USA), 0 and 2 days after immunization.

Clinical expression of the disease was graded on a clinical index scale of 0 to 5 as follows: grade 0, no clinical signal, grade 1, limp tail; grade 2, hindlimb weakness; grade 3, plegia of both hind limbs; grade 4, plegia of three or four limbs; grade 5, moribund.

Lymphocyte proliferative response:

Popliteal and inguinal lymph nodes were removed at 17 and 28 days post immunization, pooled, and mechanically dispersed through a nylon mesh to isolate single-cell suspensions. The cells in suspension were washed twice in Hanks solution and resuspended in RPMI 1640 with 2 Mercaptoethanol, and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, USA), prior to stimulate by 2 µg/mL of MOG₃₅₋₅₅ for 96h or 2,5 µg/mL of Concanavalin-A (Con-A) for 72h. The cultures (2x10⁵ cells /well) were pulsed with 1µCi Methyl ³H thymidine (Amershan) per well during the final 16 h, and were then harvested (Cell Harvester – Cambridge Technology,

MA, USA) with thymidine uptake measured in a scintillation counter (Beckman System CA, USA).

Quantification of cytokines:

For quantification of IL-1, IL-6, IFN γ , TNF α and IL10, commercial kits were used (BD-Pharmingen, CA, USA). Briefly, 96-wells microtiter plates were coated with 1-2 μ g/ml of capture monoclonal antibody (mAb) for each cytokine in 0.1M NaHCO₃ (pH=8.5) overnight at 4°C. Following blocking with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS at room temperature for 2 h, samples and standard recombinant IL-1, IL-6, IFN γ , TNF α and IL10 were added and incubated at 4°C. Then, 0.5-2.0 μ g/ml of biotinylated detection mAb to mouse IL-1, IL-6, IFN γ , TNF α , and IL10, was added, followed by 1/400 avidin-peroxidase (Sigma Chem., MO, USA) the peroxidase substrate was then added, and finally the stop solution for determination of the optical density at 492 nm.

Histology and Immunohistochemistry

Ten-micrometer sections were cut from snap-frozen spinal cords, removed from two groups of mice (iNOS KO and Wild-Type) in acute and chronic phases of EAE; these sections were fixed on silane-coated slides and rinsed in PBS three times. At this time, the sections were examined and the inflammatory infiltrates identified by polarization microscopy. Following by pre-incubation for 1 h in PBS containing 3% BSA/0.1% Tween, and followed by incubation overnight with in a humid chamber at 4°C, with biotinylated monoclonal antibody anti-TNF α (1:200). After several rinses with PBS, the sections were incubated at room temperature for 1 hour with Avidin-FITC (1:100 BD-Pharmingen, CA - USA). The sections were then mounted in glycerol/PBS (3:1) containing 1,4 diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO; Sigma, MO, USA) as an anti-fading agent. Immunofluorescence was observed using a double-channel Bio-Rad laser confocal system (MRC 1024UV) mounted on an Axiovert 100 Zeiss inverted microscope equipped with Ar-Kr lasers.

Western Blot

The Wild-type and iNOS(-/-) mice were sacrificed, and peritoneal macrophages were harvested. Cells were seeded (2×10^5 cells) in 96-well plates and incubated for 1h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Thereafter, the plates were washed, and the adherent macrophages were incubated in the complete RPMI 1640 medium with and without lipopolysaccharide (LPS) (200 ng/ml) for 24 h.

After culture, the macrophages were homogenized in 200 µl of solubilization buffer (10% Triton-X 100, 100 mM Tris pH 7.4, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, and 2 mM PMSF) for 30 s using a Polytron PT 1200 C homogenizer (Brinkmann Instruments, NY, USA). The extract was centrifuged at 15,000 g, for 20 min, at 4 °C and the supernatant was used for the determination of protein. Aliquots containing 70 µg/mL of protein from the macrophages were run on 10% polyacrylamide gels. Proteins were then transferred from the gels to nitrocellulose at 120 V for 2 h. Non-specific protein binding to nitrocellulose was reduced by pre incubation with blocking buffer (5 % BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20) for 12 h at 4°C. The nitrocellulose membranes were then incubated for 4 h at 22°C with anti-iNOS antibody (Santa-Cruz CA, USA). The blots were subsequently incubated with 2 ng/ml secondary antibody conjugated HRP, and the Super Signal (Pierce MA, USA) revelation solution bound to the antibodies was detected by autoradiography using Kodak film.

