

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Cristiane Lucia Rodriguez de la Hoz

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA iNOS E DO TNF-ALFA
NA EVOLUÇÃO DA NEURITE EXPERIMENTAL
AUTO-IMUNE EM RATOS LEWIS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Cristiane Lucia Rodriguez de la
Hoz
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Langone".

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone

Co-Orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Campinas
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D37e

De la Hoz, Cristiane Lucia Rodriguez
Estudo da participação da iNOS e do TNF-alfa na
evolução da neurite experimental auto-imune em ratos
Lewis / Cristiane Lucia Rodriguez de la Hoz. – Campinas,
SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Francesco Langone.
Co-orientadora: Leonilda Maria Barbosa dos Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Desmielinização. 2. Óxido nítrico. 3.
Imunofluorescência. 4. Macrófagos. 5. Sistema nervoso
periférico. I. Langone, Francesco. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: A study of iNOS and TNF-alpha participation in the evolution of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats.

Palavras-chave em inglês: Demyelination; Nitric oxide; Immunofluorescence; Macrophages; Peripheral nervous system.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Francesco Langone, Áureo Tatsumi Yamada, Elaine Conceição de Oliveira, Heloísa Helena Ruocco, Amilton Antunes Barreira.

Data da defesa: 17/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 17 de agosto de 2007.

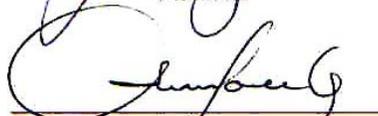
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada



Assinatura

Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira



Assinatura

Profa. Dra. Elaine Conceição de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Heloísa Helena Ruocco



Assinatura

Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura

“A educação permite o conhecimento que jamais nos poderá ser tirado, enriquece professores e alunos, se confunde com sua linguagem, mas nos torna livres para transformar nossas vidas em algo inesquecível”.

“A ciência que almejo não agrada a muitos, não é profissional, não pode ser pessoal e ultrapassa a tecnologia vigente. Mas ela atravessa meus sonhos, conquista minhas ações e, tenho certeza, é inigualável em sua capacidade de transformar o mundo e a nós mesmos em um unísono”.

*“Os tropeços me fizeram mais forte,
não sou hoje a mesma de ontem,
e por isso amanhã serei quem procuro dentro de mim”.*

*Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos,
por me ajudarem a ser uma pessoa cada vez mais feliz em busca de meus sonhos...*

O Rio Seco

Longo é o rio
cujo tempo
atravessam
os dias
e de súbito
toca
a margem
a alma
desfaz-se
liberta
da correnteza
e de tanta água
imensa
prosegue
a vida
e do rio
seco
gotas
únicas
gotas
são
lembranças
que tocam
a alma
e percorrem
a correnteza
dos olhos.

Ephraim Ferreira Medeiros

(Beijing, 02 de julho de 2007)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Francesco pelos ensinamentos desde a iniciação científica, há doze anos.

À professora Leonilda Barbosa dos Santos pela co-orientação e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos membros da banca pelas sugestões e questionamentos que permitem ao aluno aperfeiçoar-se cada vez mais.

Aos professores Áureo Yamada e Paulo Joazeiro por participarem de minha formação como pesquisadora.

Ao professor Hernandes F. Carvalho pelas sugestões, conselhos e apoio incondicional desde a graduação.

À professora Dagmar Stach-Machado por ceder-nos o anticorpo para macrófagos, por confiar no meu trabalho e por estimular-me a seguir adiante com a pesquisa.

Aos professores Dr. Fábio T. Maranhão e Kleber Franchini por disponibilizar-nos o microscópio de fluorescência e o microscópio confocal, respectivamente.

À professora Eneida de Paula por disponibilizar-nos os equipamentos para avaliação de nocicepção.

Ao prestativo biólogo Nilson Branco pelo suporte técnico quanto à microscopia de fluorescência.

À turma do laboratório de Neuroimunologia pelo apoio, confiança e compreensão nos momentos conturbados.

À turma do laboratório de Neurobiologia, Fernanda Pelagio, Débora, Fernanda Hussein, Alexandre, André Vieira, César, Gustavo e Fabio pelos momentos de descontração no laboratório e cafezinhos na cantina da Física.

Aos meus alunos da Abamba pelo carinho e paciência, e por contribuírem para meu aprendizado como professora.

Ao meu professor Beto, por confiar no meu trabalho e por me ajudar a me descobrir através da dança.

Às minhas amigas Fer, Eliana, Paty, Elaine, Marcinha, Deby, por estarem sempre ao meu lado, amizades recentes, porém eternas.

Às minhas amigas Mari, Sandy, Lau e Rê, amizades antigas para todos os momentos e para toda a vida.

Aos meus amigos que me aconselharam e me ajudaram.

À família Ferreira Medeiros pela torcida de sempre!

Aos meus cunhados Luis e Owen pelo apoio e ajuda fundamental na reta final!

À família De La Hoz no Chile que, mesmo longe, acompanhou todo meu trajeto ao longo do doutorado e me deu muito apoio.

A Ephraim, a quem eu devo muito do que me tornei hoje, por cuidar de mim e acreditar sempre no meu potencial, não me deixando desistir de ir atrás dos meus sonhos.

A Nando, por seu carinho, por me acompanhar nos momentos mais estressantes e me ajudar com sua tranquilidade e ponderação, mesmo quando tentava explicar questões complexas sobre Física.

Ao meu pai e minhas irmãs Carina e Mônica pelo carinho, apoio e confiança.

À minha mãe pelos seus cuidados, carinho, preocupação, sugestões e incentivo para terminar esta tese.

Ao curso de pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural pela excelente formação acadêmica.

À CAPES pela concessão da bolsa durante o curso de doutorado.

À UNICAMP pela minha formação na carreira acadêmica desde a graduação e por dar-me a oportunidade de conhecer tantas pessoas especiais.

E claro, à Unicamp e à sociedade, por um ensino público, gratuito e de qualidade.

ÍNDICE

Lista de tabelas.....	xvii
Lista de figuras.....	xix
Lista de abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Abstract.....	xxv
1. Introdução.....	01
2. Revisão Bibliográfica.....	07
2.1. Síndrome de Guillain-Barré (GBS).....	09
2.2. Neurite experimental auto-imune (EAN).....	13
2.2.1. Modelo experimental.....	13
2.2.2. Evolução clínica.....	15
2.2.3. Imunopatogênese.....	16
2.2.4. Alterações patológicas.....	18
2.2.5. A barreira hemato-nervosa (BNB) nas raízes espinhais, gânglios sensitivos e nervo periféricos.....	19
2.3. TNF- α	20
2.4. Óxido Nítrico (NO).....	22
2.4.1. As isoformas da NOS.....	23
2.4.2. NO e o processo degenerativo-regenerativo nervoso.....	24
2.4.3. NO e o sistema imune.....	24
2.4.4. NO e NOS na EAE, síndrome de Guillain-Barré e na EAN.....	25
3. Objetivos.....	27
4. Material e Métodos.....	31
4.1. Animais.....	33
4.2. Neuro-antígeno e indução da EAN.....	33
4.3. Avaliação da evolução clínica da EAN.....	33
4.4. Grupos experimentais.....	34
4.5. Processamento dos espécimes para histologia e imunoistoquímica.....	34
4.6. Histologia.....	36
➤ Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	36
➤ Histoquímica de Sudan Black.....	36
➤ Coloração com Azul de Toluidina.....	36
4.7. Imunoistoquímica de fluorescência.....	36
➤ Anticorpos.....	36
➤ Protocolo da imunoistoquímica.....	37

> Microscopia de fluorescência convencional e confocal.....	38
5. Resultados.....	39
5.1. Evolução clínica da EAN em ratos Lewis.....	41
5.2. Histologia.....	41
5.3. Imunofluorescência para iNOS e TNF- α	63
5.4. Imunofluorescência para iNOS e macrófagos (ED1 ⁺).....	79
5.5. Imunofluorescência para neurofilamentos em nervo ciático.....	83
6. Discussão.....	87
7. Conclusões gerais.....	99
8. Referências Bibliográficas.....	103
9. Anexos.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isoformas da sintase do óxido nítrico.....	23
Tabela 2. Anticorpos e marcadores utilizados na imunistoquímica de fluorescência..	37
Tabela 3. Avaliação qualitativa da presença de células inflamatórias / presença de bainha de mielina fragmentada.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.5.1 – Regiões analisadas do sistema nervoso periférico de rato Lewis.....	35
Figura 5.2.1 - Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis normais.....	46-47
Figura 5.2.2 - Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis na fase inicial dos sinais clínicos da EAN (G1).....	48-49
Figura 5.2.3 – Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis com grau 2 (G2).....	50-51
Figura 5.2.4 – Criocortes de raízes nervosas da cauda eqüina de ratos Lewis em grau 3 (G3).....	52-53
Figura 5.2.5 – Criocortes de raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar e de nervo ciático de ratos Lewis em grau 3 (G3).....	54-55
Figura 5.2.6 – Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis em fase de recuperação da EAN (R1).....	56-57
Figura 5.2.7 – Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis em fase de resolução da EAN (R0).....	58-59
Figura 5.2.8 – Mastócitos em nervo ciático de ratos Lewis dos grupos G2, G3 e R0.....	60-61
Figura 5.3.1 – Imunofluorescência para iNOS e TNF- α	66-67
Figura 5.3.2 – Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS e TNF- α em ratos Lewis normais do grupo controle e em fase inicial da EAN, grupo G1.....	68-69
Figura 5.3.3 – Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS e TNF- α em ratos Lewis paraplégicos do grupo G2.....	70-71
Figura 5.3.4 – Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS e TNF- α em ratos Lewis com paraparesia severa do grupo 3 (G3)	72-73
Figura 5.3.5 – Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS e TNF- α em ratos Lewis do grupo R1, durante a fase de recuperação, e do grupo R0, fase de resolução da EAN.....	74-75
Figura 5.3.6 – Evolução do surgimento e distribuição de células iNOS ⁺ / TNF- α ⁺ no SNP de ratos Lewis com EAN.....	77
Figura 5.4.1 - Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS e ED1 em ratos Lewis durante diferentes fases da EAN.	80-81
Figura 5.5.1 - Imunofluorescência com marcação para neurofilamentos (NF).....	84-85

Lista de abreviaturas

- AIDP – *Acute Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy* ou poliradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda
- AMAN – *acute motor axonal neuropathy* ou neuropatia axonal motora aguda
- AMSAN - *acute motor and sensory axonal neuropathy* ou neuropatia axonal motora e sensitiva aguda
- AT-EAN – *adoptive transfer of EAN* ou transferência adotiva da EAN
- BBB – *blood brain barrier* ou barreira hemato-encefálica
- BNB – *blood nerve barrier* ou barreira hemato-nervosa
- BSA – *Bovine Serum Albumin* ou albumina de soro bovino
- CE – cauda eqüina
- CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal
- CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
- CFA – *Complete Freund's Adjuvant* ou adjuvante completo de Freund
- CIDP - *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy* ou poliradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica
- Co n° – coccígeo n°
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- DABCO - *1,4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane* ou 1,4-diazabicyclo-(2.2.2)-octano
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole* ou 4',6-diamidino-2-fenil-indol
- DIC – *Differential Interference Contrast* ou contraste por interferência diferencial
- DNA - *deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico
- DRG – *Dorsal Root Ganglia* ou gânglios das raízes dorsais
- EAE – *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* ou encefalomielite experimental auto-imune
- EAN – *Experimental Autoimmune Neuritis* ou neurite experimental auto-imune
- eNOS – *Endotelial Nitric Oxide Synthase* ou isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico
- Fc receptor - fragment crystallizable receptor ou receptor para o fragmento cristalizável
- FITC – *fluorescein isothiocyanate* ou isotiocianato de fluoresceína
- GBS - *Guillain-Barré Syndrome* ou Síndrome de Guillain-Barré
- HE – hematoxilina e eosina
- HRP – *horseradish peroxidase* ou peroxidase de rabanete
- IFN- γ - *interferon gamma* ou intérferon gama
- IL – intumescência lombar
- IL-n° – interleucina-n°
- iNOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* ou isoforma induzível da sintase do óxido nítrico
- i.p. – intraperitoneal
- L n° – lombar n°
- L-NAME – L-nitro-arginina-metilester
- LPS - lipopolissacarideo
- MHC – *Major Histocompatibility Complex* ou complexo principal de histocompatibilidade
- MT – *Mycobacterium tuberculosis*

NAD - *Nicotinamide adenine dinucleotide* ou nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF - *Neurofilament* ou neurofilamento
NINDS - National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
NMMA - N-monometilarginina
nNOS - neuronal *Nitric Oxide Synthase* ou isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico
NO - *Nitric Oxide* ou óxido nítrico
O.C.T. - *Optimum Cutting Temperature*
PARP-1 - *poly (ADP-ribose) polymerase 1* ou poli-ADP-ribose polimerase 1
PBS - *Phosphate-Buffered Saline* ou solução salina em tampão fosfato
p.i. - pós-imunização
RNA - ribonucleic acid ou ácido ribonucleico
RNS - *Reactive Nitrogen Species* ou espécies reativas de nitrogênio
Sn° - sacral n°
SB - Sudan Black
SC - *Schwann Cell* ou células de Schwann
SNP - Sistema Nervoso Periférico
SP26 - *synthetic peptide with 26 aminoacids residues* ou peptídeo sintético com 26 resíduos de aminoácidos
SPF - *specific pathogen-free* ou livre de patógeno específico
T n° - torácico n°
TGF- β - Transforming Growth Factor Beta ou fator de crescimento e transformação beta
Th - *T helper cell* ou célula T auxiliadora
TNF- α - *Tumour Necrosis Factor-alpha* ou fator de necrose tumoral-alfa
TNFR - *Tumour Necrosis Factor-alpha Receptor* ou receptor para fator de necrose tumoral-alfa
TRITC - *tetramethyl-rodamine isothiocyanate* ou isotiocianato de tetrametil-rodamina

RESUMO

A isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) estão envolvidos em processos inflamatórios desmielinizantes como a síndrome de Guillain Barré e seu modelo animal, a neurite experimental auto-imune (EAN). A presença dessas moléculas foi investigada no sistema nervoso periférico de ratos Lewis em diferentes fases da EAN. Raízes nervosas oriundas dos segmentos medulares torácico 12 (T12) a lombar 3 (L3) (raízes adjacentes à intumescência lombar), cauda eqüina e nervos ciáticos foram coletados e processados para dupla imunofluorescência. Paralelamente, esses espécimes foram analisados quanto à desmielinização e degeneração axonal, por meio de histoquímica de Sudan Black e imunofluorescência para neurofilamentos, respectivamente. Todos os animais com EAN apresentaram células inflamatórias com imunorreatividade para iNOS e TNF- α , correspondendo a macrófagos e polimorfonucleares (neutrófilos). Essas células contendo iNOS e TNF- α foram observadas nos ratos Lewis exibindo os primeiros sinais clínicos da EAN. Sua população tornou-se numerosa durante a fase de agravamento do quadro clínico, diminuiu no decorrer da fase de recuperação e não foi observada nos animais clinicamente recuperados. Conforme o estágio da EAN, essas células contendo iNOS e TNF- α foram encontradas nas diferentes regiões nervosas analisadas. No início dos sinais clínicos observou-se algumas células iNOS/ TNF- α -imunorreativas em vasos da cauda eqüina e do nervo ciático. Na fase em que os animais apresentaram paraparesia, houve um aumento dessa população celular ao redor de vasos e infiltrados inflamatórios nos gânglios sensitivos, na cauda eqüina e nas raízes nervosas T12-L3. Alterações na bainha de mielina e nos neurofilamentos não foram detectadas. Com a evolução da EAN, os animais desenvolveram paraparesia severa. Nesta fase, numerosas células com imunorreatividade para iNOS e TNF- α distribuíram-se ao redor de infiltrados inflamatórios e no tecido endoneural das raízes espinhais e do nervo ciático. Próximo às regiões de infiltrado, algumas fibras nervosas apresentaram bainha de mielina fragmentada ou mais delgada. Alguns axônios no nervo ciático exibiram imunomarcagem dos neurofilamentos menos intensa, fragmentada ou aglomerada. Na fase de recuperação, raras células iNOS/ TNF- α -imunorreativas foram encontradas em vasos das raízes nervosas T12-L3 e do nervo ciático. Em algumas raízes da cauda eqüina, essas células foram observadas em maior número. O auge da desmielinização foi verificado no nervo ciático nesse estágio, com a presença de vários fragmentos e ovóides de mielina. Os neurofilamentos imunomarcados, por sua vez, apresentaram-se contínuos, porém mais

delgados do que os normais. Na fase de resolução da EAN não foram evidenciadas células duplamente imunorreativas. A bainha de mielina recobrou seu aspecto normal nas raízes nervosas, enquanto que no nervo ciático, bainhas de mielina e neurofilamentos imunomarcados delgados foram observados em meio a bainhas e imunomarcção de neurofilamentos mais grossas.

Nossos resultados sugerem uma correlação entre a presença da iNOS e TNF- α nas diferentes regiões nervosas e os sinais clínicos exibidos pelo animal com EAN. Além disso, o acentuado processo desmielinizante que ocorre no nervo ciático é capaz de promover alterações estruturais nos neurofilamentos, provavelmente afetando o funcionamento normal dos axônios.

ABSTRACT

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are involved in inflammatory processes such as Guillain Barré Syndrome and its animal model, Experimental Autoimmune Neuritis (EAN). In this study, the presence of these molecules was investigated in the peripheral nervous systems of Lewis rats at different stages of EAN. Thoracic 12 (T12) to lumbar 3 (L3) spinal roots adjacent to lumbar intumescence, *cauda equina* and sciatic nerves were obtained and processed for double immunofluorescence. These specimens were also analyzed for myelin and axonal degeneration using Sudan Black histochemistry and neurofilament immunolabelling, respectively. All the immunized animals showed double iNOS and TNF- α immunoreactivity in inflammatory cells such as macrophages and polymorphonuclears (neutrophils). These cells were observed in Lewis rats exhibiting the first clinical signs of EAN. Their population increased during the worsening of the disease, diminished during the recovery phase and had disappeared completely in clinically recovered rats. Depending on the EAN phase, iNOS and TNF- α bearing cells were found in the different regions of peripheral nervous system analyzed. At the onset of clinical signs, some iNOS and TNF- α immunoreactive cells were observed in vessels of the *cauda equina* and the sciatic nerve. In mildly paraparetic rats, an increase in the amount of these cells around vessels and inflammatory infiltrates in the dorsal root ganglia, *cauda equina* and T12-L3 spinal roots was observed. Changes in the myelin sheath and neurofilaments were not detected. As the EAN evolved, the rats developed severe paraparesis. At this stage, numerous iNOS and TNF- α bearing cells were observed around inflammatory infiltrates and in the endoneurium of the spinal roots and the sciatic nerve. Some nerve fibers near to infiltrated regions showed a thinner or even fragmented myelin sheath. Some sciatic nerve axons exhibited a less intense, fragmented or clustered neurofilament immunolabelling. During recovery stage, rare iNOS/ TNF- α immunoreactive cells were detected in vessels of T12-L3 spinal roots and the sciatic nerve. An increased number of these cells was observed in some nerve fibers of *cauda equina*. The peak stage of demyelination was verified in the sciatic nerve by the presence of several myelin ovoids. Neurofilaments showed continuous immunolabelling, but were more slender than the neurofilaments in naïve rats. Double-immunoreactive cells were not evidenced during the recovery stage. In nerve roots, the myelin sheath recovered its normal appearance, while in sciatic nerves, slenderer myelin sheaths and immunolabelled neurofilaments were

observed among thicker ones. Our results suggest that there is a close association between the presence of iNOS and TNF- α bearing cells in the various regions of the peripheral nervous system and the clinical signs exhibited by the animals. Furthermore, the acute demyelinating process in sciatic nerves also promotes structural changes, probably affecting the normal functioning of axons.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A neurite experimental auto-imune (EAN) é um modelo animal da Síndrome de Guillain Barré (GBS) que acomete o ser humano, ambas de caráter inflamatório e desmielinizante do sistema nervoso periférico (SNP) (WAKSMAN e ADAMS, 1955). A EAN pode ser induzida em espécies susceptíveis através da imunização ativa com homogenado de nervo periférico ou de mielina, com proteínas da mielina (P2 e P0) ou peptídeos sintéticos destas, ou ainda através de imunização passiva com a transferência de células T sensibilizadas a esses antígenos. De acordo com a concentração de mielina, peptídeos neuritogênicos ou de células T utilizadas na indução, a EAN pode apresentar diferentes características patológicas, por exemplo, quanto à gravidade ou predominância de alterações desmielinizantes ou degenerativas axonais. Essas diferentes características refletem aspectos imunológicos, morfológicos e eletrofisiológicos de formas variantes da GBS, o que torna a EAN um excelente modelo experimental na investigação dos mecanismos e de possíveis tratamentos para essa doença (HARTUNG, STOLL e TOYKA, 1993).

A EAN caracteriza-se pela infiltração de linfócitos e macrófagos nas raízes espinhais e nos nervos periféricos, onde acarretam o processo de desmielinização multifocal, predominantemente ao redor de vênulas. Trabalhos de microscopia eletrônica revelaram que os macrófagos ativamente separam as lamelas de mielina dos axônios, induzem a fragmentação vesicular da bainha de mielina e fagocitam tanto a mielina afetada como a que está intacta. O mecanismo pelo qual a interação inicial entre célula de Schwann/mielina e célula T acarreta a aderência dos macrófagos na superfície de bainhas de mielina individualmente não está completamente estabelecido (KIEFER et al., 2001).

Tanto na EAN como na GBS, a ativação de macrófagos dependente de células T-CD₄ é o principal mecanismo responsável que medeia a destruição da mielina. No desenvolvimento da EAN são produzidas citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo agravamento dos sinais clínicos e histopatológicos, assim como pela produção de citocinas com efeito anti-inflamatório que podem levar à resolução do processo patológico. O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que contribui na quebra da barreira hemato-nervosa na EAN, acarreta edema endoneural, acúmulo de leucócitos na parede dos vasos, degeneração axonal e desmielinização das fibras nervosas localizadas perivascularmente (HALL, REDFORD e SMITH, 2000; LIEFNER et al., 2000). Sua ação biológica é complexa e

depende da interação com seus dois receptores, TNFR1 e TNFR2. Atualmente, tratamentos experimentais com esses receptores na forma solúvel foram utilizados com intuito de impedir ou amenizar processos inflamatórios, entre eles a EAN ([TAYLOR e POLLARD, 2007](#)).

O TNF- α e outras citocinas consideradas pró-inflamatórias, como por exemplo, o IFN- γ , são capazes de induzir a expressão da isoforma induzível da enzima sintase do óxido nítrico (iNOS), que por sua vez produz altas concentrações de óxido nítrico (NO). O NO é capaz de interagir com radicais livres de oxigênio e formar diferentes espécies reativas com forte poder oxidativo. Dessa forma, através de seus derivados, o NO pode promover danos às proteínas, lipídeos de membrana, DNA e organelas sub-celulares, contribuindo também para o colapso energético e morte celular. O NO medeia vários processos biológicos, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e citotoxicidade ([BORDERIE et al. 2002](#)), sendo produzido em diversos tipos celulares como: condrócitos, células endoteliais, macrófagos, células gliais e outros. Ele também parece exercer um papel fundamental na regulação da resposta imune ([DAWSON e DAWSON, 1996](#), [BOGDAN, 2001](#)).