Statistical Analysis

The statistical significance of the results was determined using a non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) and Mann-Whitney (U-test). A *p* value smaller than 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Reduction of clinical signs of EAE in iNOS KO mice.

To examine the effect of iNOS on EAE, two groups of mice (7/group) were immunized with MOG₃₅₋₅₅/CFA. The incidence of EAE was 7 out of 7 for the two groups of mice, the mean preclinical period before onset was 15 days for the iNOS(-/-) mice and 12 days for the wild type controls with mean maximal scores of 1.29 ± 0.48 and 3.43 ± 0.78 KO for the wild type mice respectively. A significant reduction ($p < 0.001$) in the severity of EAE was observed in the iNOS (-/-) mice in relation to WT controls mice, during the acute phase of the disease, whereas no differences were observed in the chronic phase (Figure 1A). In order to confirm the absence of iNOS in the iNOS KO mice, the production of iNOS by macrophages activated or not with LPS was analyzed in both KO and WT mice. Figure 1B shows that no iNOS was produced by the iNOS KO mice, even when the cells were previously stimulated with LPS.

Lymphocyte proliferative response

The lymphocyte proliferative responses to Con-A and MOG₃₅₋₅₅ peptide were evaluated in the four groups: both wild-type and iNOS-/- in both acute phase and chronic phase (6 mice/group). In the acute phase of disease, the iNOS(-/-) group demonstrated a proliferative response to MOG₃₅₋₅₅ (6025.0 ± 427.03 cpm versus 10904.0 ± 3643.48 cpm) significantly lower ($p < 0.01$) than that obtained in wild-type group respectively. No significant changes in response to Con A were observed either type of mice (Figure 2A). In the chronic phase there was no significant change in the lymphocyte proliferative response for either iNOS(-/-) or wild-type group when cells were stimulated with either Con-A or MOG₃₅₋₅₅ (Figure 2B).

Cytokines production by both KO mice and WT controls in acute and chronic phases of

EAE

Leukocytes were stimulated by MOG35-55 peptide and Con A, and the cytokines (IL-1, IL-6, IL-10 TNF- α and IFN- γ) production was quantified in the supernatant of the culture using a capture ELISA assay. The supernatant from cells stimulated with the specific antigen (MOG₃₅₋₅₅), were collected from four groups of mice: both wild-type and iNOS(-/-) in both acute and chronic phases (7 mice/group). There were no differences in level of IL-1, IL-6, IL10 and TNF- α produced in the supernatant during the acute and chronic phases for either kind of mice. The IFN- γ production of the KO mice reached significantly lower levels ($p < 0.01$) than did that of WT mice during the acute phase of the disease 1104.17 ± 70.74 pg/ml versus 1691.54 ± 299.00 pg/ml respectively; Figure 3A. During the chronic phase, there was a significant reduction of this cytokine in the WT controls 548.41 ± 59.87 versus 962.92 ± 136.24 pg/ml respectively (Figure 3B).

Immunohistochemical findings: In the acute phase of EAE, staining with monoclonal antibody for TNF α in the inflammatory foci on the spinal cord of WT mice demonstrated a large number of TNF α positive cells (Figure 4A); although hardly any such TNF α cells were observed in the tissue of iNOS(-/-)(Figure 4B); In the chronic phase, however, no TNF α -positive cells were found in either kind of mice (4C and 4D).

Histopathological findings: In the WT mice a large number of mononuclear cellular infiltrates were observed, mainly in the perivascular space of the spinal cord, at the peak of the disease (4E). In the iNOS(-/-) mouse group however, a smaller number of these infiltrates were observed (4F).

DISCUSSION

Although EAE is considered a prototype for the T lymphocyte-mediated autoimmune model, the pathogenesis of this disease is very complex, and it is realized that other inflammatory cells, such as macrophages, microglia, and astrocytes, which produce nitric oxide (NO) contribute to the myelin damage. The present study has shown that the severity of EAE is significantly less in inducible nitric oxide synthase (iNOS) KO mice.

One important advance for the study of experimentally-induced demyelination has been the development of EAE in the resistant C57BL/6 mouse strain via immunization with MOG 35-55 peptide [23]. This permits the use of iNOS knockout C57BL/6 mice in the regulation of EAE, thus providing more accurate results than those obtained with iNOS inhibitors. In order to confirm the absence of iNOS production in such KO mice, macrophages from both these iNOS KO and WT mice were stimulated with LPS, and the absence of iNOS was investigated by western blotting analysis. Figure 1b clearly demonstrates that macrophages from iNOS^{-/-} mice did not produce much iNOS, even when activated by the LPS, whereas the WT controls produced larger amounts of this enzyme.

Apparently contradictory observations have accumulated from studies of iNOS in EAE, including the question of whether NO contributes to protective effects or to myelin damage and exacerbation of the disease; other studies have found no participation at all. T cell-mediated brain inflammation, however, is controlled at several levels and NO production could theoretically interfere at many different levels of the inflammatory cascade. For example, NO inhibits antigen presentation and consequent T-cell proliferation [24,25], but its inhibition can also inhibit the recruitment of both T cells and macrophages to a lesion [26,27], moreover, it can induce apoptosis of autoreactive T cells, thus limiting their activation [28]. In the present study, a significant reduction in the lymphocyte proliferative response to encephalitogenic peptides was observed when the lymphocytes from iNOS^{-/-} mice were evaluated during the acute phase of the disease; these

observations reinforced the idea of the participation of NO in the T cell-mediated inflammatory response.

Several studies have suggested that an excess of NO, which can be induced in macrophages/microglia and astrocytes, by iNOS, can lead to myelin damage, as well as blocking conduction in demyelinated axons, thus contributing to a loss of function. In the present paper, a delay in the onset of EAE, as well as a reduction in the severity of the disease was observed in iNOS KO mice. The NO association with inflammatory cytokines was also investigated. Evidence indicates that proinflammatory cytokines produced by either monocytes/macrophages, glia cells or Th1 lymphocytes, such as IFN γ and TNF α contribute to the demyelination process, whereas anti-inflammatory cytokines such as IL 4, IL 10 and TGF β contribute to remission of EAE [29]. No significant differences in relation to the production of cytokines such as IL1 and IL6 were observed in the lymph nodes of KO and WT mice in the acute phase of EAE, although these results contrasted with significant reduction observed in the production of these cytokines during the chronic phase of the disease. Cytokines such as IFN γ are known to induce the production of iNOS [29]. In this study, we have demonstrated that in EAE, lymph node cells from iNOS KO mice produce significantly less IFN γ , during the acute phase of the disease than do corresponding wild type controls; while the levels of IFN γ produced by the lymph node cells in these iNOS KO mice reach normal or higher levels during the chronic phase of EAE.

In WT mice with EAE, TNF α was produced in reduced quantities in lymph node cells, although in the CNS this quantity is greater. These results suggest that the TNF α -producing cells migrate from the peripheral organs to the CNS. The iNOS $-/-$ mice, however, produce practically no TNF α in the CNS, in the acute phase of the disease and this is associated with a reduction in the severity of the EAE. Even less TNF α was found in the CNS, during the chronic phase in both kinds of mice. These results show the importance of TNF α in the demyelinating process, which is in agreement with previous observations demonstrating increases

TNF α gene expression and production in the CNS tissues during the acute phase of EAE [30-32]. These present data show that TNF α and NO act synergistically in the causing of myelin damage, which is agreement with previous observations of the destruction of myelin and oligodendrocytes caused by these inflammatory mediators [30-32].

The reduction in proinflammatory mediators (TNF α) in the chronic phase of EAE found in this paper are in agreement with those demonstrating a decrease in gene expression of iNOS, and the proinflammatory cytokines known to induce iNOS during this phase of the disease [32, 33]. These observations can be explained by the increase in immunoregulatory cytokines such as TGF β , IL4 and IL 10 previously reported in the recovery phase of EAE, since such cytokines are known to inhibit activation of the macrophages/microglia and the production of NO [34,35], with a consequent reduction of the severity of EAE.

Taken together, the evidence provide here suggests a pathogenic role for NO in association with TNF α in the development of EAE. These results suggest that the production of NO and TNF α are intimately associated. On the one hand, proinflammatory cytokines induce NO production and amplify the inflammatory response, while on the other, in the absence of NO, as a consequence, proinflammatory cytokine production it self, is diminished, resulting in a reduction in demyelinating lesions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support from FAPESP (grant # 01/12827-0); CNPq (grant 300375/84-87) and FAEP-UNICAMP; the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript and of Gislaine C. L. Brito for the technical assistance provided are also recognized.