Alguns trabalhos apontam o efeito do NO sobre a resposta pró-inflamatória, principalmente mediada por citocinas como TNF- α e IFN- γ , e inibida por citocinas como IL-10 e TGB- β ([BORDERIE et al., 2002](#)). Estudos demonstraram que a indução de TNF- α é acompanhada pela indução de IFN- γ , assim como de óxido nítrico sintase (iNOS) e a conseqüente produção de NO ([WILLENBORG, STAYKOVA e COWDEN, 1999](#)). Por outro lado, o NO também pode atuar no processo anti-inflamatório, controlando a proliferação celular. No caso da encefalomielite auto-imune experimental (EAE) a fase de remissão do modelo experimental parece estar relacionada à diminuição da população de linfócitos T auto-reativos. No modelo da EAN, é provável que esse mecanismo de controle também esteja presente. Dentro desse contexto, o NO tem ganhado importância e sua manipulação pode vir a tornar-se uma nova forma de tratamento para pacientes com lesões traumáticas ou com doenças neurodegenerativas periféricas ([REDFORD, KAPOOR e SMITH, 1997](#)).

Recentemente, alguns autores verificaram a expressão da iNOS em macrófagos, células de Schwann e linfócitos, nas raízes espinhais ventrais e no nervo ciático, ou no início dos sinais clínicos ou no pico da EAN. Contudo, seus resultados são controversos ([LEE e SHIN, 2002](#); [CONTI et al., 2004](#)).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento a respeito do envolvimento da iNOS e do NO na EAN, este estudo propõe-se a caracterizar imunistoquimicamente a presença

dessa isoforma em distintas regiões nervosas periféricas, nos diferentes estágios clínicos. Especificamente, serão analisadas as raízes nervosas originadas dos segmentos medulares torácico 12 a lombar 3, a cauda eqüina e o nervo ciático. Uma vez que o TNF- α está associado à indução de iNOS e à patogênese da EAN, sua presença nas diferentes regiões nervosas periféricas também será examinada. Concomitantemente, os processos desmielinizante e degenerativo axonal serão acompanhados por técnica histoquímica para lipídeos e imunofluorescência para neurofilamentos.

A melhor compreensão do contexto no qual a iNOS e o TNF- α estão inseridos na EAN contribui para a elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese e regulação de doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla e a GBS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Síndrome de Guillain Barré

Os aspectos clínicos de paralisia aguda ascendente foram descritos por diferentes autores, entre eles, Jean Baptiste Octave Landry de Thézillat em 1859 e Osler em 1892 (ASBURY, 1990). Com o advento da punção lombar por Heinrick Quincke em 1895, alguns aspectos laboratoriais da Síndrome de Guillain-Barré (GBS) foram explorados e permitiram uma descrição mais completa da doença. Em 1916, os médicos Georges Charles Guillain, Jean-Alexandre Barré e André Strohl verificaram que dois soldados com um quadro agudo de fraqueza muscular, parestesia e dor muscular apresentavam altos níveis de albumina no líquido cefalorraquidiano, sem estar acompanhado do aumento no número de leucócitos. Esta condição os levou a presumir que a doença teria origem infecciosa ou tóxica ainda desconhecida. Essa especulação duraria até meados da década de 50, quando um processo patológico com características semelhantes à GBS foi induzido em coelhos por WAKSMAN e ADAMS (1955), surgindo o modelo de neurite experimental auto-imune (EAN).

Entre 1976 e 1977, um grande aumento na incidência de casos de GBS ocorreu nos Estados Unidos durante a campanha de vacinação em massa contra gripe, resultando na sua interrupção. Após esse episódio e a pedido do “National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke” (NINDS), Asbury e colaboradores elaboraram orientações mais claras quanto aos critérios que deveriam ser adotados para o diagnóstico da GBS (ASBURY et al., 1978; ASBURY e CORNBLATH, 1990).

Esse e outros surtos de GBS no mundo alertaram os cientistas para a necessidade em se aprofundar as pesquisas sobre a GBS e os fatores que podem desencadeá-la, bem como estudar os mecanismos imunológicos e regulatórios envolvidos.

A Síndrome de Guillain-Barré (GBS) é uma designação para um grupo de neuropatias periféricas agudas imuno-mediadas, cada uma com suas características especiais, clínicas e patológicas. Atualmente, a classificação da GBS abrange diferentes formas ou subtipos, determinados de acordo com o componente afetado no sistema nervoso (HUGHES e CORNBLATH, 2005). Entre os subtipos patológicos estão a:

- Poliradiculoneuropatia desmielinizante e inflamatória aguda (AIDP);
- Neuropatia axonal motora e sensitiva aguda (AMSAN), que afeta fibras nervosas motoras e sensitivas;
- Neuropatia axonal motora aguda (AMAN), quando a deficiência clínica neurológica é puramente motora;

- Síndrome de Miller Fisher, variante que afeta os nervos craniais.

O subtipo mais comum é a clássica forma desmielinizante AIDP. Na América do Norte e na Europa, a maioria dos pacientes apresenta esse subtipo, enquanto que somente 5% dos pacientes exibem os subtipos axonais da doença (HADDEN et al., 1998). No Brasil, um estudo epidemiológico mostrou também o predomínio da forma desmielinizante da GBS (SANTOS, 2000). Já no norte da China, Japão, América Central e alguns países da América do Sul (exceto Brasil), as formas axonais da GBS constituem 30 a 47% dos casos de GBS (McKHANN et al., 1991; McKHANN et al., 1993; PARADISO et al., 1999, OGAWARA et al., 2000).

A GBS é a principal causa de paralisia neuromuscular aguda, com incidência mundial de 1,3 a 2 casos em 100.000 por ano (GOVONI e GRANIERI, 2001). No Brasil, um estudo analisou a GBS em toda a população brasileira com menos de 15 anos de idade e mostrou uma incidência de 0,46 por 100.000 (DIAS-TOSTA e KUCKELHAUS, 2002). Outro estudo que incluiu indivíduos de várias idades mostrou que, entre 1987 e 1997, a incidência anual no Brasil variou de 0,24 a 1,91 casos em 100.000 habitantes (uma média de 1,06 casos por 100.000 por ano). Alguns autores relataram que a GBS afeta em média 1,5 vezes mais os homens do que as mulheres (GOVONI e GRANIERI, 2001). No Brasil essa relação se mantém, exceto no caso de pacientes com idade entre 41 e 50 anos, onde se verifica uma maior incidência de GBS nas mulheres (SANTOS, 2000). A incidência da GBS também varia conforme a idade dos indivíduos. Na Europa e América do Norte, a incidência em jovens com até 30 anos de idade é menor do que 1 caso em 100.000, enquanto que em idosos acima dos 75 anos, ela é de aproximadamente 4 casos por 100.000 (ALTER, 1990; para revisão ver HUGHES e CORNBLATH, 2005;). Assim, a incidência da GBS apresenta variações conforme a região e população estudadas, a idade e o sexo dos indivíduos afetados e os critérios de diagnóstico adotados nesses estudos.

Os critérios de diagnóstico da GBS foram primeiramente estabelecidos por Asbury e colaboradores em 1978 (ASBURY et al., 1978; ASBURY e CORNBLATH, 1990). As bases para o diagnóstico são descritivas e incluem critérios clínicos, laboratoriais e eletrofisiológicos. Duas características clínicas básicas são indispensáveis: a fraqueza motora progressiva em mais de um membro e a arreflexia (perda dos reflexos tendíneos) ou hiporreflexia. Entre os critérios que suportam fortemente o diagnóstico de GBS estão: a progressão rápida da fraqueza muscular (muitas vezes ascendente), a relativa simetria dessa fraqueza, a presença de suaves sintomas ou sinais relacionados à sensibilidade, o acometimento de nervos craniais, o início da recuperação entre 2 e 4 semanas após o

término da progressão, a ocorrência de disfunção autônoma (arritmias, hipotensão postural, hipertensão) e a ausência de febre no início dos sintomas neurais. Para corroborar o diagnóstico de GBS, uma punção lombar e o exame laboratorial do líquido revelam a presença de elevada concentração de proteínas (em 80% dos pacientes) e a ausência de reação celular (baixa contagem de leucócitos). Os testes neurofisiológicos são importantes para a confirmação da neuropatia periférica e o diagnóstico da GBS, principalmente no que se refere à classificação do subtipo de GBS (AIDP, AMSAN ou AMAN), embora não haja consenso nesses critérios. Estudos de condução motora e sensorial podem indicar desmielinização ou perda axonal (ASBURY e CORNBLATH, 1990, HUGHES e CORNBLATH, 2005).

A presença de eventos precedentes ao surgimento da síndrome de Guillain Barré é freqüente, mas não essencial ao diagnóstico. Entre os eventos mais comuns que precedem a GBS estão as infecções virais (Epstein Barr, Citomegalovirus), infecções do trato respiratório superior (*Mycoplasma pneumoniae*) e do trato gastro-intestinal (*Campylobacter jejuni*). Além disso, há relatos da associação da GBS com muitos eventos prévios, inclusive cirurgias e vacinações (anti-rábica, vacinas contra gripe).

A patogênese da típica GBS (AIDP) caracteriza-se pela infiltração multifocal de células mononucleadas no sistema nervoso periférico, no qual a distribuição da inflamação corresponde à deficiência clínica observada (ASBURY, ARNASON e ADAMS, 1969). Os macrófagos invadem a bainha de mielina intacta e acarretam a desnudação dos axônios. Uma hipótese é a de que os macrófagos são ativados por linfócitos T e direcionados a antígenos presentes na superfície das células de Schwann ou da bainha de mielina. A invasão inicial da membrana basal das células de Schwann é uma consequência da ação de metaloproteínases da matriz, de radicais tóxicos de óxido nítrico e de outros mediadores liberados pelos macrófagos ativados (CRÉANGE et al., 1999; KIESEIER et al., 2004). Outra hipótese é a de que no início da doença, anticorpos se ligam à superfície da célula de Schwann possibilitando a fixação do complemento. Isso provavelmente afetaria as células de Schwann, causando dissolução vesicular da mielina previamente à invasão celular (HAFFER-MACKO, 1996). No caso de lesões mais severas, os axônios também podem ser afetados provavelmente em consequência da ação de enzimas e radicais tóxicos liberados na resposta inflamatória direcionada contra a mielina (VAN DOORN, 2005).

Nos típicos casos de GBS, os primeiros sintomas são: dor (somente em crianças), parestesia, insensibilidade ou fraqueza nos membros. A fraqueza pode inicialmente ser

proximal, distal ou uma combinação de ambos. Os nervos faciais são às vezes afetados, e, menos freqüentemente, os nervos motores ocular e bulbar. Em 25% dos casos a fraqueza nos músculos respiratórios requer ventilação artificial. Em casos severos, os músculos sofrem fadiga após 2 semanas. Na maioria dos casos, a doença atinge seu ápice em 2 semanas. Com 4 semanas, praticamente todos os pacientes atingem esse grau. Após uma fase de estabilização de duração variável, a recuperação se inicia e transcorre no sentido próximo-distal, durando semanas ou meses. Cinco a 15% dos pacientes com GBS morrem e quase 20% ficam inabilitados. Mesmo nos pacientes que apresentam uma boa recuperação, os exames clínicos e eletrofisiológicos detectam fraqueza residual e perda de unidades motoras (DE LA COUR e JAKOBSEN, 2005). Cerca de 3% dos pacientes sofrem reincidência da fraqueza muscular e sensações de dormência muitos anos após o ataque inicial.

Atualmente, o tratamento da GBS (principalmente a do subtipo AIDP) inclui imunoterapias como a plasmáfereze, a troca de plasma e a injeção intravenosa de altas doses de imunoglobulinas. Apesar dos mecanismos de ação não estarem bem esclarecidos, essas imunoterapias são capazes de reduzir a gravidade e a duração da GBS quanto mais precocemente forem aplicadas (BRETTLE et al., 1978; MCKHANN et al., 1988; MCKHANN, 1990; DALAKAS, 2004; HUGHES et al., 2007).

O tratamento da GBS também requer a aplicação de um programa de reabilitação multidisciplinar que inclua métodos terapêuticos físicos e ocupacionais, além de acompanhamento psicológico. Organizações como “The GBS/CIDP Foundation International” nos Estados Unidos e “Guillain Barré Syndrome Support Group” no Reino Unido também beneficiam o paciente oferecendo orientação e informações disponibilizadas em suas páginas da internet (<http://www.gbsfi.com/> e <http://www.gbs.org.uk/>, respectivamente).

Apesar do monitoramento dos pacientes com GBS e dos bons resultados das imunoterapias, essas práticas ainda não são suficientes. A persistência das taxas de mortalidade e os sintomas e deficiências residuais nos demais pacientes ressaltam a necessidade de novas formas de tratamento. Para isso, é importante que novas pesquisas possam identificar os mecanismos imunopatogênicos que atuam na GBS e em seus diferentes subtipos (HUGHES et al., 2007).

2.2. Neurite experimental auto-imune (EAN)

2.2.1. Modelo experimental

Em 1955, Waksman e Adams descreveram a indução experimental de um processo inflamatório e monofásico que afetava o SNP de coelhos e denominaram-no neurite experimental alérgica (atualmente, neurite experimental auto-imune ou EAN). Uma emulsão preparada com homogenado de nervo periférico e outros tecidos nervosos (homólogos e heterólogos) foi injetada em coelhos. Após um período latente de cerca de 2 semanas, observou-se ataxia (perda de coordenação motora) e fraqueza muscular nos membros (paresia), culminando em paralisia. A análise patológica mostrou a desmielinização nos nervos periféricos dos animais doentes e a presença de infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos e macrófagos. A partir desses resultados, os autores ressaltaram a analogia entre a EAN e a GBS e forneceram evidências favorecendo a teoria de que a GBS teria uma base auto-imune ([ASBURY, 1990](#)).

A EAN é amplamente utilizada como modelo animal na investigação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da GBS, pois se assemelha a ela em vários aspectos clínicos, histopatológicos, imunológicos e eletrofisiológicos (para revisão ver [HAHN, 1996](#)). Clinicamente, a EAN caracteriza-se pelos animais apresentarem ataxia, paresia ou mesmo paralisia, como mencionado anteriormente. Nos animais com EAN, o nível protéico no líquido é elevado e geralmente não há reação celular, assim como ocorre na maioria dos casos em humanos com GBS do subtipo AIDP. Histopatologicamente observa-se infiltrados perivenulares de células T, monócitos e polimorfonucleares. Esses infiltrados são detectados nas raízes nervosas, nos gânglios das raízes dorsais e nos nervos periféricos. Próximo aos infiltrados ocorre uma acentuada degradação da mielina, que se apresenta na forma de segmentos ou ovóides de mielina em degeneração. Após a destruição da mielina, segue-se o período de remielinização. A mielina formada é mais fina do que a que foi degradada e a distância internodal é mais curta.

A EAN pode ser induzida em espécies susceptíveis por meio de imunização ativa com homogenado de nervo periférico, mielina, proteínas da mielina (P2 e P0) e peptídeos sintéticos de P2, ou ainda via imunização passiva com a transferência de células T sensibilizadas a esses antígenos. As variações quanto à forma de indução desse modelo experimental e quanto ao tipo e concentração dos componentes neuritogênicos resultam em diferentes padrões de evolução e gravidade da EAN. Este aspecto é importante, pois permite o estudo de variações no modelo experimental que podem refletir as formas variantes ou subtipos da GBS ([HARTUNG et al., 1988](#)).

A proteína P2 da mielina é muito conservada entre as espécies, mas sua quantidade e distribuição no SNP variam conforme a espécie analisada (GREENFIELD, BROSTOFF e HOGAN, 1980). Em nervos de rato e boi, por exemplo, a proteína P2 corresponde respectivamente a 2% e 15% do total das proteínas. No homem e nos coelhos há maior quantidade de P2 nas raízes ventrais do que nas raízes dorsais, enquanto que no rato e na cobaia, ambos os tipos de raízes possuem a mesma quantidade. No homem e nos coelhos há menos P2 nos nervos periféricos do que nas raízes ventrais, enquanto que no rato e na cobaia, a quantidade de P2 é a mesma no nervo e nas raízes. A proteína P2 está presente na medula espinhal de coelhos e traços de P2 também são encontrados na medula do homem e da cobaia. Nos ratos, essa proteína não está presente na medula espinhal. Essa distribuição topográfica de P2 coincide com a observação de lesões da EAN na medula espinhal de coelhos, em menor proporção na medula de cobaias, e a ausência de lesões na medula espinhal de ratos. No homem, a distribuição das lesões não está totalmente relacionada com a distribuição de P2 (ARNASON E SOLIVEN, 1993).

Brostoff e colaboradores (1977, 1980) verificaram que peptídeos de P2 com pequenas seqüências de aminoácidos exibiam ação neuritogênica ou encefalitogênica, dependendo da espécie inoculada. No rato, o determinante neuritogênico com maior atividade corresponde aos resíduos de aminoácidos 53 e 78 (ROSTAMI et al., 1990). Em muitos trabalhos que utilizam o rato Lewis como modelo para EAN, os animais são imunizados com a injeção da proteína P2 ou de um peptídeo de P2. HAHN e colaboradores (1991) compararam aspectos clínicos e histopatológicos em animais imunizados com peptídeo sintético SP26 da proteína P2 em quatro diferentes concentrações: 25, 50, 75 e 100µg/ animal. De acordo com seus resultados, baixas doses do peptídeo acarretam uma neurite mais suave e predominantemente desmielinizante. Ao contrário, altas doses resultam em paralisia severa de progressão rápida e com a ocorrência de degeneração axonal. Observações semelhantes foram feitas para o modelo de transferência adotiva da EAN, onde a patologia do nervo variou conforme a concentração utilizada de células T sensibilizadas (IZUMO et al., 1985; HEININGER et al., 1986).

O termo imunização ativa é utilizado quando a EAN é induzida através da injeção de algum componente da mielina. Outra forma de indução é denominada imunização passiva ou transferência adotiva da EAN (AT-EAN). Esta forma consiste em transferir para um animal saudável, células T reativas específicas a P2 obtidas de um outro animal previamente inoculado com as proteínas da mielina P2 ou P0 (LININGTON et al., 1984;

LININGTON et al., 1992). O animal que recebe as células T desenvolve a EAN com algumas características diferentes dos animais imunizados ativamente. Primeiramente, a evolução clínica é mais rápida na AT-EAN. Os sinais clínicos iniciam-se por volta do 4^o-5^o dia após a imunização e atingem o maior grau (fase de pico) no 6^o-9^o dia. Além disso, a AT-EAN com altas concentrações de células T se caracteriza pelo predomínio de degeneração axonal à desmielinização (IZUMO et al., 1985; HAHN et al., 1988; POWELL et al., 1991).

A AT-EAN constitui uma forte evidência do envolvimento das células T auto-reativas na imunopatogênese da EAN. No entanto, alguns trabalhos indicam também que a imunopatogênese da EAN envolve a ação sinérgica de células T e de anticorpos específicos para mielina (HAHN et al., 1993; SPIES et al., 1995). Com base nesses estudos, outra forma de AT-EAN utiliza a transferência de células B e T obtidas a partir de linfonodos de animais imunizados com mielina de nervo periférico (TAYLOR e POLLARD, 2001). Neste modelo, as alterações eletrofisiológicas se assemelham às observadas na AIDP, indicando um maior grau de desmielinização das fibras nervosas se comparado ao modelo de AT-EAN com células T somente (TAYLOR e POLLARD, 2003).

2.2.2. Evolução clínica da EAN

No rato Lewis, a evolução clínica da EAN apresenta um curso monofásico durante a qual os animais desenvolvem uma progressiva paralisia dos membros, de forma aguda, bilateral e ascendente. A manifestação dos primeiros sinais clínicos da EAN inicia-se a partir do 10^o dia pós-imunização (p.i.). Verifica-se a flacidez na cauda e a perda da coordenação motora durante a marcha. Geralmente, há uma repentina perda de peso nos animais no início do processo patológico e que aumenta conforme a gravidade do mesmo. A EAN avança e os membros pélvicos são afetados, enfraquecendo-se progressivamente. Dependendo da gravidade da EAN, os membros torácicos também são acometidos e tornam-se paréticos ou mesmo paralisados. A fase de pico culmina aproximadamente entre o 14^o e 19^o dia p.i. Após esse período, os animais apresentam uma recuperação clínica gradual e descendente, recuperando primeiramente a mobilidade dos membros torácicos, seguida dos membros pélvicos e finalmente, o tônus da cauda (HAHN et al., 1991; CASTRO et al., 2007).

Os estudos sobre EAN utilizam diferentes escalas e atribuições de graus aos diferentes sinais clínicos exibidos pelos animais doentes. Uma das escalas utilizada é mais simplificada e abrange 5 graus (STEVENS et al., 1989), podendo haver variações nas características clínicas abrangidas por cada grau. Outra escala utilizada por alguns

autores chegam até grau 10 e incluem aspectos clínicos mais específicos (PILARTZ et al., 2002). Esses aspectos, por exemplo, avaliam se o animal está menos ativo, se apresenta menor ou maior dificuldade em voltar à sua posição habitual (*righting reflex*) ou se a paraparesia é suave, moderada ou severa. Para melhor compararem os efeitos de certo tratamento nos animais com EAN, Felts e colaboradores (2002) utilizaram uma escala onde os animais receberam 1 ponto para cada sinal apresentado, em um total de 18 sinais descritos. Entre esses sinais podem ser citados: a perda de peso, a perda do tônus na ponta da cauda, a perda do tônus em toda a cauda, a paralisia da cauda, a perda da capacidade em espalmar os dígitos das patas posteriores, o lento retorno à posição normal quando colocado em decúbito dorsal, a incapacidade de retornar à posição normal, entre outros.

Ao mesmo tempo em que as escalas mais detalhadas fornecem características mais específicas do estado clínico em que se encontra o animal, elas geralmente não estão correlacionadas com exames patológicos ou laboratoriais. Além disso, não é incomum a sobreposição de sinais clínicos atribuídos para diferentes graus, o que dificulta a avaliação do animal. Dessa forma, escalas que utilizam maior número de graus clínicos nem sempre são menos subjetivas do que escalas mais simples e abrangentes. No entanto, a escolha apropriada da escala deve atender aos objetivos da investigação.

2.2.3. Imunopatogênese

Muitas evidências sugerem que a imunopatogênese da EAN, assim como sua evolução clínica, dependam da participação conjunta de células T, células B e macrófagos, associada à expressão de uma complexa rede de citocinas, temporalmente e espacialmente regulada (CRÉANGE et al., 1998; ZHU, MIX e LINK, 1998).

Após a inoculação, os antígenos da mielina são processados por macrófagos nos linfonodos próximos ao local injetado e apresentados aos linfócitos T através das moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

Os linfócitos T CD_4^+ ativados, independentemente de sua especificidade antigênica, patrulham o SNP e ao atravessar o endotélio, eles atuam localmente na quebra da barreira hemato-nervosa (BNB) (HAHN et al., 1993; POLLARD et al., 1995).

O tráfego das células T CD_4^+ ativadas através do endotélio vascular envolve o aumento de expressão gênica e a interação de moléculas de adesão celular na superfície das células endoteliais e de linfócitos (STOLL et al., 1993a; ARCHELOS et al., 1993). A expressão dessas moléculas de adesão é induzida por citocinas liberadas pelas células T

CD₄⁺ do tipo Th₁, especialmente o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (McCARRON et al., 1993). A degranulação de mastócitos endoneurais e a liberação de aminas vaso-ativas contribuem para o aumento da permeabilidade da BNB (BROSNAN et al., 1985). A perda da integridade da BNB permite que os anticorpos circulantes anti-mielina e anti-nervo atinjam seus alvos no endoneuro, resultando na interação sinérgica da imunidade humoral com a imunidade celular (HAHN et al., 1993; SPIES et al., 1995).

À medida que os linfócitos T migram para o endoneuro, eles liberam inúmeras citocinas, entre elas o IFN- γ e o TNF- α (HARTUNG et al., 1990; STOLL et al., 1993a). O IFN- γ , considerado uma citocina pró-inflamatória, possui múltiplos efeitos sobre diferentes células (ZHU et al., 1998; ZHU et al., 2004). Como mencionado anteriormente, o IFN- γ induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, facilitando o recrutamento e o influxo de células inflamatórias no microambiente do nervo, principalmente de macrófagos (STOLL et al., 1993a; McCARRON et al., 1993; CRÉANGE et al., 1998). O IFN- γ possui também outras ações imunoregulatórias, entre elas, a de estimular a produção de intermediários reativos do oxigênio e do óxido nítrico em macrófagos e a produção de TNF- α e IL-1 β em células mononucleadas e células de Schwann (ARMATI e POLLARD, 1996). O IFN- γ também induz ao aumento da expressão de moléculas MHC classe II em macrófagos e células de Schwann (BERGSTEINSDOTTIR, KINGSTON e JESSEN, 1992; GOLD, TOYKA e HARTUNG, 1995). A capacitação destas células como apresentadoras de antígenos via expressão de MHC II possibilita um aumento da sua interação com células T CD₄⁺, resultando na expansão clonal de linfócitos T auto-reativos e na amplificação da resposta imune local.

Os macrófagos constituem outra população celular com crítico envolvimento na EAN, atuando principalmente na sua fase de amplificação e na fase efetora. Através de sua interação com as células T CD₄⁺ e suas citocinas, os macrófagos são ativados, aumentam sua atividade fagocítica, produzem diversas citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), proteases e espécies tóxicas de oxigênio capazes de destruir a mielina (HARTUNG et al., 1992; BARON et al., 1993; ZHU, MIX e LINK, 1998). Além disso, estudos de microscopia eletrônica mostraram que os macrófagos ativados são capazes de se aderir às fibras nervosas de aspecto normal e separar as lamelas de mielina dos axônios, induzindo a fragmentação vesicular da mesma e fagocitando tanto a mielina afetada, como a que está intacta (BALLIN e THOMAS, 1969). O mecanismo pelo qual os macrófagos são atraídos e se aderem à bainha de mielina intacta não é completamente conhecido. Uma hipótese

é a de que anticorpos circulantes se liguem aos seus epítomos antigênicos na célula de Schwann, ativando o sistema complemento com a deposição do complexo terminal de ataque à membrana (STOLL et al., 1991), o que resultaria na fragmentação vesicular da mielina e na atração de macrófagos ativados (GRIFFIN et al., 1992). Os macrófagos também podem ligar-se aos componentes do complemento depositados na célula de Schwann e na mielina através de seus receptores de superfície CR₃. Outra hipótese sugere que os macrófagos sejam direcionados à bainha de mielina através da ligação de seus receptores Fc aos anticorpos anti-mielina circulantes ou localmente produzidos.

Antes do início dos sinais clínicos da EAN, a maioria das células T expressa o fenótipo CD₄⁺ auxiliar (ZHU et al., 1998). Durante a resposta imune, as células T CD₄⁺ secretam certos tipos de citocinas que as diferenciam em subpopulações celulares do tipo Th₁ e Th₂ e torna-se evidente que a ativação diferencial destas populações celulares tem um papel crítico na indução e subsequente regulação das doenças auto-imunes órgão-específicas (KUCHROO et al. 1993; KUCHROO et al., 1995; NICHOLSON e KUCHROO, 1996). Os linfócitos T CD₄⁺ envolvidos na patogênese da EAN estão relacionados com o perfil de citocinas produzidas pela subpopulação do tipo Th₁, ou seja, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina IL-2, o interferon gama (IFN γ) e o TNF- α (HARTUNG et al., 1990; SCHMIDT et al., 1992; STOLL et al., 1993b; ZHU et al., 1997). No decurso da EAN, verifica-se que a recuperação espontânea dos animais está correlacionada com o aumento na expansão de células Th₂ e o aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, entre elas a IL-4 e IL-10 (ZHU et al., 1996; JANDER et al., 1996; BAI et al., 1997; ZHU et al., 2004), além do TGF- β produzido por células do tipo Th₂ (CHEN et al., 1994; ZHU et al., 1998).

2.2.4. Alterações patológicas

No rato em fase inicial da EAN, o edema das raízes nervosas da cauda equina e do nervo ciático está entre as primeiras alterações morfológicas observadas por meio de microscopia eletrônica. Dois dias depois, as leptomeninges estão infiltradas por linfócitos. Com a evolução da EAN são observados populosos aglomerados de mononucleares perivenulares distribuídos em vários focos nas raízes espinhais e nervos. Muitos macrófagos estão presentes dentro dos tubos de membrana basal das células de Schwann, onde ativamente desnudam e degradam a mielina. Macrófagos carregados de conteúdo lipídico são observados fora dos tubos de células de Schwann e se concentram ao redor de pequenas vênulas. Na fase de pico da EAN, o processo inflamatório nas raízes

nervosas começa a amenizar-se. Há poucos linfócitos infiltrados, enquanto que macrófagos contendo pequenas gotículas lipídicas estão reunidos ao redor de vasos endoneurais. Concomitantemente são observados também axônios em início de remielinização, com poucas camadas de lamelas compactadas de mielina. No nervo ciático, algumas fibras em degeneração axonal aguda são encontradas dispersas. Uma semana depois, com os animais já em fase de recuperação avançada, os linfócitos e macrófagos desapareceram (HAHN, et al., 1991; ARNASON e SOLIVEN, 1993).

2.2.5. A barreira hemato-nervosa (BNB) nas raízes espinhais, gânglios sensitivos e nervos periféricos

O suprimento sanguíneo dos nervos periféricos se caracteriza pela presença de dois sistemas vasculares separados e funcionalmente independentes, mas com extensas anastomoses entre si: um sistema extrínseco e outro intrínseco. O sistema extrínseco é formado pelas artérias nutrícias regionais ou arteríolas e vênulas, juntamente com os vasos epineurais. O sistema intrínseco consiste em micro-vasos longitudinais dentro do endoneuro fascicular. Os vasos epineurais e perineurais servem de ponte na anastomose que interconecta esses dois sistemas (para revisão ver McMANIS, LOW e LAGERLUND, 1993). A BNB que protege o microambiente endoneural desse compartimento vascular é constituída pelas múltiplas camadas do perineuro e pelo endotélio vascular endoneural. O perineuro é uma bainha conjuntiva compacta que envolve os fascículos nervosos, formada por camadas concêntricas alternadas de tecido conjuntivo denso ordenado e células perineurais. Estas células de perfil poligonal e achatado estão unidas por junções de oclusão e possuem uma membrana basal aniônica, restringindo a passagem de proteínas, solutos e eletrólitos para o endoneuro, havendo mecanismos específicos de transporte vesicular, facilitado e ativo. As células endoteliais dos capilares endoneurais apresentam junções de oclusão em um único local de aposição, diferentemente do endotélio que forma a barreira hemato-encefálica (BBB). A face interna desses capilares (glicocálice endotelial) possui glicoconjugados contendo ácido siálico carregado negativamente, formando uma barreira eletrostática que repele moléculas de mesma carga (OLSSON, 1968; para revisão também ver HO, McKHANN e GRIFFIN, 1998).

Os gânglios sensitivos são envoltos por uma cápsula conjuntiva que inclui uma camada de células contínuas com a camada mais interna do perineuro das raízes e nervos adjacentes. Essa camada é impermeável à passagem de proteínas marcadoras aplicadas na superfície do gânglio. No entanto, alguns dos vasos sanguíneos presentes dentro dos

gânglios apresentam endotélio fenestrado, permitindo a difusão de marcadores fluorescentes injetados endovenosamente para o espaço extracelular dos gânglios sensitivos (REALE, LUCIANO e SPITZNAS, 1976; para revisão ver KIERNAN, 1996).

Rosen e colaboradores (1990) observaram que a BNB nas raízes espinhais é mais permeável aos constituintes séricos do que os nervos periféricos. Outros autores mostraram também que os capilares das raízes nervosas espinhais são permeáveis às proteínas marcadoras, inclusive mais permeáveis do que as regiões mais distais do nervo (porções pré-terminais axonais na pele e no músculo). A bainha das raízes nervosas, embora anatomicamente contínua com a pia-aracnóide e com o perineuro, mostrou-se permeável às proteínas marcadas com fluoróforos, HRP e íons lantânio (KIERNAN, 1996).

O envoltório nas raízes nervosas consiste em:

- uma bainha externa contínua com a pia-máter que envolve a medula espinhal e com uma camada de células do perineuro na região periférica. Essa bainha consiste de células pouco associadas e com muito espaço entreposto que está em continuidade com o espaço sub-aracnóide e com componentes extracelulares de tecido conjuntivo;
- uma bainha interna contínua com o perineuro perifericamente; na extremidade oposta, essa bainha reveste uma membrana basal que recobre o endoneuro da raiz e termina próximo à junção da raiz nervosa com a medula central. As células que compõem esta bainha contêm muitas vesículas pinocíticas, são achatadas, fortemente associadas umas às outras e intermitentemente revestidas por uma lâmina basal (THOMAS, BERTHOLD E OCHOA, 1993).

2.3. TNF- α

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que vem sendo alvo de muitos estudos devido aos seus efeitos biológicos em lesões nervosas e seu envolvimento na patogênese de diferentes processos inflamatórios (VASSALLI, 1992; BARTEN e RUDDLE, 1994; HARTUNG et al., 1995; LIEFNER et al., 2000).

O TNF- α pode ser produzido por diferentes tipos celulares, principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células de Schwann (STOLL et al., 1993b; WAGNER e MYERS, 1996). Além de seu papel imunoregulatório na produção de outras citocinas, o TNF- α contribui na quebra da barreira hemato-nervosa através da indução de moléculas de adesão e atua no recrutamento e ativação de macrófagos (BARTEN e RUDDLE, 1994; REDFORD, HALL e SMITH, 1995; BAO et al., 2003; SHUBAYEV et al., 2006). Alguns autores

observaram que a injeção intraneural de TNF- α em nervo ciático de camundongos e ratos é capaz de acarretar edema endoneural, acúmulo de leucócitos nas paredes dos vasos endoneurais, degeneração axonal e desmielinização de fibras nervosas perivascularmente localizadas (SAID e HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, 1992; REDFORD, HALL e SMITH, 1995; UNCINI et al., 1999; HALL et al., 2000; LIEFNER et al., 2000).

Em relação à GBS, Radhakrishnan e seus colaboradores (2004) observaram que há uma positiva correlação entre a gravidade da doença e os elevados níveis séricos de TNF- α . Em ratos com EAN, Zhu e colegas (1997) verificaram a máxima expressão do RNA mensageiro dessa citocina nos estágios clínicos mais severos do processo patológico, seguida de uma gradual diminuição durante a fase de recuperação. Outro grupo de pesquisadores obteve grande redução na gravidade da EAN quando administrados anticorpos anti-TNF- α (STOLL et al., 1993b).

Outro aspecto da atuação do TNF- α está relacionado ao desenvolvimento de dor neuropática em diferentes modelos experimentais (LINDENLAUB et al., 2000; OHTORI et al., 2004; MYERS, CAMPANA e SHUBAYEV, 2006). A dor neuropática é definida convencionalmente como a dor gerada quando o nervo periférico ou os neurônios ganglionares e/ou medulares são afetados. Sensações de dor neuropática são relatadas em 55 a 85% dos casos de Síndrome de Guillain Barré (PENTLAND e DONALD, 1994; MOULIN et al., 1997), o que sugere sua presença também no modelo de EAN (HUGHES e CORNBLATH, 2005). Recentemente, MOALEM-TAYLOR e colaboradores (2007) verificaram que ratos imunizados com P2 apresentam hiperalgesia e alodinia, tornando a EAN um possível modelo experimental para estudo de dor.

Os diversos efeitos biológicos do TNF- α são mediados principalmente pela interação desta citocina com dois distintos receptores (TNFR) de superfície celular: TNFR-1 (ou p55) e TNFR-2 (ou p75) (TARTAGLIA, et al., 1993; MacEWAN, 2002). Ambos receptores possuem significativa homologia nos seus domínios extracelulares, porém, diferem quanto aos seus domínios citoplasmáticos, conduzindo à ativação de distintas cascatas de sinalização que resultam em efeitos distintos e geralmente opostos. O receptor tipo TNFR-1, expresso constitutivamente, liga-se preferencialmente ao TNF- α solúvel e está relacionado à maior parte das funções do TNF- α , incluindo morte celular e proliferação. O TNFR-2, caracterizado como um receptor induzível, liga-se principalmente às moléculas de TNF- α associadas à membrana e medeia mecanismos de neuroproteção (VANDENABEELE et al., 1995; LEDGERWOOD, POBER e BRADLEY, 1999; MYERS, CAMPANA e SHUBAYEV, 2006). Dependendo do complexo TNF-receptor formado,

pode ocorrer internalização ou liberação do mesmo. Em alguns casos, estes complexos são clivados por metaloproteinases e liberados como forma solúvel no soro e fluidos corpóreos (PORTEU et al., 1991). Dessa forma, os receptores solúveis de TNF podem agir como antagonistas do TNF- α , competindo pelo ligante com os receptores associados à membrana. Isso pode representar um mecanismo de controle da ação do TNF- α quando liberado na circulação (VAN ZEE et al., 1992; HUNGER et al., 1997). Alguns autores obtiveram bons resultados ao utilizar formas solúveis de TNFR com o intuito de inibir ou amenizar doenças e processos inflamatórios, entre eles a diabetes auto-imune (HUNGER et al., 1997), a artrite reumatóide (McCOMB et al., 1999), a EAN (BAO et al., 2003) e a encefalomielite auto-imune experimental (EAE, de patogênese análoga à EAN e que acomete o sistema nervoso central) (BAKER et al., 1994; SELMAJ e RAINE, 1995). No caso da EAN, a administração da forma solúvel de TNFR 1 resultou na melhora dos sinais clínicos e patológicos, diminuindo seu grau de gravidade, encurtando sua duração e reduzindo a infiltração de células inflamatórias no SNP (BAO et al., 2003).

Os receptores TNFR-1 e TNFR-2 estão presentes em vários tipos celulares, sendo detectados em células T CD4⁺ e CD8⁺ (WARE et al., 1991), em células de Schwann em humanos e em ratos normais (SKOFF et al., 1998; BONETTI et al., 2000), em axônios de nervo ciático de ratos e em neurônios dos gânglios das raízes dorsais após lesão nervosa (SHUBAYEV e MYERS, 2001; SCHÄFERS et al., 2003; OHTORI et al., 2004). Os receptores TNFR-2 são expressos principalmente em células endoteliais e células de origem hematopoiética (AGGARWAL, 2003).

2.4. Óxido nítrico (NO)

O NO é uma molécula gasosa de ampla atuação nos sistemas biológicos, atuando na sinalização ou como agente tóxico entre as células. Nos mamíferos, o NO é produzido por uma grande variedade de células, agindo fisiologicamente como vasodilatador, neurotransmissor e inibidor da agregação plaquetária. No sistema imune, ele é gerado durante as respostas inflamatórias, onde sua função é menos definida e muito complexa (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; COLEMAN, 2001). Por ser uma molécula gasosa, o NO se difunde facilmente do local onde é sintetizado e pode atuar em outras células.

A complexa ação biológica do NO resulta da formação de diferentes espécies reativas de nitrogênio (RNS), derivadas de interações com radicais livres biologicamente gerados, entre eles as espécies reativas de oxigênio. Uma das reações mais importantes, a combinação de altas concentrações do radical NO[•] com o ânion superóxido ([•]O₂⁻), tem

como produto o ânion peroxinitrito (ONOO^-). Esta molécula altamente reativa pode causar danos oxidativos a várias moléculas biológicas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além de também oxidar grupamentos tióis, nitrar resíduos de tirosina em proteínas, e causar danos à mitocôndria através da peroxidação lipídica (BOGDAN, 2001). Em altas concentrações e sob condições aeróbicas, o NO é rapidamente oxidado a espécies reativas de óxido de nitrogênio. Estas espécies são instáveis e podem nitrosilar rapidamente grupos amina e tióis. Em condições patológicas, o NO é capaz de ativar a enzima consumidora de NAD^+ , a poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) e levar ao colapso energético da célula e à neurotoxicidade (para revisão, ver MONCADA e BOLAÑOS, 2006).

2.4.1. As isoformas da NOS

O óxido nítrico (NO) é sintetizado pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), em uma reação de conversão da L-arginina em L-citrulina. Nessa reação, a NOS requer a presença de O_2 e também de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como doador de elétrons.

Experimentos de biologia molecular identificaram três genes codificando três isoformas diferentes da NOS, cada uma recebendo a denominação de acordo com o tecido a partir do qual os genes foram primeiramente clonados (para revisão ver STUEHR, 1996; DAWSON e DAWSON, 1996).

TABELA 1 – *Isoformas da sintase do óxido nítrico.*

Isoformas	NOS 1	NOS 2	NOS 3
<i>Denominação original</i>	Neuronal (nNOS) ou cerebral (bNOS)	Induzível ou imunológica (iNOS)	eNOS (endotelial)
<i>Localização</i>	Populações de neurônios bem definidas	Várias células quando estimuladas, incluindo hepatócitos, células musculares lisas, macrófagos, neutrófilos e células gliais	Endotélio vascular
<i>Ativação dependente de cálcio</i>	Sim	Não	Sim

As isoformas NOS1 e NOS 3 são constitutivamente expressas e são ativadas em resposta ao cálcio, por exemplo, com a chegada de um potencial de ação na terminação nervosa ou pela ativação dos receptores para acetilcolina nas células endoteliais. A ativação das enzimas nesse caso ocorre rapidamente e transitoriamente, de acordo com a cinética do sinal de cálcio. A NOS 2, por outro lado, não é ativada por cálcio, estando continuamente ativa uma vez expressa. Sua expressão pode ser induzida por vários agentes, entre eles o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou citocinas como intérferon-

gama, IL-1 ou TNF- α . Sua presença sustentada nas células acarreta a geração de grandes concentrações de NO, geralmente com efeito tóxico para a célula (COLEMAN, 2001).

2.4.2. NO e o processo degenerativo-regenerativo nervoso

Embora o envolvimento do NO nos processos degenerativos e regenerativos do sistema nervoso esteja bem estabelecido, sua ação biológica é muito discutida (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ e RUSTIONI, 1999, LEVY, KUBES e ZOCHODNE, 2001).

Em alguns trabalhos de degeneração e regeneração nervosa que utilizaram um modelo de constrição crônica por ligadura do nervo ciático, os autores propuseram que a presença das 3 isoformas da NOS no nervo ciático e em gânglios sensitivos e a conseqüente produção de NO teriam efeito benéfico sobre a regeneração axonal (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ e RUSTIONI, 1999). LEVY e colaboradores (2001) utilizaram diferentes tipos de lesão nervosa periférica (seção, esmagamento e constrição crônica) em camundongos mutantes “nocauteados” para a isoforma iNOS e verificaram um retardo tanto na degeneração quanto na regeneração nervosa. A ausência da iNOS e conseqüentemente do NO, teria retardado a degradação dos lipídios da mielina, inibindo o crescimento de neuritos. Dessa forma, os autores atribuíram ao NO produzido pela iNOS e suas espécies relacionadas, como o peroxinitrito, participação fundamental na peroxidação lipídica durante o processo degenerativo nervoso (ou degeneração Walleriana).

2.4.3. NO e o sistema imune

Dentre as várias funções do NO no sistema imune está sua atuação como: agente tóxico contra organismos infecciosos (HIBBS, 2002), indutor ou supressor de apoptose (KRÖNCKE et al., 2001) ou imunoregulador (BOGDAN, RÖLLINGHOFF e DIEFENBACH, 2000). Na maioria dos casos, a principal isoforma envolvida na produção de NO é a iNOS ou NOS 2 (COLEMAN, 2001). Muitas células expressam a iNOS: fibroblastos células endoteliais e epiteliais, keratinócitos e condrócitos, monócitos/macrófagos e células “natural killer”.

O NO pode exercer efeitos regulatórios, entre eles, inibir a função ou crescimento celular ou mesmo sendo anti-apoptótico. Alguns trabalhos mostraram que o NO produzido por macrófagos é capaz de inibir a proliferação de células T (para revisão ver LANGREHR, HOFFMAN e LANCASTER, 1993; VAN DER VEEN, 2001). Quando em maiores concentrações, o NO pode induzir a apoptose nas células T (VAN DER VEEN, 2001). O NO também é um

mediador da ação das células NK sobre as células-alvo e um regulador da função das próprias células NK (CIFONE, ULISSE e SANTONI, 2001). Outros trabalhos mostram que o NO inibe a ativação dos mastócitos (FORSYTHE et al., 2001; BIDRI et al., 2001) e podem aumentar ou inibir a ativação dos neutrófilos dependendo de sua concentração (ARMSTRONG, 2001).

O fato de o NO exercer uma combinação de efeitos tóxicos, regulatórios, apoptóticos e anti-apoptóticos em diferentes tipos de células, em diferentes estágios do processo inflamatório, dificulta a análise de sua função biológica nesses processos. Sua seletividade biológica é decorrente: de sua concentração e reatividade com outras moléculas, da proximidade com as células-alvo e do modo como a célula-alvo está programada para responder (COLEMAN, 2001).

2.4.4. NO e NOS na EAE, Síndrome de Guillain-Barré e na EAN

Na década de 80, alguns autores demonstraram que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podiam afetar a mielina por meio da peroxidação lipídica (CHIA, THOMPSON e MOSCARELLO, 1983; KONAT e WIGGINS, 1985, HOGG e KALYANARAMAN, 1999). A partir daí, foram realizados muitos estudos relacionando essas espécies reativas com o modelo de EAE. Em 1992, MacMicking e colaboradores demonstraram a participação do NO na EAE. Ainda na década de 90, outros autores detectaram a presença do RNA mensageiro para iNOS em tecido do sistema nervoso central de ratos Lewis com EAE (KOPROWSKI et al., 1993; SCOTT, WILLIAMS e BOLTON, 1996). Lin e colaboradores (1993) localizaram o NO na medula espinhal de camundongos com EAE através da formação do complexo Fe-NO. Eles verificaram que em todos os animais com EAE, o aumento na formação desses complexos estava correlacionado com o curso clínico do processo patológico. Hooper e colaboradores (1995) mostraram que grandes quantidades de NO na medula espinhal correlacionava-se com a paralisia dos membros posteriores de ratos Lewis com EAE. Teixeira e colaboradores (2002) analisaram a regulação da expressão e a atividade das isoformas da NOS no cérebro de ratos Lewis durante a EAE. Eles observaram que nos estágios mais severos desse modelo experimental, a atividade da NOS dependente de cálcio diminui, enquanto que a atividade da NOS independente de cálcio (iNOS) aumenta. Isso acarretaria um aumento na produção de NO e o aparecimento de proteínas contendo nitrotirosina no tecido nervoso central.

Estudos visando bloquear a produção de NO na EAE por meio da administração de inibidores das isoformas da NOS foram realizados por vários autores (CROSS et al., 1994;

ZHAO et al., 1996; BRENNER et al., 1997). Foi observado que dependendo do inibidor e das condições de tratamento, os sinais clínicos da EAE eram suprimidos ou amenizados. A partir desses estudos, tratamentos similares foram experimentados em animais com EAN (ZIELASEK et al., 1995).

Em 1997, Parkinson, Mitrovic e Merrill sugeriram que o NO também devesse ter uma participação na desmielinização da GBS, ao detectar a produção de grandes quantidades de NO em pacientes com GBS.

Somente em 2002, Lee e Shin analisaram por meio de imunistoquímica e imunoblotting, a presença das isoformas eNOS e iNOS no nervo ciático de ratos Lewis nos quais a EAN foi induzida. Seus resultados mostraram que a expressão de eNOS e iNOS aumentava significativamente no pico da EAN e diminuía após essa fase. As células produtoras da isoforma eNOS incluíam as células endoteliais e as células de Schwann, enquanto que a isoforma iNOS estava presente principalmente em macrófagos.