REFERENCES

- [1] B.H. Waksman, Demyelinating disease: evolution of a paradigm, *Neurochem Res.* 24 (1999) 491-495.
- [2] G.C. Suvannavejh, M.C. Dal Canto, L.A. Matis, S.D. Miller, Fas-mediated apoptosis in clinical remission of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 223-231.
- [3] V.K. Kuchroo, C.A. Martin, J.M. Greer, S.T. Ju, R.A. Sobel, M.E. Dorf, Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis, *J. Neuroimmunology* 151 (1993) 4371-4382.
- [4] B.L. McRae, M.K. Kennedy, L.J. Tan, M.C. Dal Canto, S.D. Miller, Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein, *J. Neuroimmunology* 38 (1992) 229-240
- [5] A.M. al-Sabbagh, E.P. Goad, H.L. Weiner, P.A. Nelson, Decreased CNS inflammation and absence of clinical exacerbation of disease after six months oral administration of bovine myelin in diseased SJL/J mice with chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Neurosci Res.* 45 (1996) 424-9..
- [6] J.E. Merrill, L.J. Ignarro, M.P. Sherman, J. Melimek, T.E. Lane, Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide, *J. Immunology* 151 (1993) 2132-2141.
- [7] L. Bo, T.M. Dawson, S. Wesselingh, S. Mork, S. Choi, P.A. Kong, Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains, *Ann Neurol.* 36 (1994) 778-786.
- [8] A.H. Cross, T.P. Misko, R.F. Lin, W.F. Hickey, J.L. Trotter, R.G. Tilton, Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice, *J. Clin Invest.* 93 (1994) 2684-2690.

- [9] O. Bagasra, F.H. Michaels, Y.M. Zheng, L.E. Bobroski, S.V. Spitsin, Z.F. Fu, R. Tawadros, H. Koprowski, Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995) 12041-12045.
- [10] D.C. Hooper, S.T. Ohnishi, R. Kean, Y. Numagami, B. Dietzschold, H. Koprowski, Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995) 5312-5316.
- [11] T.P. Misko, J.L. Trotter, A.H. Cross, Mediation of inflammation by encephalitogenic cells: interferon gamma induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2, *J. Neuroimmunol.* 61 (1995) 195-204.
- [12] W. Zhao, R.G. Tilton, J.A. Corbett, M.L. McDaniel, T.P. Misko, J.R. Williamson, A.H. Cross, W.F. Hickey, Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase, *J Neuroimmunol.* 64 (1996) 123-133.
- [13] M. Ding, M. Zhang, J.L. Wong, N.E. Rogers, L.J. Ignarro, R.R. Voskuhl, Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice, *J. Immunol.* 160 (1998) 2560-2564.
- [14] J. Zielasek, S. Jung, R. Gold, F.Y. Liew, K.V. Toyka, H.P. Hartung, Administration of nitric oxide synthase inhibitors in experimental autoimmune neuritis and experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol.* 58 (1995) 81-88.
- [15] S.R. Ruuls, S. Van Der Linden, K. Sontrop, I. Huitinga, C.D. Dijkstra, Aggravation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by administration of nitric oxide (NO) synthase inhibitors, *Clin Exp Immunol.* 103 (1996) 467-474.
- [16] D.P. Gold, K. Schroder, H.C. Powell, C.J. Kelly, Nitric oxide and the immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis, *Eur J Immunol.* 27 (1997) 2863-2869.
- [17] W.B. Cowden, F.A. Cullen, M.A. Staykova, D.O. Willenborg, Nitric oxide is a potential down-regulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE, *J Neuroimmunol.* 88 (1998) 1-8.