Dois anos depois, Conti e colaboradores (2004) utilizaram as técnicas de *Northern blotting*, imunistoquímica e imunocitoquímica para identificar a presença da iNOS em ratos com EAN. Na fase inicial dos sinais clínicos da EAN, eles detectaram a proteína iNOS e o seu RNA mensageiro em células de Schwann, macrófagos e linfócitos localizados nas raízes ventrais, mas não no nervo ciático. No mesmo trabalho, esses autores investigaram a presença da iNOS no nervo ciático em degeneração Walleriana após sua secção e não obtiveram nenhuma evidência positiva, contrariando muitos outros trabalhos anteriormente realizados e que demonstravam o envolvimento dessa isoforma no processo degenerativo (LEVY, KUBES e ZOCHODNE, 2001; DE LA HOZ et al., 2003).

Outras regiões do SNP que são acometidas durante a EAN não foram contempladas e analisadas por esses autores, como por exemplo, a cauda eqüina e as raízes dorsais. Um estudo mais amplo que inclua essas regiões em diferentes fases da EAN contribuirá para um melhor entendimento sobre o contexto no qual a iNOS está envolvida. Isto poderá ajudar no direcionamento de pesquisas que explorem a manipulação dessa molécula e que investiguem a regulação dos mecanismos imunopatológicos a ela associados.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este estudo tem como objetivo geral investigar a presença da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e caracterizar a distribuição da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis com neurite experimental auto-imune. Além disso, propõe-se investigar uma possível associação da presença da iNOS e do TNF- α com o processo desmielinizante, as alterações axonais e os sinais clínicos exibidos pelos animais imunizados.

3.2. Específicos

- Investigar a expressão da iNOS e do TNF- α no nervo ciático, nas raízes espinhais adjacentes à intumescência lombar e nas raízes da cauda eqüina, por meio de técnica imunoistoquímica;
- Localizar temporalmente e espacialmente as células produtoras da iNOS e do TNF- α utilizando imunomarcacão dupla;
- Acompanhar o processo de desmielinização periférica através de histoquímica de Sudan Black.
- Avaliar as alterações axonais no nervo ciático por meio de imunomarcacão para neurofilamentos, em diferentes fases da EAN;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Lewis, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Durante a fase de experimentação, os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21°C), recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*, em ambiente livre de patógenos específicos (SPF) no biotério do Depto de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP.

A manipulação dos animais foi realizada de acordo com os princípios para uso de animais na pesquisa e na educação, seguindo-se os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp.

4.2. Neuro-antígeno e indução da EAN

A EAN foi induzida utilizando-se um peptídeo neuritogênico correspondendo à seqüência de aminoácidos 53-78 da proteína bovina P2 da mielina periférica (ROSTAMI *et al.*, 1990; HAHN *et al.*, 1991). Esse peptídeo, também denominado SP-26, foi sintetizado por Genemed Synthesis (CA, USA) com pureza acima de 95% e com a seguinte seqüência de 26 aminoácidos: ‘N’ – TESPfKNTEISfKLGQEFEEtTADNR – ‘C’.

Os animais tiveram inoculado subcutaneamente em suas patas posteriores, 0,2 ml de uma emulsão contendo 50 µg de SP-26 dissolvidos em PBS e emulsionados em igual volume de Adjuvante Completo de Freund (CFA, 5mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, Sigma).

4.3. Avaliação da evolução clínica da EAN

A partir do segundo dia após a imunização, os ratos Lewis foram observados e avaliados diariamente para os sinais clínicos da EAN, sendo-lhes atribuído diferentes graus conforme os critérios a seguir (ZHU *et al.*, 1997): grau 0 = ausência de sinais clínicos; grau 1 = flacidez na cauda; grau 2 = paraparesia moderada (fraqueza muscular nos membros pélvicos); grau 3 = paraparesia severa; grau 4 = tetraparesia ou paraplegia e paresia dos membros torácicos; grau 5 = moribundo.

As observações foram realizadas até 36 dias após a imunização (indução da EAN).

4.4. Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: animais normais e animais induzidos para EAN. Os animais normais foram utilizados como grupo controle (n=3). No grupo experimental de ratos Lewis com EAN (n=15), os animais foram sacrificados em diferentes fases do processo patológico de acordo com o tempo transcorrido após a indução da EAN (p.i.) e a avaliação clínica anteriormente mencionada. Os subgrupos experimentais analisados (n=3) incluíram animais avaliados:

- em grau 1, na fase inicial da EAN → subgrupo G1;
- em grau 2 → subgrupo G2;
- em grau 3 → subgrupo G3;
- em grau 1, na fase de recuperação da EAN → subgrupo R1;
- em grau 0, na fase de resolução da EAN → subgrupo R0.

4.5. Processamento dos espécimes para histologia e imunoistoquímica

Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e cloridrato de xilazina (75 e 15 mg/kg peso, respectivamente, *i.p.*). Em seguida, foram perfundidos transcardiacamente com solução salina tamponada (PBS) e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) para a lavagem de vasos e órgãos. Subseqüentemente realizou-se a fixação dos tecidos através da perfusão de paraformaldeído 4% dissolvido em PBS. Os nervos ciáticos, a medula espinhal e as raízes espinhais foram dissecados e deixados na mesma solução fixadora por 24 horas. Após esse período, foram lavados em PBS e transferidos a uma solução de sacarose 20% e 30% a 4°C para crioproteção, onde ficaram imersos por 5 dias.

Os espécimes foram então reduzidos a fragmentos menores, com aproximadamente 1,5 cm e 0,5 cm de comprimento para os cortes longitudinais e transversais, respectivamente. Foram obtidas as seguintes regiões (Fig. 4.5.1):

- intumescência lombar e raízes nervosas adjacentes oriundas dos segmentos medulares T12 a L3 (dentre essas raízes estão parte das fibras nervosas que formam o nervo ciático, oriundas dos segmentos medulares L3 a L6 ou S1, e também parte das fibras nervosas que formam o nervo femoral, oriundas de L3 e L4) (JANJUA e LEONG, 1984);
- segmentos L6 a S2 da medula espinhal (0,5 cm) e raízes adjacentes oriundas de L1 a S1;

- cauda eqüina com gânglios sensitivos L4 a L6 e raízes oriundas dos segmentos L4 a Co3, abrangendo os motoneurônios responsáveis pela inervação dos músculos caudais no rato (GROSSMAN, BASBAUM e FIELDS, 1982);
- nervo ciático, porção proximal a partir da região do forame isquiático maior;
- nervo ciático, porção mais distal, próximo à fossa poplítea;
- nervo ciático, segmento de 0,5 cm intermediário aos fragmentos anteriores.

Após a crioproteção, os espécimes foram incluídos em meio O.C.T. (meio que permite a realização de cortes em baixas temperaturas), rapidamente congelados (-22°C) e estocados em "biofreezer" até a obtenção dos cortes histológicos coletados em lâminas silanizadas.

Utilizando-se um criostato Leica modelo CM1850, cortes longitudinais e transversais seriados (10 µm) foram obtidos do nervo ciático e das raízes nervosas espinhais ao nível da intumescência lombar e da cauda eqüina. Também foram obtidos cortes transversais das raízes espinhais na porção sacral da medula. Os cortes foram coletados seqüencialmente em lâminas silanizadas alternadas e estocados em "freezer" (-20°C) até o seu processamento histoquímico ou imunoistoquímico.

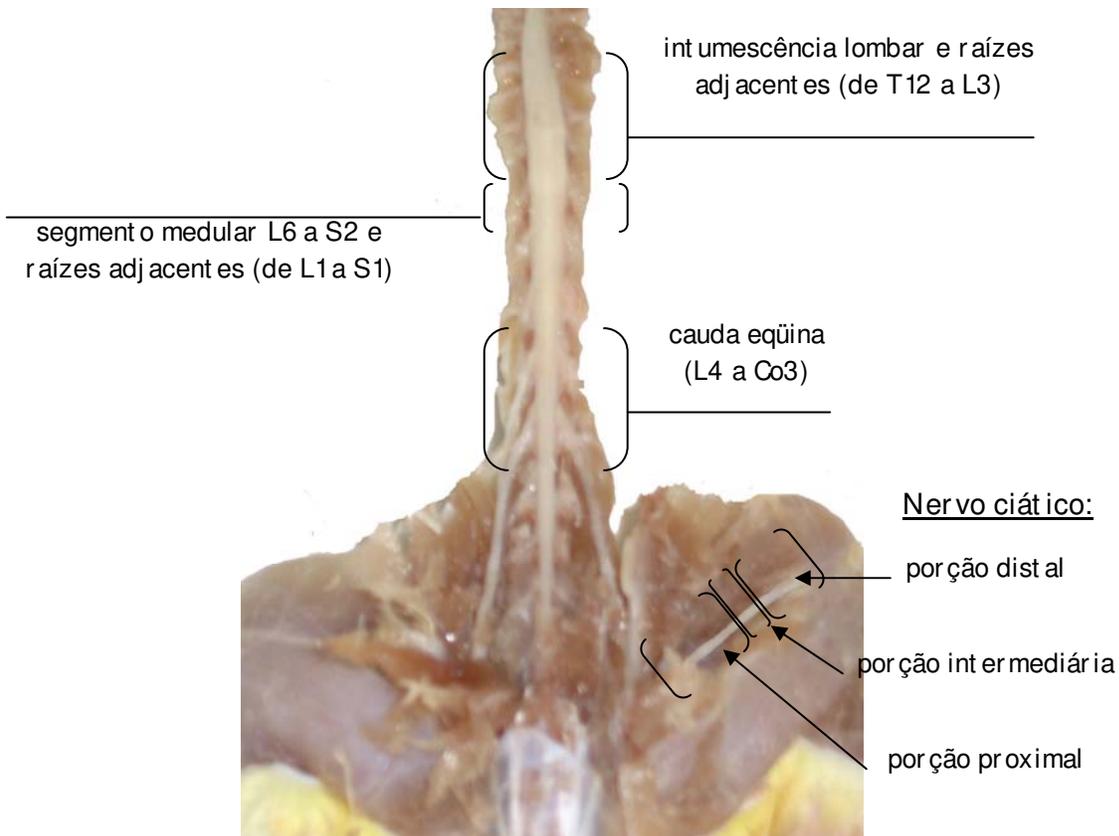


Figura 4.5.1 – Regiões analisadas do sistema nervoso periférico de rato Lewis.

4.6. Histologia

► Coloração com Hematoxilina e Eosina

As lâminas com os cortes foram retiradas do “freezer” e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas com água destilada e coradas com Hematoxilina de Harris por 20 segundos. Em seguida, os cortes foram deixados em água corrente por 10 minutos, corados com Eosina alcoólica por 10 segundos e lavados novamente em água de torneira. A montagem das lâminas foi feita em meio Permount.

► Histoquímica de Sudan Black

As lâminas foram retiradas do “freezer”, mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas com água destilada e transferidas para uma solução alcoólica 70% saturada com *Sudan Black*, permanecendo por 40 minutos. Em seguida, os cortes foram contrastados com álcool 50%, lavados em água destilada e montados com gelatina glicerinada.

► Coloração com Azul de Toluidina

As lâminas foram retiradas do “freezer” e mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com água destilada e imersos em uma solução corante aquosa contendo 0,5% de azul de toluidina e 5% de tetraborato de sódio decahidratado, na qual permaneceram por 10 segundos. Após mais 3 lavagens em água destilada, os cortes foram desidratados e montados com meio Permount.

4.7. Imunoistoquímica de fluorescência

► Anticorpos

Marcações simples e duplas de imunofluorescência foram realizadas nos nervos e raízes espinhais de animais normais e com EAN com o objetivo de detectar a presença da isoforma iNOS e TNF- α , bem como identificar as células produtoras destas proteínas nesses tecidos. Para isso foram utilizados os anticorpos, marcadores e fluorocromos conjugados que constam na tabela a seguir:

TABELA 2 – Anticorpos e marcadores utilizados na imunoistoquímica de fluorescência.

Marcação de	Anticorpo primário	Diluição (Marca)	Anticorpo secundário (exceto *)	Diluição (Marca)
Isoforma iNOS	policlonal de cabra Anti-iNOS	1:250 (Santa Cruz)	anti-cabra conjugado ao TRITC	1:250 (Sigma)
TNF- α	monoclonal anti-TNF- α biotinado	1:1000 (BD Science);	*Complexo avidina - FITC	1:1000 (BD Science);
Macrófagos	monoclonal anti-ED1	1:300 (Serotec)	anti-camundongo conjugado ao FITC	1:300 (Sigma)
Neurofilamentos	Monoclonal anti-NF	1:250 (Dako)	anti-camundongo conjugado à Rodamina	1:100 (Santa Cruz)

► Protocolo da imunoistoquímica

As lâminas com os cortes foram deixadas em PBS 0,1 M a temperatura ambiente, por 30 minutos, sendo em seguida pré-incubados por 1 hora em solução de bloqueio para sítios inespecíficos (PBS contendo 3% de BSA e 0,3% de Triton X-100). Terminado o bloqueio, os cortes foram deixados por 1 hora em soro imune de equino e subseqüentemente, incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS contendo 1% de BSA, 0,3% de Triton X-100 e 0,01% de azida sódica. As lâminas foram mantidas em câmara úmida e escura, a 4°C, por 12 a 15 horas. Em seguida, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubadas por 45 minutos com o complexo avidina-fluorocromo ou os anticorpos secundários correspondentes diluídos em PBS contendo 0,3% de Triton X-100. Terminada esta incubação, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e, em alguns casos, deixadas por 5 minutos em uma solução 1 μ g/ml de 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma) em PBS para evidenciar os núcleos. Os cortes foram lavados em PBS e as lâminas montadas em glicerol e PBS (3:1) contendo 0,1% de 1,4-diazabicyclo-(2.2.2)-octano (DABCO, Sigma), um protetor da fluorescência. Depois de cobertas com lamínula e seladas com esmalte, as lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Para controle negativo da reação imunoistoquímica, algumas lâminas foram reagidas omitindo-se os anticorpos primários ou os anticorpos secundários. No caso da imunoistoquímica para TNF- α , algumas lâminas também foram reagidas omitindo-se a avidina conjugada ao fluoróforo FITC.

► Microscopia de fluorescência convencional e confocal

A observação da imunofluorescência foi realizada por meio de microscopia confocal ou convencional de fluorescência.

Em algumas lâminas, a imunofluorescência foi observada em microscópio confocal (CLSM510, Carl Zeiss) acoplado a um microscópio invertido Axiovert Zeiss. Foram coletadas imagens de marcações simples e duplas, estas separadamente nos canais RGB.

Para uma melhor análise dos resultados de imunofluorescência, a técnica de contraste por interferência diferencial (DIC) foi utilizada durante a observação de algumas lâminas ao microscópio confocal. Para o mesmo campo onde foi observada a imunofluorescência obteve-se uma imagem de fundo através da técnica de DIC, permitindo-nos uma localização mais precisa da imunomarcaçãõ.

Outra parte das imunomarcações foi observada em microscópio de epifluorescência modelo Nikon 50i (USA, FAPESP 2004/ 00638-6) equipado com lâmpadas de mercúrio (HBO 100W) e halógena (100W). Foram utilizados os seguintes filtros e comprimentos de onda para excitação e barreira:

B-2E/ C excitação 465-495 nm; DM 505; Barreira 515-550 nm (FITC);

UV-2B excitação 330-380 nm; DM 400; Barreira 435 nm (DAPI);

Y-2E/ C excitação 540-580 nm; DM 595; Barreira 600-660 (Texas Red).

A aquisição das imagens foi feita com o software de captura ATC-1 e uma câmara digital (Nikon DMX 1200F, USA). Para uma melhor localização da imunomarcaçãõ no tecido, foram também capturadas algumas imagens em campo claro.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Evolução clínica da EAN em ratos Lewis

Os animais foram avaliados diariamente após a indução da EAN.

É importante ressaltar que a coleta dos espécimes nas diferentes fases da EAN foi realizada em animais sacrificados de acordo com sua avaliação clínica, e não em função do tempo transcorrido após a imunização com o peptídeo SP-26.

Animais normais do grupo controle ou animais imunizados com SP-26 avaliados em grau zero não apresentaram alteração no tônus caudal, sendo capazes de manter a cauda elevada e realizar movimentos ondulatórios com a mesma.

Os animais induzidos para EAN desenvolveram os primeiros sinais clínicos (perda do tônus da cauda) entre 7 e 12 dias após a imunização (p.i.). Entre o 13^o e 19^o dia, os animais apresentaram dificuldade em movimentar os membros pélvicos (paraparesia), passando a arrastá-los e sendo avaliados em grau 2. Entre o 17^o e 25^o dia p.i., os animais doentes, além de emagrecimento, mostraram agravamento dos sinais clínicos com paraparesia severa (grau 3). Os animais a serem coletados no período de recuperação desenvolveram paraplegia durante o auge do quadro clínico da EAN. Subseqüentemente, esses animais apresentaram melhora nos sinais clínicos, recuperando a mobilidade dos membros pélvicos. Os animais em recuperação avaliados em grau 1 (R1) foram sacrificados nos dias 22 e 29 p.i., enquanto que os animais clinicamente recuperados (R0) foram obtidos 30 e 36 dias p.i.

5.2. Histologia

Alterações morfológicas e histológicas em diferentes regiões do tecido nervoso periférico foram evidenciadas pela coloração com hematoxilina e eosina (HE) e pela histoquímica de Sudan Black (SB), ao se comparar espécimes de ratos Lewis induzidos para EAN com espécimes de ratos Lewis normais (grupo não imunizado). Essas alterações foram mais ou menos evidentes dependendo do grau de gravidade dos sinais clínicos nos diferentes estágios analisados da EAN.

Nos animais normais, a coloração de HE evidenciou núcleos fusiformes e outros mais arredondados dispostos por entre as fibras nervosas. A maioria desses núcleos corresponde a fibroblastos e células de Schwann que constituem grande parte da população celular no nervo periférico e nas raízes nervosas. Uma rica vascularização foi observada entre as fibras nervosas da cauda eqüina (Fig. 5.2.1 A), no tecido conjuntivo entreposto à intumescência lombar e às raízes nervosas T12-L3 adjacentes (Fig. 5.2.1 C),

e no tecido conjuntivo circundando os gânglios das raízes dorsais (Fig. 5.2.1 B). No nervo ciático observou-se um tecido conjuntivo ricamente vascularizado e, em certos cortes, a presença de tecido adiposo ao redor do epineuro (Fig. 5.2.1 D). A histoquímica de SB evidenciou axônios envoltos por uma bainha de mielina de aspecto homogêneo e contínuo linearmente (Fig. 5.2.1 E,G,H). Em cortes transversais das raízes nervosas da cauda eqüina, observou-se um perfil de intensa marcação da bainha de mielina ao redor de grande parte dos axônios (Fig. 5.2.1 F).

Nos ratos Lewis que manifestaram os primeiros sinais clínicos da EAN (G1), alterações histopatológicas foram observadas nos espécimes de raízes nervosas constituintes da cauda eqüina e no nervo ciático de alguns animais. Verificou-se a presença de células mononucleadas e polimorfonucleadas próximas ao endotélio (Fig. 5.2.2 A) e dentro de vasos sangüíneos, principalmente nas raízes nervosas próximas aos gânglios sensitivos da cauda eqüina (Fig. 5.2.2 B). Essas células foram observadas em menor número em alguns espécimes de nervo ciático, dentro de vasos de maior calibre localizados no epineuro e perineuro (Fig. 5.2.2 D). Contudo, nenhuma alteração na bainha de mielina foi evidenciada nas fibras nervosas da cauda eqüina (Fig. 5.2.2 E) ou do nervo ciático (Fig. 5.2.2 H). Nas raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar, tanto a coloração com HE como a histoquímica de SB não demonstraram a presença de células inflamatórias nos vasos sangüíneos (Fig. 5.2.2 C,F,G), nem tampouco evidenciaram alterações no perfil de marcação da bainha de mielina.

Nos animais em grau 2 (G2), as alterações histopatológicas foram observadas tanto nas raízes nervosas da cauda eqüina como nas raízes T12-L3 adjacentes à intumescência lombar. Verificou-se um visível aumento da celularidade, relacionado principalmente ao recrutamento de células inflamatórias no tecido conjuntivo envolvendo os gânglios (Figura 5.2.3 B) e ao redor dos vasos sangüíneos da cauda eqüina, indicando o início do processo de infiltração nesses locais (Figura 5.2.3 A). A coloração de HE também evidenciou células inflamatórias (mononucleadas e polimorfonucleadas) na luz de vasos distribuídos pelas raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar e pelo tecido conjuntivo entreposto a estas estruturas (Figura 5.2.3 C). Através da técnica de Sudan Black, apenas uma discreta diminuição na intensidade da marcação foi detectada em algumas raízes da cauda eqüina (Figura 5.2.3 E) se comparadas aos espécimes de animais normais. As demais raízes, assim como aquelas que chegam aos gânglios sensitivos, não apresentaram nenhuma alteração evidente na bainha de mielina (Fig. 5.2.3 E, F).

Nos animais em grau 3 (G3), as alterações histopatológicas se acentuaram. A coloração de HE evidenciou um aumento na celularidade relacionado principalmente a células inflamatórias aglomeradas em infiltrados distribuídos: na região da cauda eqüina (Fig. 5.2.4 A); nas raízes dorsais que chegam aos gânglios sensitivos e no tecido conjuntivo que os envolve (Fig. 5.2.4 B,C); nas raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar (Fig. 5.2.5 A) e também no nervo ciático (Fig. 5.2.5 B,C). Dentre as células presentes nos infiltrados, células linfocíticas, monocíticas e polimorfonucleadas foram reconhecidas devido à sua morfologia característica (Fig. 5.2.5 D). Sua localização ocorreu preferencialmente ao redor de vasos, cuja luz se apresentou muito dilatada em relação aos vasos presentes nos espécimes normais. A histoquímica de SB mostrou alterações da bainha de mielina principalmente nas fibras nervosas próximas aos infiltrados inflamatórios. Em cortes transversais, essa técnica revelou bainhas de mielina menos coradas e mais finas envolvendo as fibras nervosas da cauda eqüina (Fig. 5.2.4 E,F), das raízes T12-L3 e do nervo ciático. Em cortes longitudinais, observou-se algumas fibras nervosas com a bainha de mielina fragmentada, muitas vezes formando segmentos elipsóides ou ovóides em meio a fibras com bainha de mielina aparentemente intacta e de aspecto contínuo (Fig. 5.2.4 D,E; Fig. 5.2.5 E-H).

Nos espécimes de animais em fase de recuperação da EAN (R1), ainda puderam ser observados infiltrados perivasculares nas raízes da cauda eqüina (Fig. 5.2.6 A), nas raízes nervosas T12-L3 (Fig. 5.2.6 B) e no nervo ciático (Fig. 5.2.6 C,D). Apesar da presença desses infiltrados, a população de células inflamatórias encontrava-se muito mais reduzida nas raízes nervosas T12-L3 do que nas raízes da cauda eqüina. Contudo, em ambas as regiões a histoquímica de SB revelou um perfil de marcação semelhante ao observado nas raízes nervosas dos animais normais (Fig. 5.2.6 E), exceto pela presença de raros e esparsos aglomerados de mielina entre algumas fibras nervosas (Fig. 5.2.6 F). No nervo ciático, porém, um acentuado quadro de desmielinização foi evidenciado pelo predomínio de numerosos fragmentos e ovóides de mielina fortemente corados pelo SB (em azul escuro ou preto). Concomitantemente, verificou-se também a presença de fibras mielínicas calibrosas, de aspecto semelhante ao das fibras mielínicas normais, bem como a presença de fibras de menor calibre, com bainhas de mielina delgadas e de aspecto contínuo (Fig. 5.2.6 G,H).

Na fase de resolução da EAN (R0), não foram observados infiltrados inflamatórios nas raízes nervosas T12-L3 ou na cauda eqüina (Fig. 5.2.7 A,B). Somente algumas células inflamatórias foram localizadas próximas a vasos. O mesmo ocorreu no nervo ciático (Fig.

5.2.7 C), com exceção de apenas um dos espécimes, onde um raro infiltrado inflamatório ainda foi encontrado (Fig. 5.2.7 D). Nas raízes nervosas T12-L3 não foram observadas regiões de desmielinização, resultando em uma morfologia comparável às de raízes nervosas normais. O mesmo foi observado na cauda eqüina (Fig. 5.2.7 E,F), exceto pela presença de raríssimos ovóides de mielina residuais. No nervo ciático, a marcação pelo SB mostrou que, além da maioria dos fragmentos de mielina ter sido removida, houve um aumento na presença de fibras nervosas delgadas coradas pelo SB em meio a algumas fibras mais calibrosas (Fig. 5.2.7 G,H).

Tabela 3 - Avaliação qualitativa da presença de células inflamatórias / presença de bainha de mielina fragmentada.

	CAUDA EQÜINA		RAÍZES NERVOSAS T12-L3		NERVO
	raízes nervosas	gânglios sensitivos	raízes nervosas	gânglios sensitivos	CIÁTICO
<i>Normais</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	*	0 / 0
<i>Fase inicial</i>	+ / 0	++ / * luz vasos	0 / 0	*	+ / 0
<i>Fase aguda</i>	++ / 0 infiltrados	+++ / 0 infiltrados	++ / 0	* / 0	+ / 0
<i>Fase pré-pico</i>	++++ / + dispersas	++++ / + dispersas	++++ / + Infiltrados	+++ / *	++++ / ++ infiltrados
<i>Fase de recuperação</i>	+++ / + infiltrados	* / *	++ / + infiltrados	0 / *	++++ / +++ infiltrados
<i>Fase de resolução</i>	+ / +	0 / 0	0 / 0	* / 0	++ / 0

IL= intumescência lombar

0 ausência de células inflamatórias

* não determinado

Mastócitos

Em todos os grupos experimentais, inclusive no grupo controle (animais normais), a coloração com azul de toluidina evidenciou células grandes ovais de núcleo arredondado e com grânulos metacromáticos. Com base nessas características morfológicas e na localização predominantemente perivascular, essas células foram identificadas como mastócitos. Nos nervos ciáticos, os mastócitos foram observados entre as células do tecido adiposo que envolve o nervo, na região epineural (Fig. 5.2.8 A), próximo aos vasos sanguíneos. (Fig. 5.2.8 B). Também foram observados no perineuro que envolve os fascículos nervosos, no endoneuro (Fig. 5.2.8 D,E) e em alguns cortes, em

regiões de infiltrados (Fig. 5.2.8 C). Nas regiões da cauda eqüina e das raízes nervosas adjacentes à intumescência lombar, os mastócitos localizaram-se no tecido conjuntivo da cápsula que envolve os gânglios sensitivos e na região pós-ganglionar, em meio às fibras nervosas do tronco nervoso.

A reduzida população de mastócitos na cápsula dos gânglios sensitivos e a não uniformidade na obtenção do tecido epineural do nervo ciático não nos permitiu avaliar quantitativamente ou qualitativamente a presença dessas células nos diferentes grupos experimentais estudados. Diferenças qualitativas quanto à população de mastócitos endoneurais no nervo ciático, nas diferentes fases da EAN, também não foram detectadas.

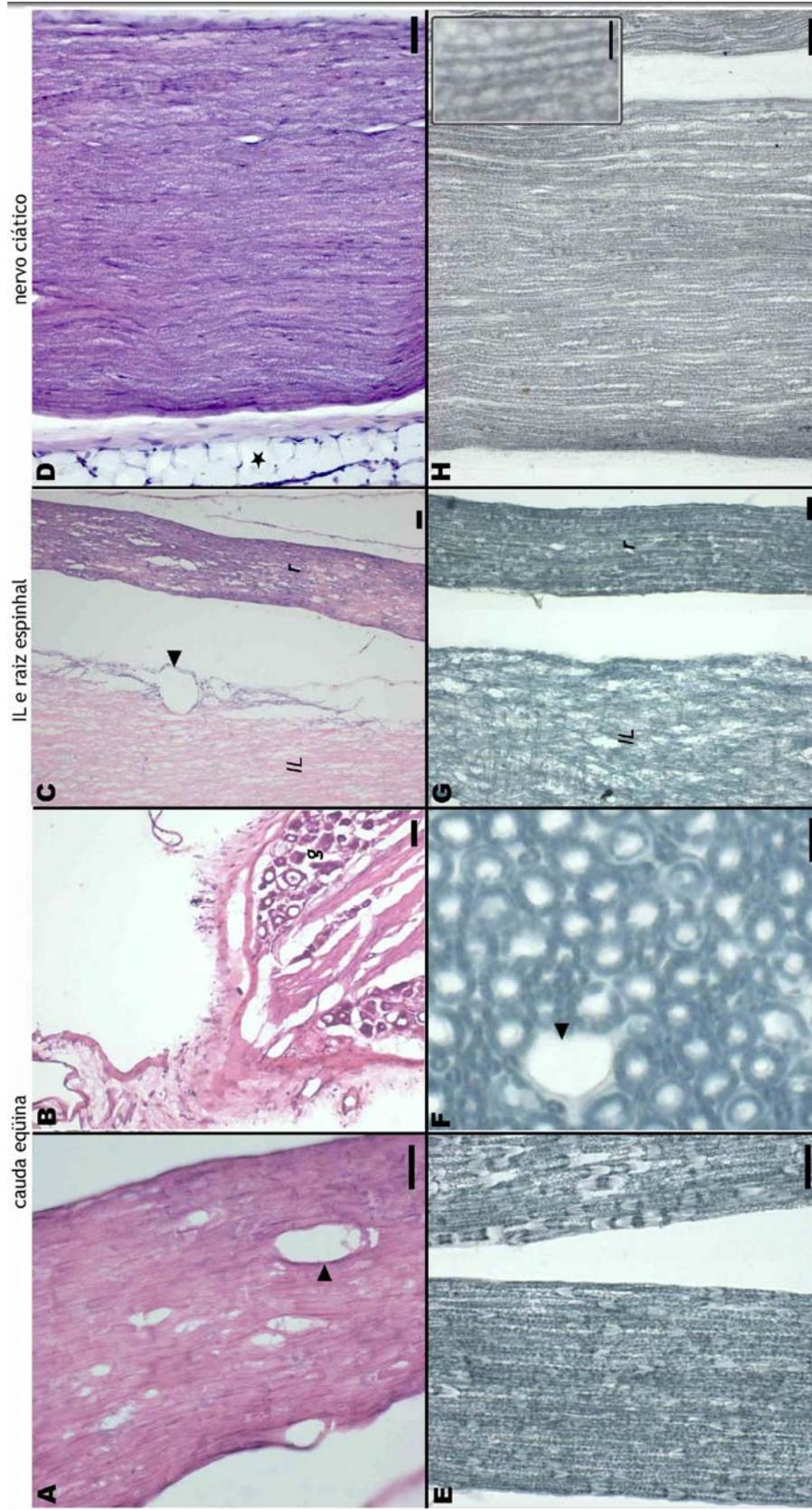


Figura 5.2.1 - Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis normais: cauda eqüina (A, B, E, F), raízes nervosas T12-L3 (*r*) adjacentes à intumescência lombar (*IL*) (C,G) e nervo ciático (D,H). (A) Aspecto normal das fibras nervosas de uma raiz da cauda eqüina e seus vasos sangüíneos (▶). (B) Fibras nervosas de raízes sensitivas em meio a um gânglio de raiz dorsal (*g*) e porção distal do tecido conjuntivo que o envolve. (C) Vaso sangüíneo observado no tecido conjuntivo entreposto à intumescência lombar e às raízes espinhais. (D) Aspecto do nervo ciático, tecido conjuntivo adjacente e tecido adiposo epineural (★). Característica marcação intensa e contínua da bainha de mielina que envolve os axônios em raízes da cauda eqüina (E), raiz adjacente à IL (G) e no nervo ciático (H, detalhe). (F) Corte transversal de uma raiz da cauda eqüina no qual se observa uma espessa bainha de mielina envolvendo grande parte dos axônios. Coloração de hematoxilina e eosina (A-D) e histoquímica de Sudan Black (E-H). Barra = 50 µm (A,B,C,D,H), 30 µm (E,G), 10 µm (F, detalhe em H).

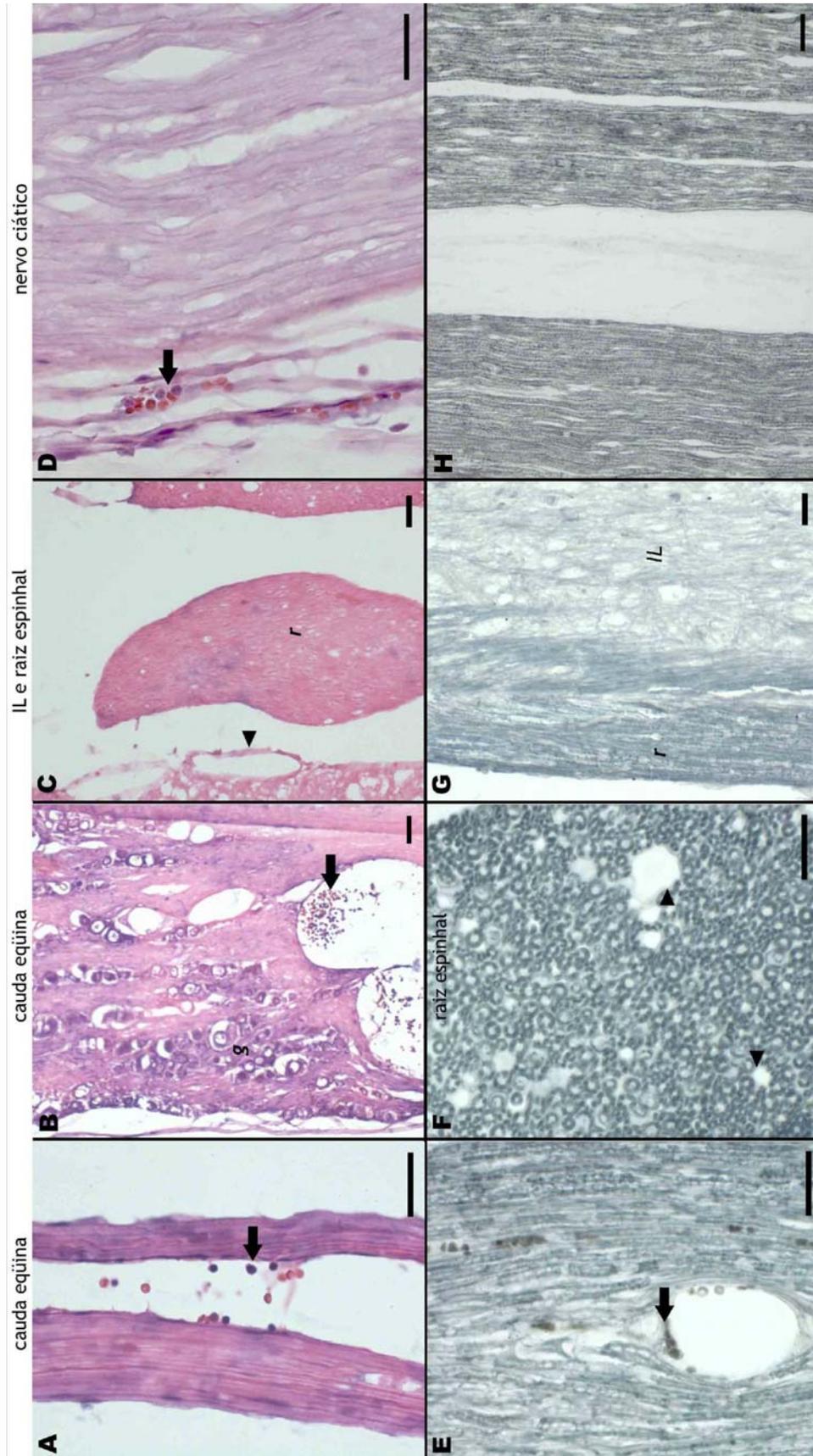


Figura 5.2.2 – Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis na fase inicial dos sinais clínicos da EAN (G1): cauda eqüina (A,B,E), raízes T12-L3 (*r*) adjacentes a um segmento da intumescência lombar (C,F,G) e nervo ciático (D,H). (A) Células inflamatórias (◄) próximas ao endotélio de um vaso entre as raízes nervosas da cauda eqüina. (B) Células inflamatórias dentro de vasos próximos a um gânglio sensitivo (*g*). (C) Vaso sanguíneo (►) no tecido entreposto ao segmento da intumescência lombar e às raízes T12-L3, onde nenhuma célula inflamatória é evidenciada. (D) Raras células inflamatórias dentro de vasos no perineuro/epineuro. (E) Aspecto normal da bainha de mielina nas fibras nervosas da cauda eqüina, apesar das células observadas dentro de vaso. (F) Corte transversal mostrando vasos sanguíneos (►) em meio a fibras nervosas cuja bainha de mielina espessa apresenta um perfil de intensa marcação pelo Sudan Black. (G) Corte longitudinal de raiz nervosa adjacente à intumescência lombar (*IL*). (H) Aspecto normal da bainha de mielina que envolve os axônios do nervo ciático. Coloração de hematoxilina e eosina (A-D) e histoquímica de Sudan Black (E-H). Barra = 50 µm (A,D,E), 30 µm (B,C,F,G,H).

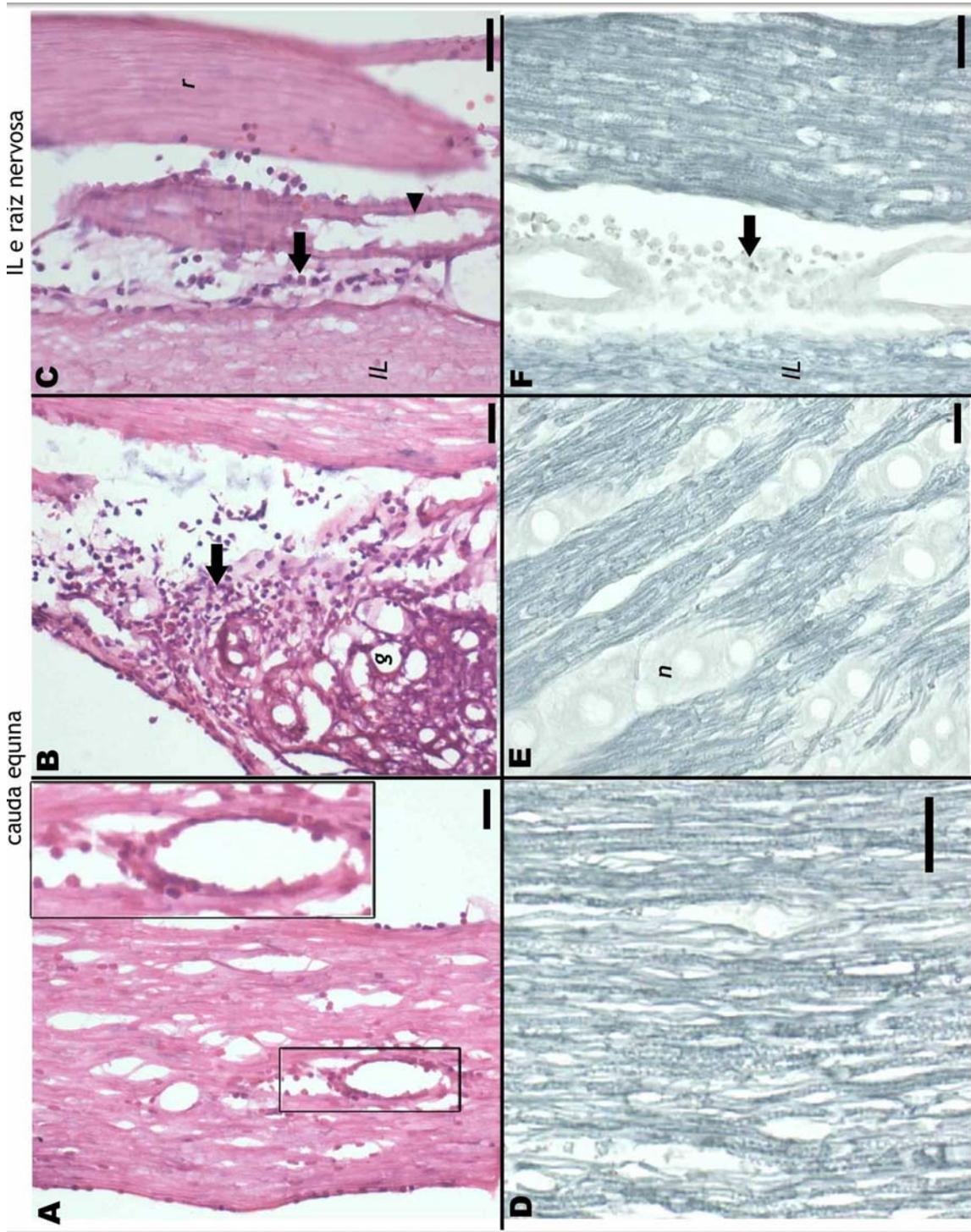


Figura 5.2.3 - Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis com grau 2 (G2): cauda eqüina (A,B,D,E) e raízes T12-L3 (*r*) adjacentes à um segmento da intumescência lombar (C,F). (A) Células inflamatórias ao redor de um vaso entre as fibras nervosas de uma raiz da cauda eqüina (detalhe). (B) Células inflamatórias (◀) em gânglio sensitivo (*g*). (C) Células inflamatórias (◀) próximas a um vaso sanguíneo (▶), no tecido entreposto ao segmento da intumescência lombar (*IL*) e às raízes T12-L3 adjacentes. (D) Fibras nervosas da cauda eqüina com bainha de mielina de aspecto normal. (E) Aspecto normal da bainha de mielina em fibras nervosas sensitivos próximas aos corpos celulares de neurônios (*n*) em um gânglio. (F) Corte longitudinal de raiz nervosa adjacente à intumescência lombar, no qual células inflamatórias estão presentes ao redor de um vaso sanguíneo. Coloração com hematoxilina e eosina (A-C) e histoquímica com Sudan Black (D-F). Barra = 50 µm (D), 30 µm (A,B,C,E,F), 15 µm (detalhe em A).

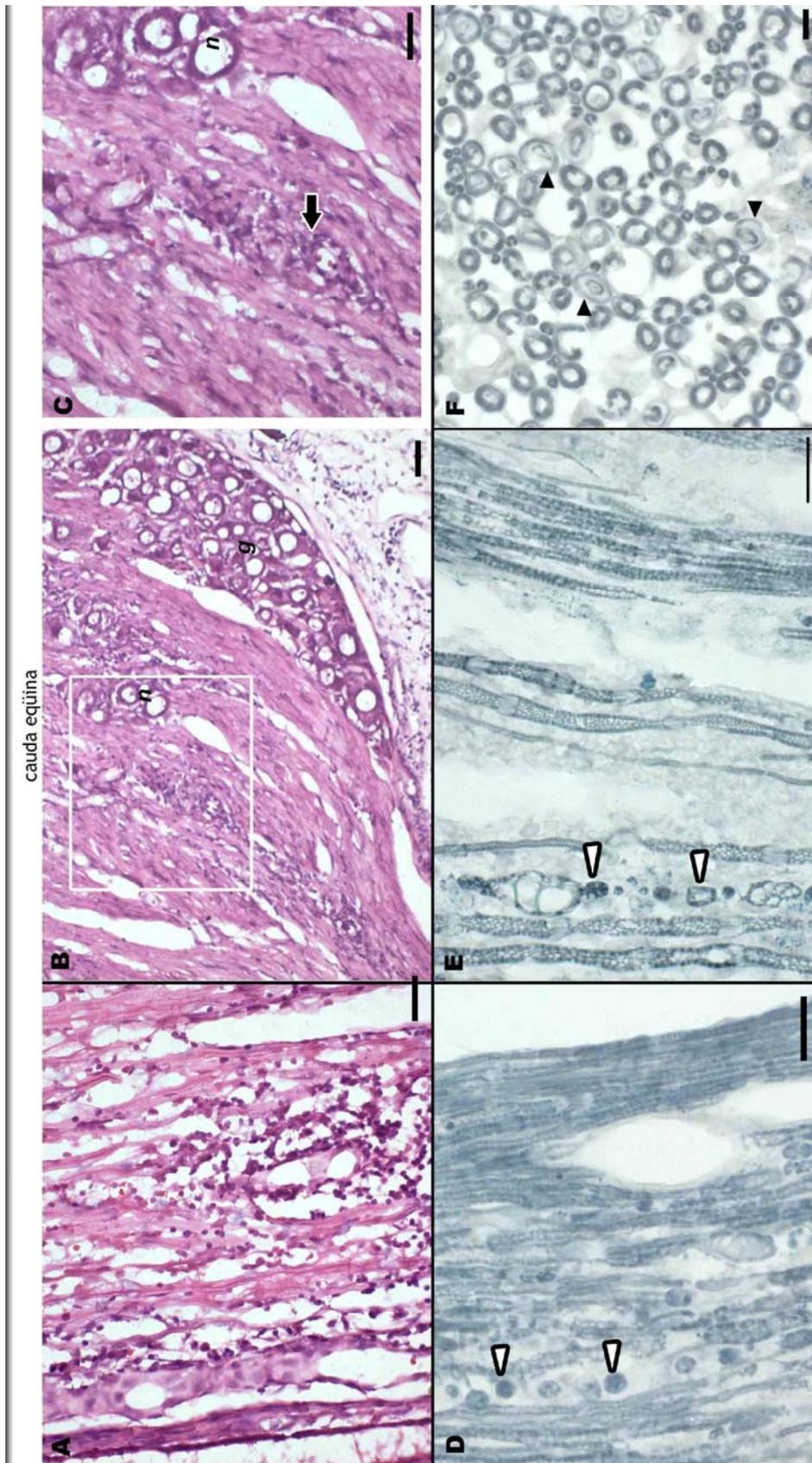


Figura 5.2.4 - Criocortes de raízes nervosas da cauda eqüina de ratos Lewis em grau 3 (G3). (A) Numerosas células inflamatórias ao redor de infiltrados (◄) distribuídos nas raízes da cauda eqüina. (B) Infiltrados inflamatórios próximos aos neurônios sensitivos (*n*) em um gânglio de raiz dorsal (*g*) na cauda eqüina. (C) Detalhe de B. (D) Ovóides de mielina fragmentada (◄) evidenciada pelo Sudan Black em meio a fibras nervosas com bainha de mielina de aspecto normal e íntegro. (E) Ovóides de mielina próximos a uma região de infiltrado. (F) Corte transversal de uma raiz da cauda eqüina mostrando uma bainha de mielina delgada (►) envolvendo alguns axônios. Coloração com hematoxilina e eosina (A-C) e histoquímica com Sudan Black (D-F). Barra = 50 µm (B), 30 µm (A,C,D,E) e 10 µm (F).