- [18] C. Iadecola., Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link?, *Trends Neurosci.* 16 (1993) Jun; 206-214.
- [19] V.L. Dawson, T.M. Dawson, Nitric oxide in neuronal degeneration, *Proc Soc Exp Biol Med.* 211 (1996) 33-40.
- [20] J.A. Langermans, M.E. Van der Hulst, P.H. Nibbering, P.S. Hiemstra, L. Fransen, R. Van Furth, IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha, *J Immunol.* 148 (1992) 568-574.
- [21] S.A. Teixeira, G.M. Castro, F. Papes, M.L. Martins, F. Rogério, F. Langone, L.M.B. Santos, P. Arruda, G. de Nucci, M.N. Muscara, Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis, *Mol. Brain Res* 99 (2002) 27-25
- [22] T. Gaillard, A. Mulsch, H. Klein, K. Decker, Regulation by prostaglandin E2 of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages, *Biol Chem Hoppe Seyler.* 373 (1992) 897-902.
- [23] I. Mendel, N.K. de Rosbo, A. Bem-Nun, A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T-cell V β express of encephalitogenic T cells, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 1951-1959.
- [24] R.C. van der Veen, Nitric oxide and T helper cell immunity, *Internat. Immunopathology* 1 (2001) 1491-1500.
- [25] J.E. Albina and W.L. Henry, Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway, *J Surg Res* 50 (1991) 403-409.
- [26] S.C. Sicher, M.A. Vazquez and C.Y. Lu, Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide, *J Immunol* 153 (1994) 1293-1300.

- [27] P. Kubes, M. Suzuki and D.N. Granger, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 4651–4655.
- [28] U.K. Zettl, E. Mix, J. Zielasek, M. Stangel, H.P. Hartung and R. Gold, Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates in vitro, *Cell Immunol* 178 (1997) 1–8.
- [29] D.A. Young, L.D. Lowe, S.S. Booth, M.J. Whitters, L. Nicholson, V.K. Kuchroo, M. Collins. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 164 (2000) 3563-72.
- [30] K. Selmaj, C.S. Raine, B. Cannella, C.F. Brosnan, Identification of lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis Lesions, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 949-954.
- [31] K.W. Selmaj, C.S. Raine, Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro, *Ann Neurol* 23 (1988) 339-46.
- [32] Y. Pollak, H. Ovadia, E. Orion, J. Weidenfeld, R. Yirmiya, The EAE-associated behavioral syndrome: I. Temporal correlation with inflammatory mediators, *J Neuroimmunol* 137 (2003) 94-99.
- [33] M.Ahn, J.Kang, Y.Lee, K.Riu, Y.Kim, Y.Jee, Y.Matsumoto, T. Shin, Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha, *Neurosci Lett* 308 (2001) 41-44
- [34] D. Borderie, P. Hilliquin, A. Hernvann, H. Lemarechal, A. Kahan, C.J. Menkes, O.G. Ekindjian, Inhibition of inducible NO synthase by Th2 cytokines and TGFβ in Rheumatoid arthritic synoviocytes: Effects on nitrosothiol production, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 10 (2002) 1-12.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Clinical scores of EAE in mice iNOS KO and Wild type controls. The mice were immunized with MOG 35-55 peptide and the disease was evaluated (Figure1A). Identification of iNOS produced by macrophages stimulated or not with LPS, from both iNOS KO mice and Wt controls, using the Western blotting method (Figure1B).

Figure 2. Proliferative response of lymph node cells from iNOS KO mice and WT controls, stimulated with MOG 35-55 peptide and Concanavalin A evaluated by the ³H Thymidine uptake in the acute (Figure2A) and chronic phases (Figure 2B). The results are representative of eight experiments.

Figure 3. Production of cytokines in the supernatant of leukocytes stimulated with Con A or MOG 35-55 peptide. Lymph node cells from iNOS KO mice or WT controls in acute (Figure 3A) or chronic phase (Figure 3B) were stimulated *in vitro* and the cytokines production quantified in the supernatant using ELISA assay. The results are representative of eight experiments.

Figure 4. Production of TNF α on spinal cord section from iNOS KO mice and WT controls. Spinal cord sections were obtained from Wild type mice (A) and iNOS KO mice (B), during the acute and chronic phases of the disease (C and D respectively). The sections were staining using monoclonal antibody which identified TNF α . Identification of inflammatory infiltrates in the spinal cord from C57Bl/6 (WT) mice (E) and iNOS KO mice (F). Analysis performed by a double-channel Bio-Rad laser confocal system.