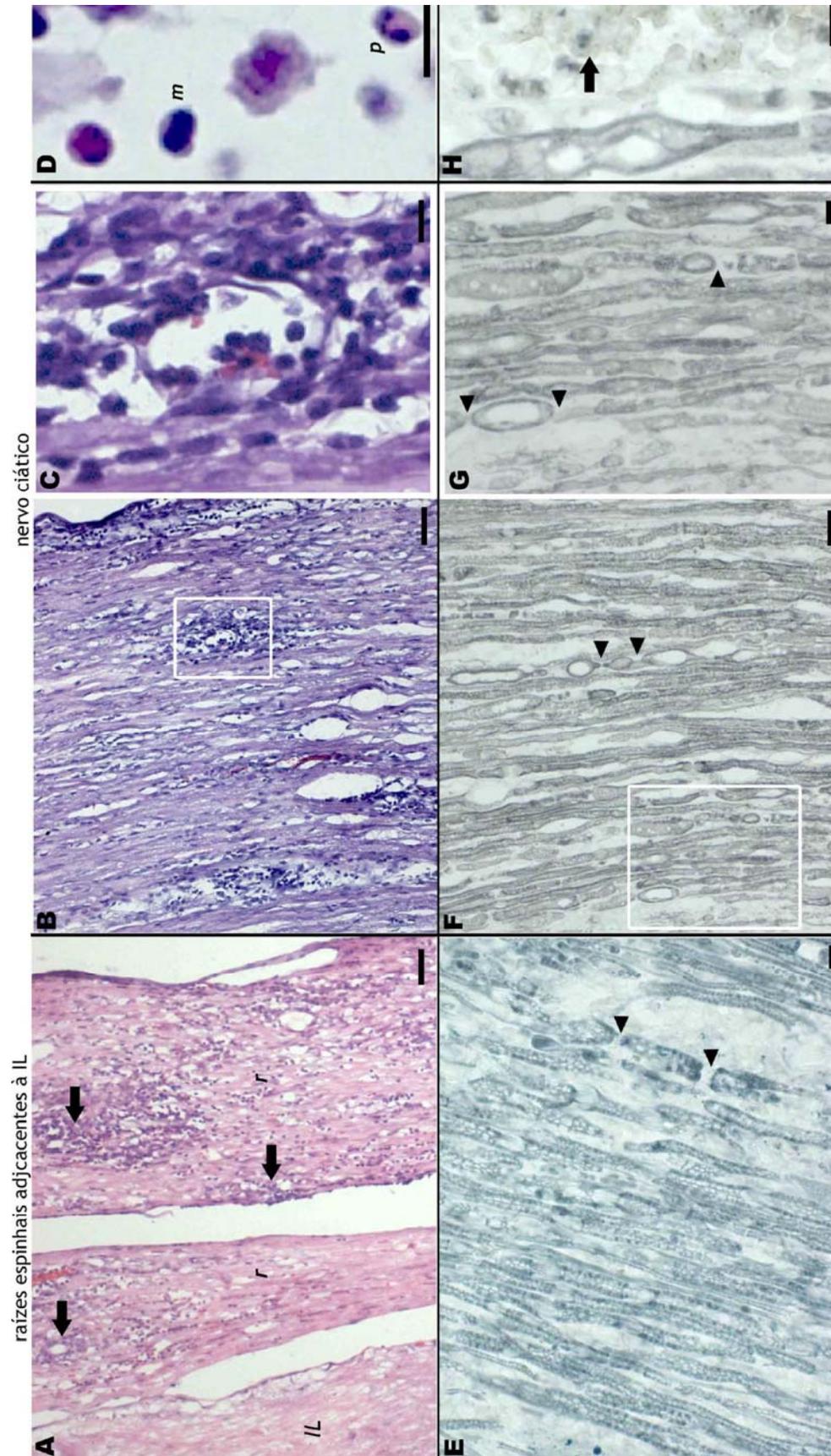


Figura 5.2.5 - Criocortes de raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar (A,E) e de nervo ciático (B-D,F-H) de ratos Lewis em grau 3 (G3). (A) Numerosas células inflamatórias ao redor de infiltrados (◀) distribuídos nas raízes T12-L3 (*r*) adjacentes ao segmento da intumescência lombar (*IL*). (B) Infiltrados inflamatórios no nervo ciático. (C) Detalhe de um infiltrado de B e suas células inflamatórias. (D) Célula mononucleada (*m*) e polimorfonucleada (*p*) que constituem parte da população de células inflamatórias nos infiltrados observados. (E) Fibras nervosas apresentando fragmentação da bainha de mielina (◀) em raiz nervosa adjacente ao segmento da intumescência lombar. (F) Fragmentação da bainha de mielina que envolve axônios no nervo ciático. (G) Detalhe de F. (H) Células evidenciadas pela histoquímica de Sudan Black, contendo provavelmente resíduos da bainha de mielina em degradação. Coloração com hematoxilina e eosina (A-D) e histoquímica com Sudan Black (E-H). Barra = 50 μm (A,B,F), 20 μm (C,D,H), 10 μm (E,G).

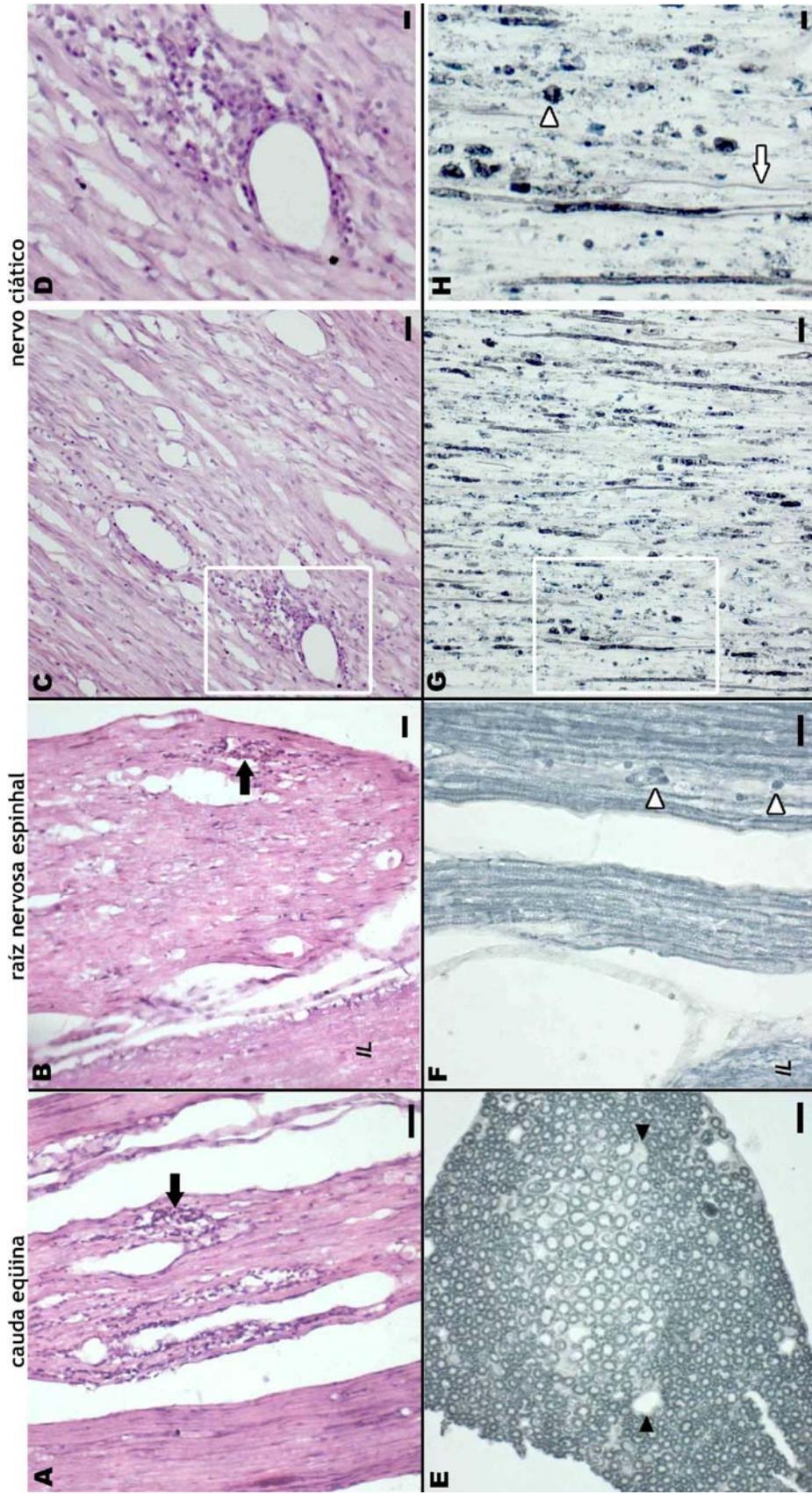


Figura 5.2.6 - Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis em fase de recuperação da EAN (R1): cauda eqüina (A,E), raízes nervosas T12-L3 adjacentes a um segmento da intumescência lombar (B,F) e nervo ciático (C,D,G,H). (A) Infiltrados perivasculares (◄) em raiz nervosa da cauda eqüina. (B) Pequeno infiltrado em uma raiz de T12-L3 adjacente à intumescência lombar (**IL**). (C) Células inflamatórias em um infiltrado do nervo ciático. (D) Detalhe do infiltrado em C. (E) Corte transversal de uma raiz da cauda eqüina mostrando vasos sangüíneos (►) e uma marcação pelo Sudan Black de perfil similar ao de uma raiz normal. (F) Esparsos ovóides de mielina observados entre fibras nervosas com bainha de mielina de aspecto normal. (G) Aspecto de acentuada desmielinização no nervo ciático, com a presença de muitos fragmentos e ovóides de mielina. (H) Detalhe de G, onde além dos ovóides de mielina (▷) é possível observar delgadas bainhas de mielina (⇨). Coloração com hematoxilina e eosina (A-D) e histoquímica de Sudan Black (E-H). Barra = 30µm (A,B,C,G) e 10µm (D,E,F,H).

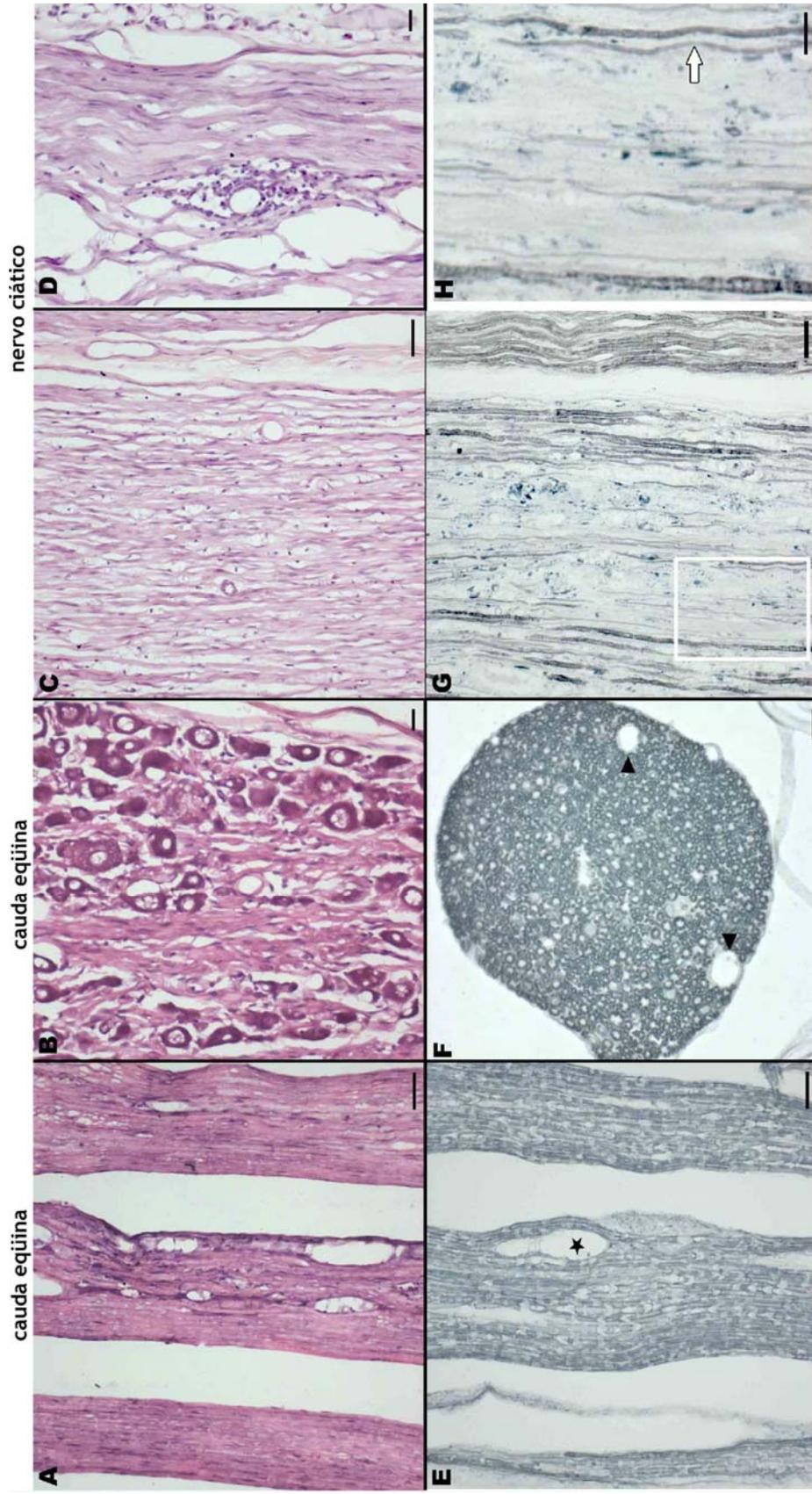


Figura 5.2.7 - Criocortes de diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis em fase de resolução da EAN (R0): cauda eqüina (A,B,E,F) e nervo ciático (C,D,G,H). (A) Ausência de infiltrados inflamatórios em raízes da cauda eqüina. (B) Ausência de infiltrados em gânglio sensitivo. (C) Aspecto do nervo ciático de um animal recuperado da EAN. (D) Um dos raros infiltrados observados em um espécime de nervo ciático. (E) Aspecto normal da bainha de mielina em fibras nervosas das raízes da cauda eqüina. (★) Vaso sanguíneo sem infiltrado celular. (F) Corte transversal de uma raiz da cauda eqüina mostrando vasos sanguíneos (▶) e um perfil de marcação da bainha de mielina similar ao de uma raiz normal. (G) Raros fragmentos de mielina presentes no nervo ciático em meio a fibras nervosas mielinizadas. (H) Detalhe de G mostrando bainhas de mielina delgadas coradas pelo Sudan Black (⇒) em meio a algumas fibras com bainhas de mielina mais calibrosas. Coloração com hematoxilina e eosina (A-D) e histoquímica de Sudan Black (E-H). Barra = 50 µm (A,C,E,G), 40 µm (F), 20 µm (B,D,H).

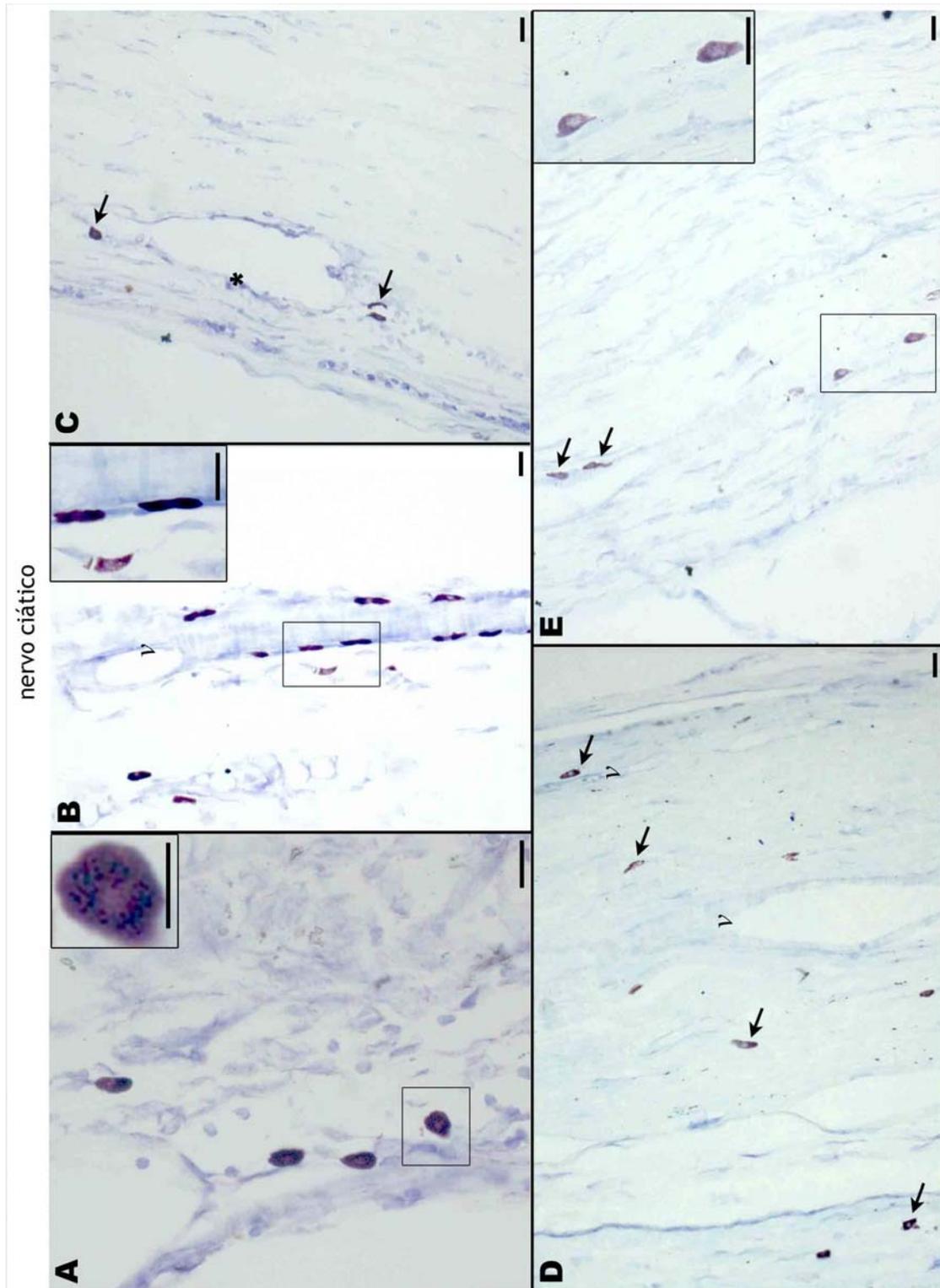


Figura 5.2.8 – Mastócitos em nervo ciático de ratos Lewis dos grupos G2 (A), G3 (B-D) e R0 (E). (A) Mastócitos na região epineural exibindo típica metacromasia em seus grânulos (detalhe em A). (B, detalhe em B) Mastócitos localizados ao redor de um vaso (v) (este, em corte tangencial) na região epineural. (C) Mastócitos (setas) ao redor de um infiltrado ($*$) formado por poucas células inflamatórias. (D) Mastócitos distribuídos pelo endoneuro do nervo ciático, alguns mais próximos a vasos. (E, detalhe em E) Mastócitos observados no endoneuro de um nervo ciático do grupo R0. Coloração com azul de toluidina. Barra = 20 μm (A,B, detalhe em B, C,D,E, detalhe em E), 10 μm (detalhe em A).

5.3. Imunofluorescência para iNOS e TNF- α

Células com imunorreatividade para iNOS e TNF- α foram evidenciadas no sistema nervoso periférico de ratos Lewis com neurite experimental auto-imune induzida, não sendo observadas nos animais normais. Praticamente todas as células com imunorreatividade para iNOS também apresentaram imunorreatividade para TNF- α (células duplamente positivas ou iNOS⁺/TNF- α ⁺). Essas células se caracterizaram por seu tamanho pequeno e forma arredonda. Na imunomarcção dupla, células apenas iNOS ou TNF- α positivas foram raramente observadas.

Com base na morfologia dos núcleos evidenciados pelo DAPI, observou-se que em infiltrados inflamatórios dos animais dos grupos G1, G2 e G3 da EAN, algumas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ presentes correspondiam a polimorfonucleares. Parte dessas células foi identificada como sendo neutrófilos, pois apresentaram um característico núcleo multilobulado (Fig. 5.3.1 A-D).

O controle negativo da reação para iNOS no qual omitiu-se o anticorpo primário não apresentou nenhuma imunofluorescência (Fig. 5.3.1 E-F).

O controle negativo da reação para TNF- α no qual se omitiu o anticorpo primário apresentou-se negativo para as células arredondadas de aspecto inflamatório (Fig. 5.3.1 G-H). No entanto, esse controle mostrou-se inespecificamente positivo para uma população de células morfológicamente bem característica. De tamanho maior que as células inflamatórias, forma oval e núcleo arredondado, esta população celular apresentou fluorescência inespecífica em seus grânulos citoplasmáticos. Em animais normais e animais com EAN, essas células tiveram sua distribuição restrita ao tecido conjuntivo que envolve os gânglios das raízes dorsais, à região pós ganglionar (tronco nervoso) e ao nervo ciático, nas regiões epineural, perineural e endoneural (Fig. 5.3.2 C,H; Fig. 5.3.3 C,I,J). A predominante localização perivascular (Fig. 5.3.5 C,F) dessas células associada às características morfológicas descritas indicam que essa população celular corresponde a mastócitos. A coloração com azul de toluidina (item 5.2, págs. 60-61) evidenciou a metacromasia típica dos grânulos dessas células, confirmando sua identidade.

A marcação fluorescente inespecífica exibida pelos grânulos dos mastócitos provavelmente resulta da interação iônica entre os resíduos básicos da avidina com os grupos sulfato da heparina (BUSSOLATI e GUGLIOTTA, 1983). Essa interação iônica pode ocorrer tanto com a avidina conjugada a um fluorocromo (FITC, por exemplo) como com

a avidina conjugada à peroxidase, podendo gerar interpretações incorretas caso não se detecte esse fenômeno (BERGSTRESSER, TIGELAAR e THARP, 1984; THARP et al., 1985). Com base nessa literatura e no fato da inespecificidade da reação ter se limitado aos mastócitos, a descrição dos resultados de imunistoquímica para iNOS e TNF- α neste trabalho não incluem essas células e referem-se somente à população de células inflamatórias para as quais o controle negativo mostrou-se negativo.

Os animais normais não apresentaram imunorreatividade para iNOS ou TNF- α (Fig. 5.3.2 A-C). As células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram observadas nos ratos Lewis exibindo os primeiros sinais clínicos da EAN. Sua população tornou-se numerosa durante a fase de agravamento do quadro clínico, diminuiu no decorrer da fase de recuperação e não foi observada nos animais clinicamente recuperados. Conforme o estágio da EAN, essas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram encontradas nas diferentes regiões nervosas analisadas.

Na fase inicial da EAN (G1), poucas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram observadas dentro de vasos sanguíneos situados entre algumas raízes da cauda eqüina (Fig. 5.3.2 D-F) e no tecido epineural e perineural do nervo ciático. Nenhuma célula iNOS⁺ ou duplamente marcada para iNOS e TNF- α foi observada nas raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar (Fig. 5.3.2 G).

Nos animais paraparéticos do grupo G2, células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram encontradas ao redor de vasos sanguíneos localizados entre o segmento da intumescência lombar e as raízes nervosas T12-L3 adjacentes (Fig. 5.3.3 B, E-G). Na cauda eqüina, numerosas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram observadas formando infiltrados perivascularares, dispersas por entre as fibras nervosas (Fig. 5.3.3 A) ou ainda, entre os corpos celulares dos neurônios sensitivos nos gânglios das raízes dorsais (Fig. 5.3.3 D). No nervo ciático, algumas células iNOS⁺/TNF⁺ foram observadas ao redor dos vasos do epineuro e perineuro (Fig. 5.3.3. C, H-J).