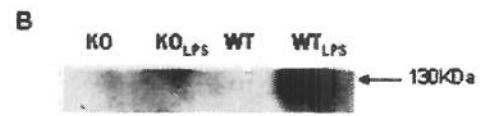
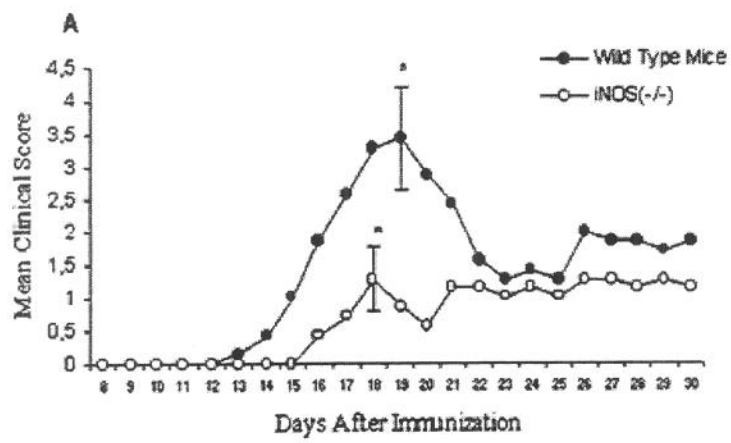


Figure 1.

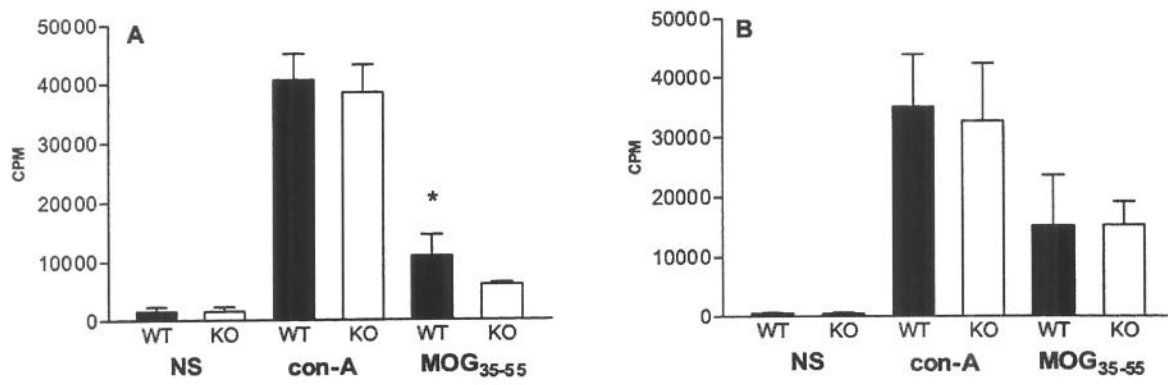


Figure 2.

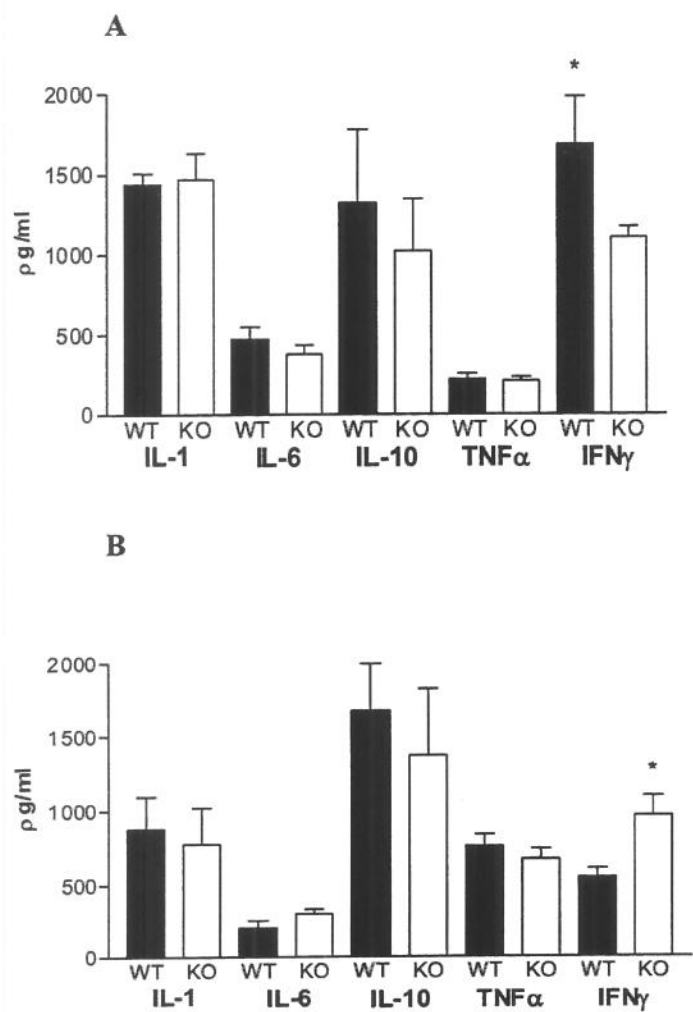


Figure 3.

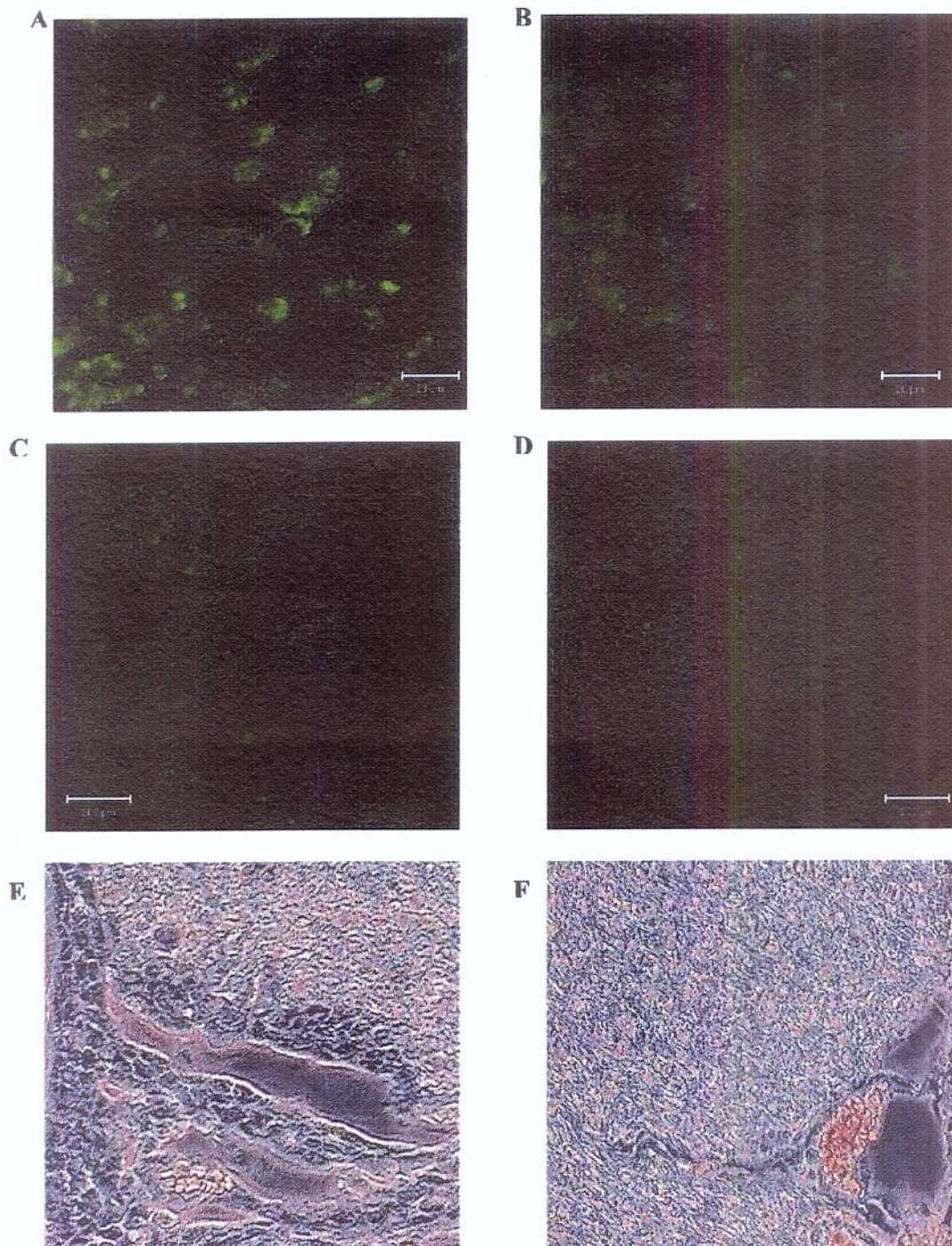


Figure 4.