Nos animais com paraparesia severa do grupo G3, a população de células iNOS⁺ e TNF- α ⁺ manteve-se numerosa, porém, apresentou-se mais dispersa. Isso foi bem evidente nas raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar e nos gânglios sensitivos dessa região, onde muitas dessas células duplamente marcadas distribuíram-se ao redor dos infiltrados, não restringindo sua localização à proximidade dos vasos (Fig. 5.3.4 B,E). Na cauda eqüina, a dispersão das células iNOS⁺/TNF- α ⁺ resultou em uma maior distribuição das mesmas por entre as fibras nervosas (Fig. 5.3.4 A,D). Apesar da marcação nuclear com DAPI mostrar a presença de infiltrados celularmente mais densos do que na fase anterior, não houve alteração evidente quanto ao número de células

imunomarcadas, a não ser sua distribuição mais uniforme no tecido endoneural. No nervo ciático, porém, houve um evidente aumento na população de células iNOS⁺/TNF- α ⁺. Elas foram observadas dentro e ao redor de vasos sanguíneos e nos numerosos infiltrados inflamatórios distribuídos ao longo do nervo ciático (Fig. 5.3.4 C,F-H).

Na fase de recuperação da EAN (grupo R1), poucas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram evidenciadas em pequenos infiltrados inflamatórios presentes nas raízes da cauda eqüina. Uma população maior destas células pôde ser observada em raríssimos infiltrados celularmente mais densos (Fig. 5.3.5 A). Nos gânglios sensitivos da cauda eqüina e das raízes nervosas T12-L3 não foram encontradas células iNOS⁺/TNF- α ⁺. A ausência dessas células também foi constatada nas raízes nervosas T12-L3, exceto em um dos espécimes, no qual raríssimas células duplamente imunomarcadas foram visualizadas. (Fig. 5.3.5 B). No nervo ciático verificou-se uma acentuada redução na população de células iNOS⁺/TNF- α ⁺. Algumas destas células localizaram-se dentro de vasos sanguíneos entre as fibras nervosas (Fig. 5.3.5 C), enquanto que outras ainda se encontravam dispersas no endoneuro.

Na fase de resolução da EAN (R0) não foram observadas células TNF- α ⁺, iNOS⁺ ou duplamente imunomarcadas em nenhuma das regiões nervosas periféricas analisadas (Fig. 5.3.5 D-F).

É importante ressaltar que os resultados anteriormente mencionados foram observados para todos os animais do mesmo subgrupo experimental. Assim, o mesmo padrão de marcação para iNOS e TNF- α foi verificado em animais que apresentavam a mesma avaliação clínica, apesar destes terem sido sacrificados em diferentes dias após a imunização com o peptídeo SP-26.

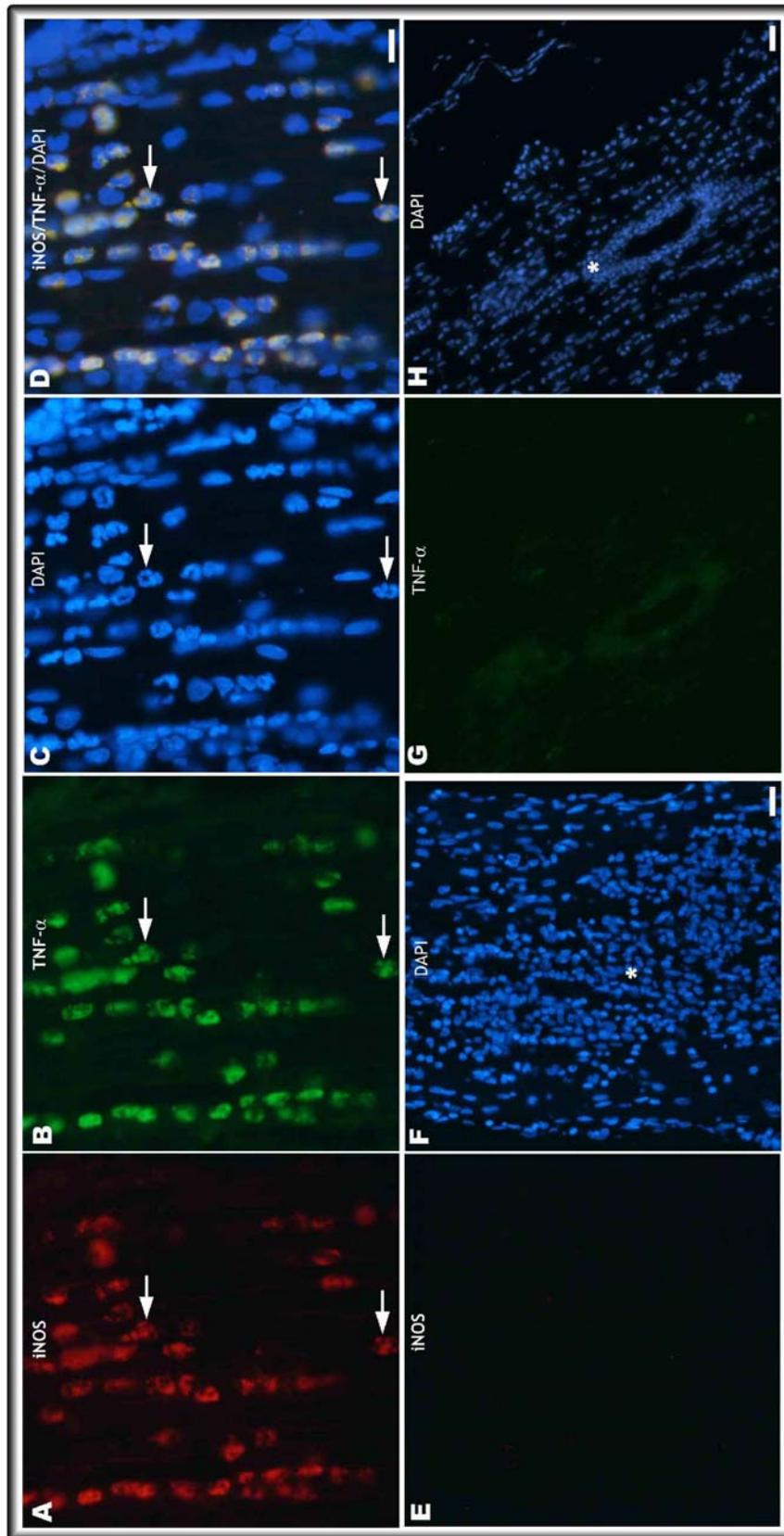


Figura 5.3.1

Fig 5.3.1 – Imunofluorescência para iNOS e TNF- α . Neutrófilos exibindo dupla imunorreatividade para iNOS (A), TNF- α (B) foram identificados (setas) devido ao seu núcleo multilobulado (evidenciado pelo DAPI (setas em C). Em (D), as imagens dos canais vermelho, verde e azul foram sobrepostas, evidenciando a co-localização da imunomarcacão dupla. (E) Controle negativo da reação para iNOS. (F) Canal azul do mesmo campo visual em E, mostrando os núcleos de numerosas células em um infiltrado inflamatório (*). (G) Controle negativo da reação para TNF- α . (H) Canal azul do mesmo campo visual em G, mostrando os núcleos de numerosas células em um infiltrado inflamatório. Barra = 15 μ m (A,B,C,D), 25 μ m (E,F,G,H).

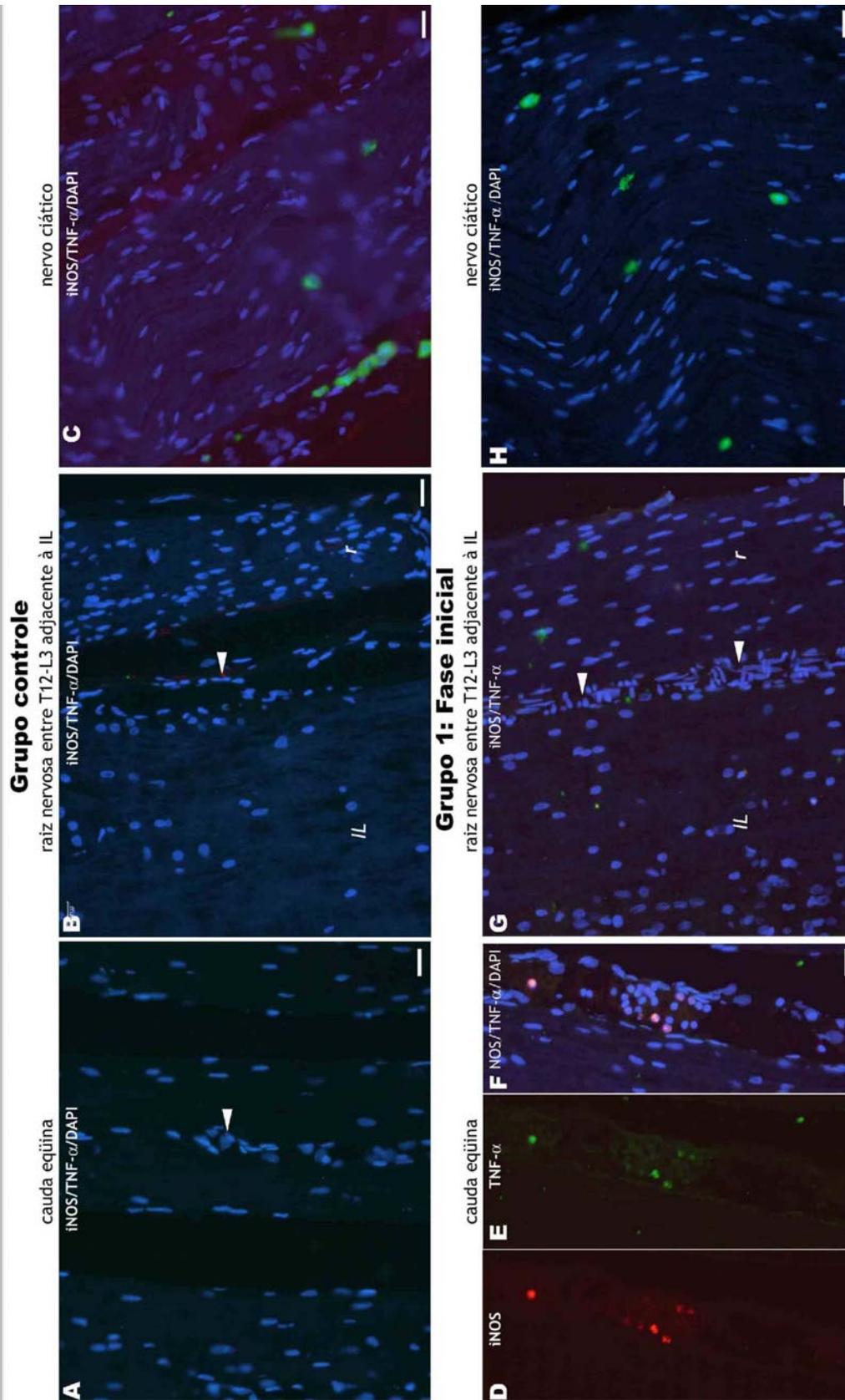


Figura 5.3.2 - Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS (vermelho) e TNF- α (verde) em ratos Lewis normais do grupo controle (A-C) e animais em fase inicial da EAN, grupo G1 (D-H). Núcleos evidenciados pelo DAPI (em azul). Cortes longitudinais de cauda eqüina (A,D-F), de raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar (B,G) e de nervo ciático (C,H). (A) Vaso sangüíneo (\blacktriangleleft) localizado entre duas raízes da *cauda eqüina*. (B) Vaso sangüíneo no tecido conjuntivo entreposto à intumescência lombar (*IL*) e às raízes espinhais (*r*) adjacentes. (C) Aspecto da distribuição e organização dos núcleos da população celular em nervo ciático. Células em verde correspondem a típicos mastócitos marcados inespecificamente pela avidina conjugada ao FITC. (D-F) Células dentro de vaso duplamente imunomarcadas para iNOS (D), TNF- α (E) e a sobreposição de ambas imagens com a contramarcação dos núcleos com DAPI (F). (G) Vaso sangüíneo (\blacktriangleleft) em corte tangencial no tecido conjuntivo entreposto à intumescência lombar (*IL*) e às raízes espinhais (*r*) adjacentes. (H) Ausência de células iNOS ou TNF- α imunorreativas. Apenas alguns esparsos mastócitos são observados em com marcação verde inespecífica. Barra = 25 μ m.

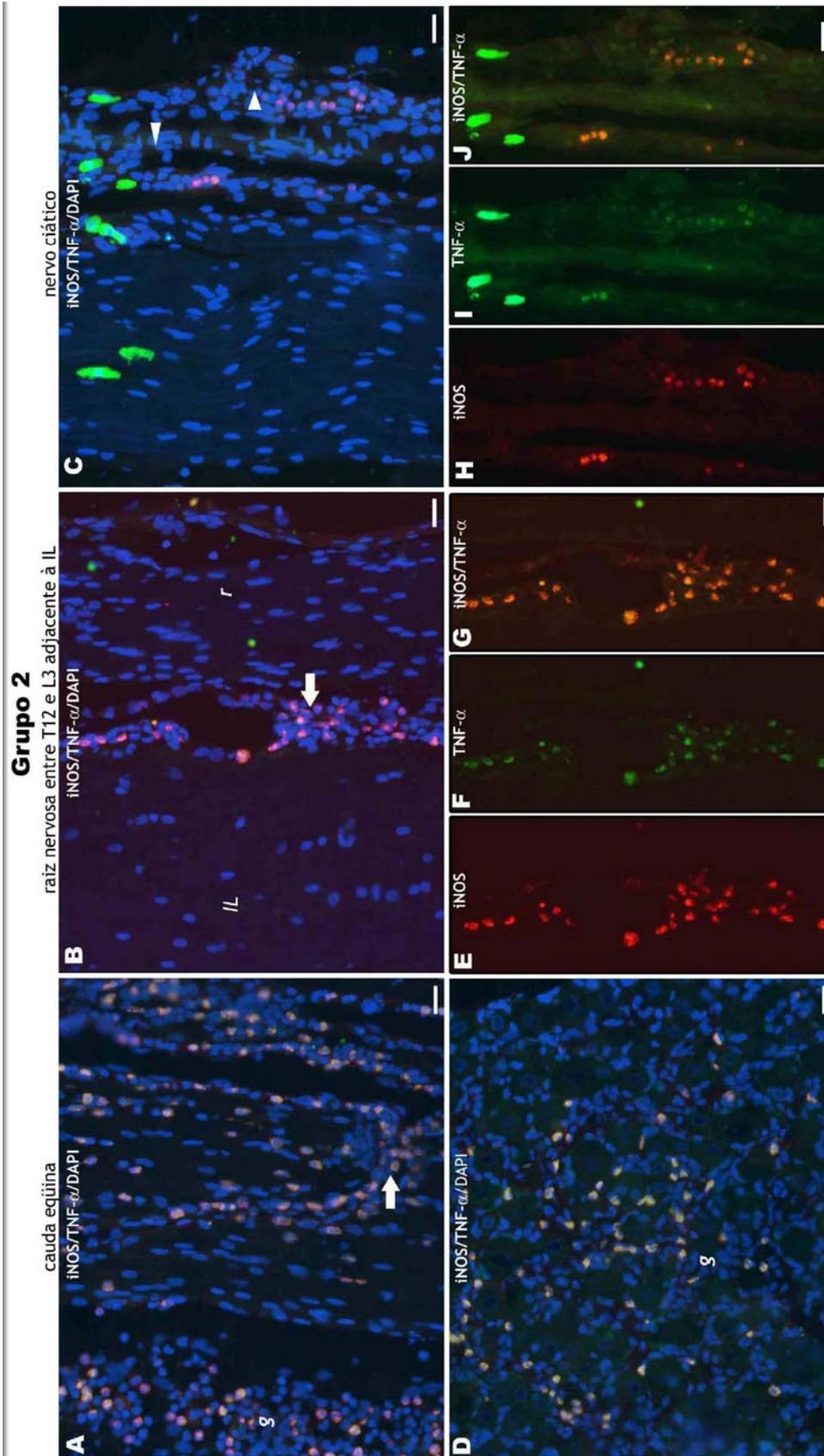


Figura 5.3.3 - Imunofluorescência com dupla marcação para iNOS (em vermelho) e TNF- α (em verde) em ratos Lewis paraparéticos do grupo G2: Núcleos evidenciados com DAPI (em azul). Nas imagens sobrepostas, as células duplamente marcadas para iNOS e TNF- α (iNOS⁺/TNF- α ⁺) são visualizadas em tom alaranjado ou amarelado. Cortes longitudinais de cauda eqüina (A,D), raízes espinhais T12-L3 (B,E-G) e nervo ciático (C,H-J). (A) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ próximas a vasos sanguíneos (\triangleright) formando infiltrados (\Rightarrow). (B) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ ao redor de vaso sanguíneo no tecido conjuntivo entreposto à intumescência lombar (*IL*) e às raízes T12-L3 (*r*) adjacentes. (C) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ próximas a vasos sanguíneos no perineuro/epineuro. Algumas células grandes e verdes (mastócitos) estão presentes entre as fibras nervosas do nervo ciático. (D) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ entre os neurônios de um gânglio de raiz dorsal (*g*). (E-G) Imagens das células evidenciadas em B, mostrando a imunomarcção para iNOS (E), TNF- α (F) e a sobreposição de ambas as imunomarcções (G). (H-J) Imagens das células evidenciadas em C, mostrando a imunomarcção para iNOS (H), TNF- α (I) e a sobreposição de ambas (J). Barra = 25 μ m.

Grupo 3

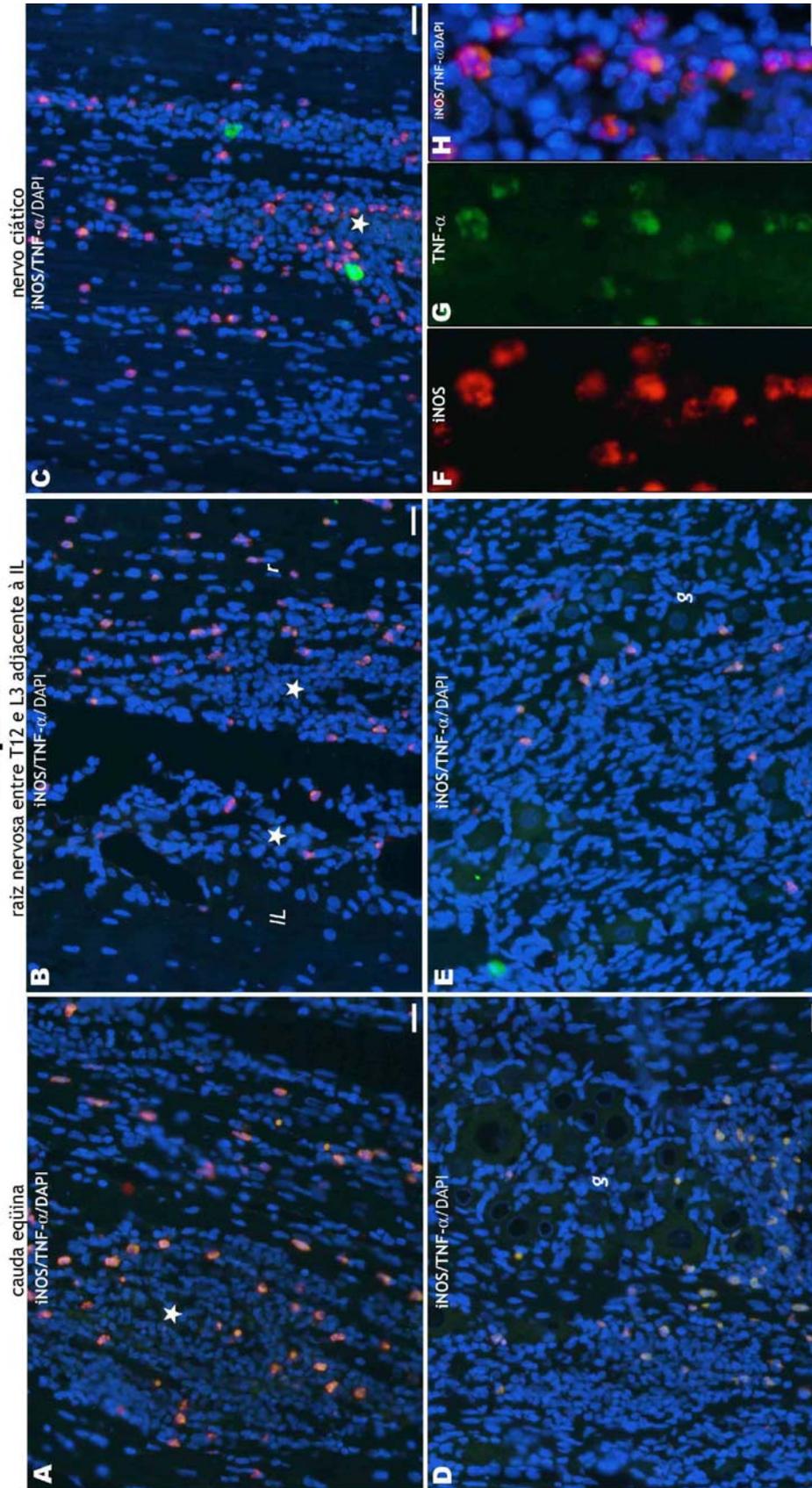
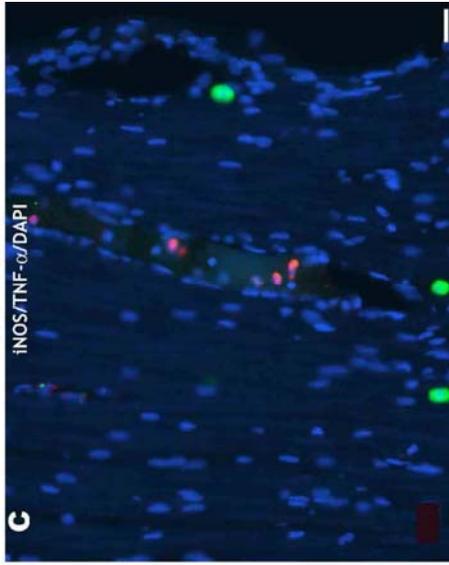
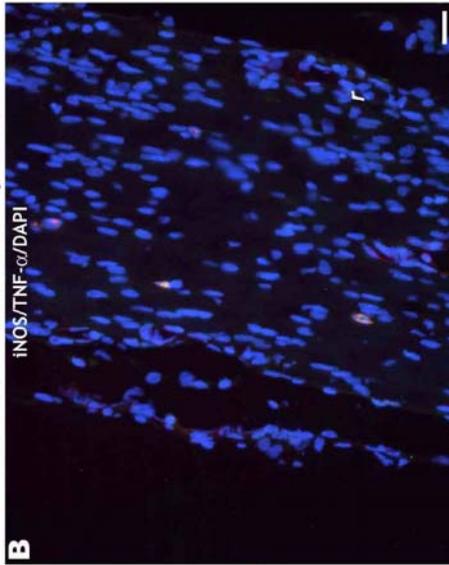
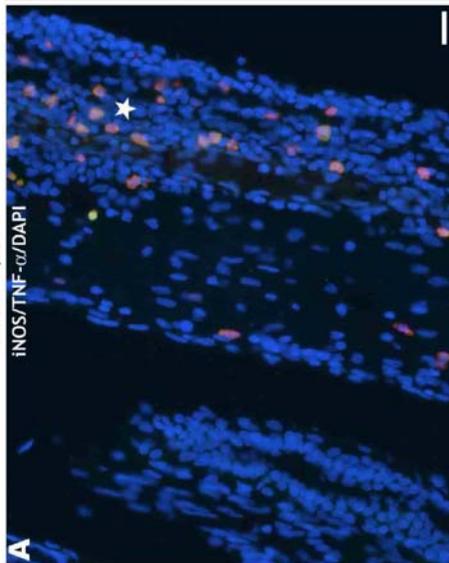


Figura 5.3.4 - Imunofluorescência com dupla marcação para iNOS (em vermelho) e TNF- α (em verde) em ratos Lewis com paraparesia severa do grupo G3. Núcleos evidenciados pelo DAPI (em azul). Nas imagens sobrepostas, as células duplamente marcadas para iNOS e TNF- α (iNOS⁺/TNF- α ⁺) são visualizadas em tom alaranjado ou amarelado. Cortes longitudinais de cauda eqüina (A,D), raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar (B,E) e nervo ciático (C,F-H). (A) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ distribuídas pelos infiltrados inflamatórios (★) e por entre as fibras nervosas. (B) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ distribuídas ao redor de infiltrados nas raízes espinhais (*r*) e no tecido entreposto a estas e à intumescência lombar (*IL*). (C) Numerosas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ distribuídas ao redor de infiltrados localizados entre as fibras nervosas do nervo ciático. Algumas células grandes e verdes (mastócitos com marcação inespecífica) são observadas junto aos infiltrados. (D) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ entre as fibras nervosas de uma raiz dorsal e entre os neurônios de um gânglio sensitivo (*g*) na cauda eqüina. (E) Células iNOS⁺/TNF- α ⁺ próximas aos neurônios de um gânglio sensitivo. (F-H) Imagens com maior aumento de células iNOS⁺/TNF- α ⁺ observadas em C, mostrando a imunomarcação para iNOS (F), TNF- α (G) e a sobreposição de ambas com a marcação dos núcleos (H). Barra = 25 μ m, exceto em F-H (12,5 μ m).

Grupo R1: Fase de Recuperação

raiz nervosa entre T12-L3 adjacente à IL



Grupo R0: Fase de resolução

raiz nervosa entre T12-L3 adjacente à IL

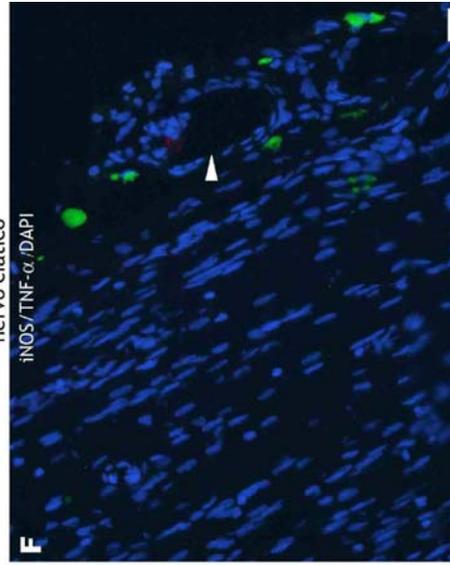
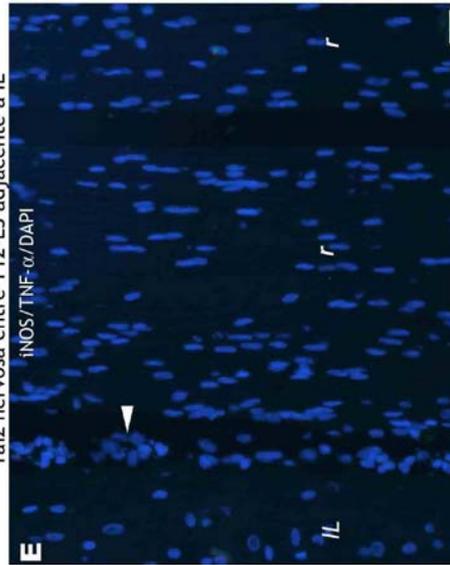
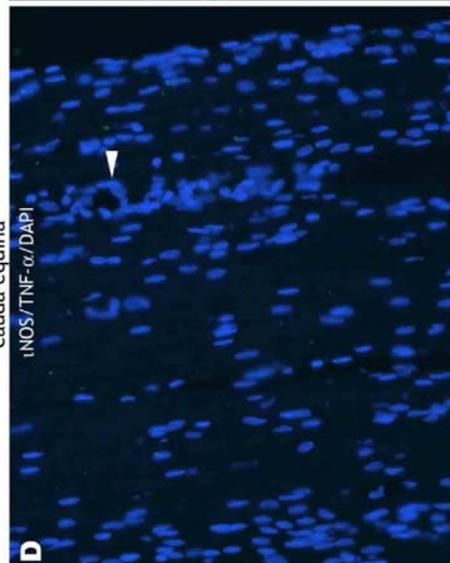


Figura 5.3.5 - Imunofluorescência com dupla marcação para iNOS (em vermelho) e TNF- α (em verde) em ratos Lewis do grupo R1, durante a fase de recuperação (A-C) e do grupo R0, fase de resolução da EAN (D-F). Núcleos evidenciados pelo DAPI (em azul). Nas imagens sobrepostas, as células duplamente marcadas para iNOS e TNF- α (iNOS⁺/TNF- α ⁺) são visualizadas em tom alaranjado ou amarelado. Cortes longitudinais de cauda eqüina (A,D), raízes nervosas entre T12-L3 adjacentes à intumescência lombar (**IL**) (B,E) e nervo ciático (C,F). (A) Presença de um infiltrado inflamatório (\star) com algumas células iNOS⁺/TNF- α ⁺. (B) Raríssimas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ foram encontradas nas raízes nervosas T12-L3 (**r**). (C) No nervo ciático, poucas células iNOS⁺/TNF- α ⁺ são observadas, geralmente presentes em vasos sanguíneos. (D) Ausência de infiltrados ou imunorreatividade para iNOS/TNF- α em raiz da cauda equina. Vaso sanguíneo indicado por uma cabeça de seta. (E) Aspecto das raízes nervosas T12-L3 e ausência de células imunomarcadas para iNOS ou TNF- α . (F) Vaso sanguíneo epineural (\blacktriangleleft) no nervo ciático e mastócitos perivasculares com marcação não-específica em verde. Barra = 25 μ m.

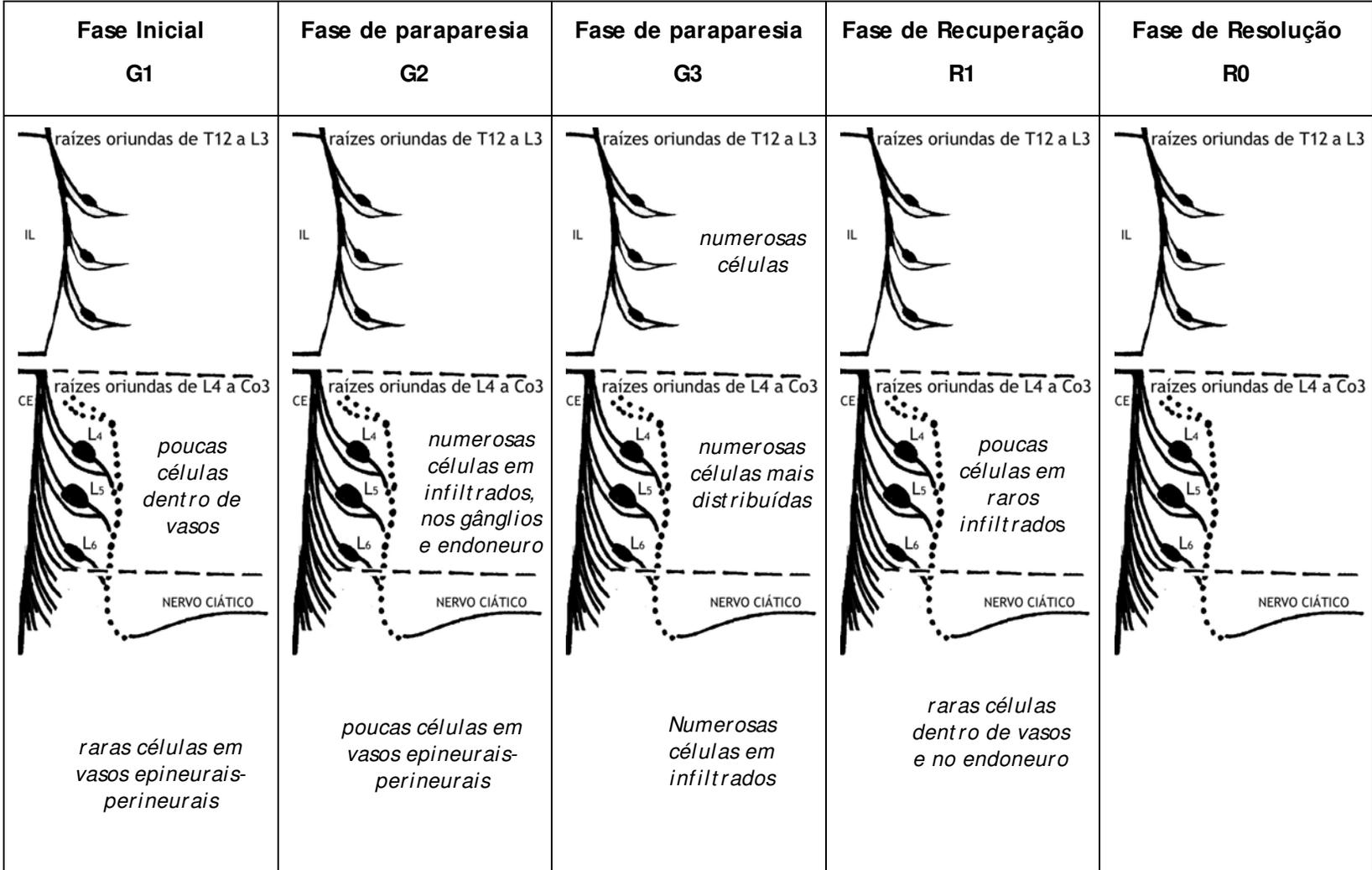


Figura 5.3.6 – Evolução do surgimento de células iNOS⁺/TNF- α ⁺ no SNP de ratos Lewis com EAN. IL = intumescência lombar; CE = cauda eqüina.

5.4. Imunofluorescência para iNOS e macrófagos (ED1⁺)

A imunomarcção dupla para iNOS e ED1 mostrou que parte das células que exibem imunorreatividade para iNOS também apresenta imunorreatividade para ED1 (um antígeno de membrana lisossomal de macrófagos).

Nos animais normais (grupo controle) não foram evidenciadas células iNOS⁺ ou ED1⁺ em nenhum dos espécimes coletados.

Na fase inicial da EAN (grupo G1), poucas células iNOS e ED1 positivas (iNOS⁺/ED1⁺) foram observadas dentro de vasos sangüíneos localizados nas raízes nervosas T12-L3 adjacentes à intumescência lombar, na cauda eqüina (Fig. 5.4.1 A-C) e no nervo ciático.

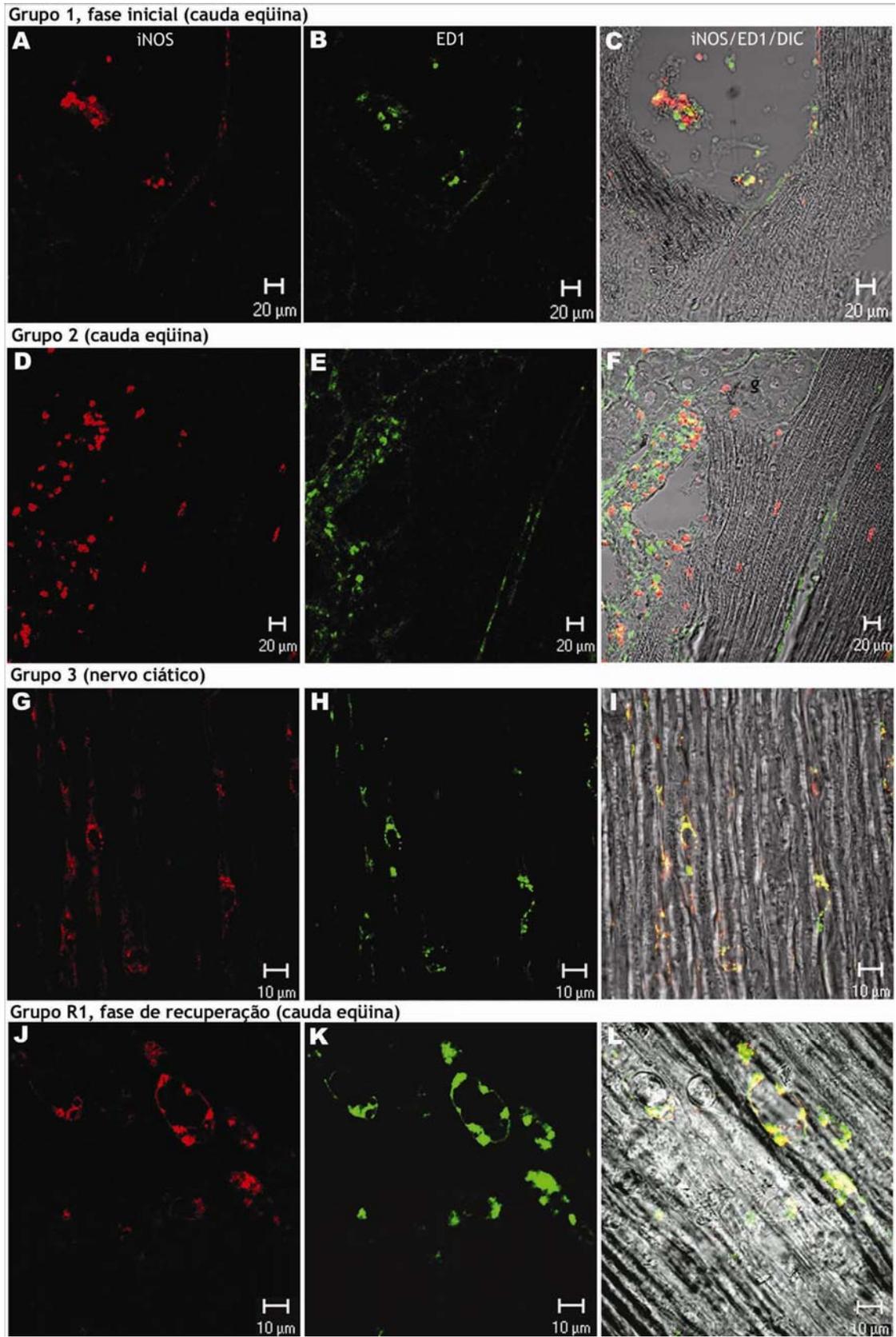
Nos espécimes de animais do grupo G2, uma população maior de células iNOS⁺/ED1⁺ formando infiltrados inflamatórios foi observada próximo a vasos sangüíneos, principalmente na cauda eqüina (região entre o gânglio sensorial e a raiz dorsal) (Fig. 5.4.1 D-F). Também nessa região foram observadas algumas células apenas iNOS⁺ ou apenas ED1⁺.

A análise dos animais do grupo G3 revelou a presença de numerosas células iNOS⁺, ED1⁺ e iNOS⁺/ED1⁺, localizadas principalmente entre as fibras nervosas e em infiltrados inflamatórios nas raízes nervosas T12-L3, na cauda eqüina e no nervo ciático. Em imagens com maior aumento, pôde-se observar a forma ovalada e as extensões citoplasmáticas de macrófagos iNOS⁺/ED1⁺ dispostos entre as fibras nervosas (Fig. 5.4.1 G-I).

Durante a fase de recuperação (grupo R1) verificou-se uma diminuição da população de células iNOS⁺ e iNOS⁺/ED1⁺, principalmente nas raízes nervosas T12-L3. A maioria dessas células foi observada dentro ou ao redor de vasos sangüíneos. Nas raízes da cauda eqüina, algumas células iNOS⁺/ED1⁺ localizadas entre as fibras nervosas apresentaram uma forma ovalada e com aspecto esponjoso (Fig. 5.4.1 J-L).

Na fase de resolução da EAN (grupo R0) não foi observada imunorreatividade para iNOS⁺ nos espécimes analisados. No entanto, algumas células ED1⁺ foram observadas entre as fibras nervosas das raízes nervosas espinhais e do nervo ciático.

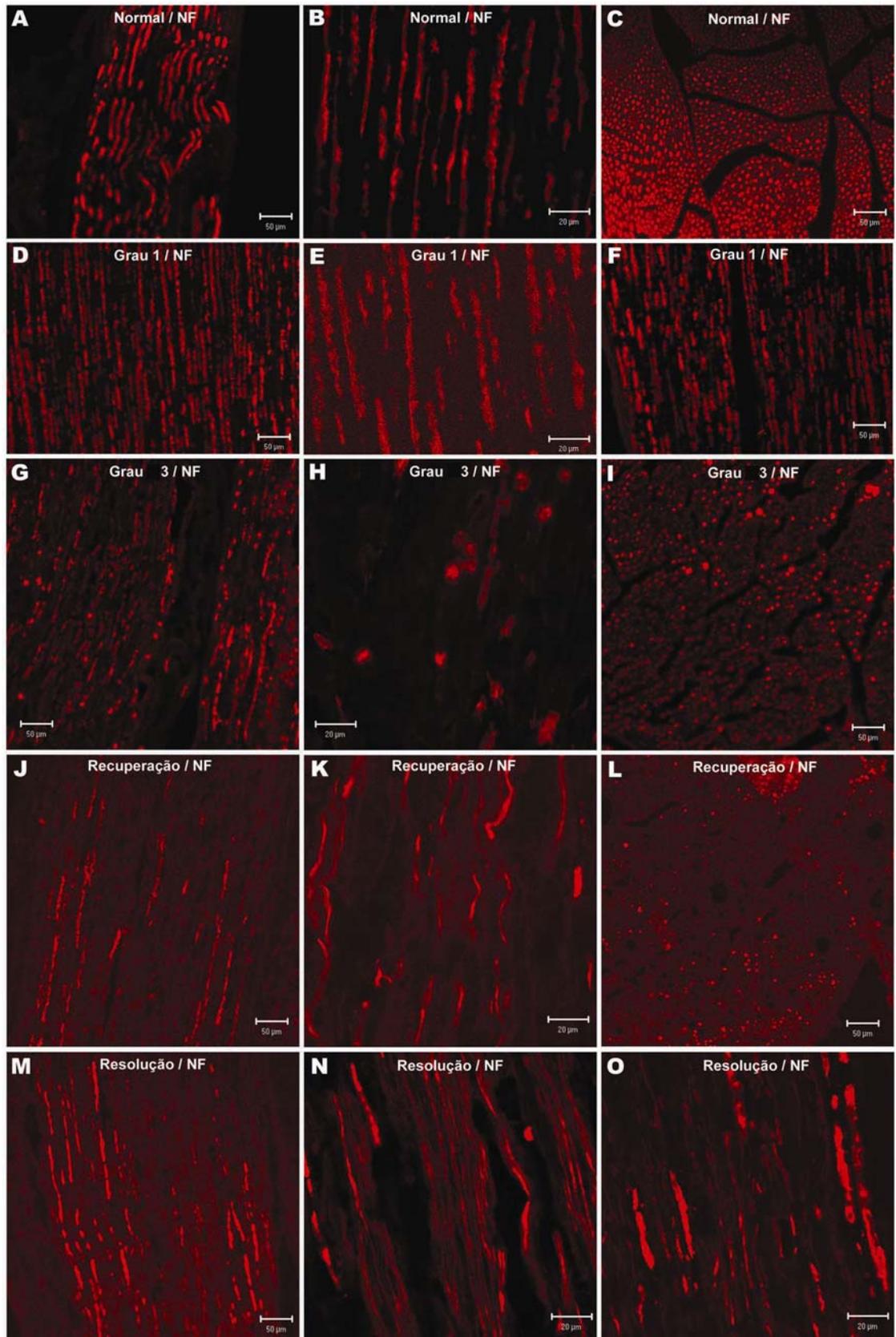
Figura 5.4.1 - Imunofluorescência com marcação dupla para iNOS (em vermelho) e ED1 (em verde) em ratos Lewis durante diferentes fases da EAN. A marcação dupla (em amarelado ou alaranjado) está sobreposta a uma imagem obtida através da técnica de DIC em C, F, I, L. Cortes longitudinais de raízes da cauda eqüina (A-F, J-L) e nervo ciático (G-I). (A-C) Células iNOS⁺ e iNOS/ED1⁺ observadas dentro de vaso situado em uma raiz da cauda eqüina de um animal na fase inicial da EAN. (D-F) No grupo G2, numerosas células iNOS⁺, ED1⁺ e iNOS/ED1⁺ foram observados em infiltrados nas raízes espinhais da cauda eqüina. (**g**) gânglio sensitivo. (G-I) Macrófagos iNOS/ED1⁺ entre as fibras nervosas de uma raiz da cauda eqüina em animal do grupo G3. Esses macrófagos apresentaram uma forma ovalada e prolongamentos citoplasmáticos com imunorreatividade para iNOS e ED1. (J-L) Células iNOS/ED1⁺ de aspecto esponjoso localizado entre as fibras nervosas de uma raiz da cauda eqüina em um animal em recuperação (grupo R1).



5.5. Imunofluorescência para neurofilamentos em nervo ciático

A marcação de neurofilamentos (NF) nos cortes longitudinais apresentou-se sob a forma de filamentos contínuos tanto nos nervos de animais normais como de animais em grau 1 (Fig. 5.5.1 A, B, D-F). Em cortes transversais foram observados axônios marcados intensamente para NF ocupando grande parte do calibre do nervo normal (Fig. 5.5.1 C). Em animais do grupo G3, a imunomarcação tornou-se fragmentada, formando segmentos (menos intensos) e aglomerados de NF marcados (Fig. 5.5.1 G, H). Em corte transversal, a marcação apresentou-se de maneira mais pontual e com lacunidades (Fig. 5.5.1 I). Durante a fase de recuperação (R1), grande parte dos NF marcados voltou a se apresentar como filamentos contínuos, alguns mais grossos e outros, porém mais delgados (Fig. 5.5.1 J, K). O perfil da imunomarcação em corte transversal foi similar ao observado nos animais do grupo G3, porém, com lacunidades maiores (Fig. 5.5.1 L). No período de resolução da EAN (R0) foram observados neurofilamentos marcados formando filamentos contínuos, sendo alguns largos e outros mais finos (Fig. 5.5.1 M-O).

Figura 5.5.1 - Imunofluorescência com marcação para neurofilamentos (NF) (em vermelho) em cortes longitudinais (A, B, D-F, G, H, J, K, M-O) e transversais (C,I,L) de nervo ciático de ratos Lewis normais e com EAN. (A,B) A imunomarcação de NF apresenta-se sob a forma de filamentos contínuos no nervo normal; (C) Observa-se que os NF nos axônios ocupa grande parte do calibre do nervo normal; (D-F) Nervo de animal em grau 1 (grupo G1) com aspecto da imunomarcação similar ao observado no nervo normal; (G, H) Nos animais com grau 3, a imunomarcação torna-se muito fragmentada, inclusive com a presença de aglomerados de NF; (I) A marcação de NF difere da marcação do nervo normal, apresentando-se de maneira muito mais pontual e com lacunidades; (J, K) Durante a fase de recuperação (R1), grande parte dos NF marcados voltam a se apresentar como filamentos contínuos, alguns, porém, mais delgados; (L) O perfil de imunomarcação em corte transversal é semelhante ao observado para o grupo G3, mas com lacunidades maiores. (M-O) No período de resolução da doença (R0) observa-se que a imunomarcação forma filamentos contínuos, alguns mais finos e outros mais largos.



6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo caracterizou a presença da iNOS e do TNF- α em diferentes regiões do sistema nervoso periférico de ratos Lewis durante a EAN. Nesses animais, verificou-se a imunorreatividade dupla para iNOS e TNF- α em macrófagos e neutrófilos. A presença dessas células nas raízes da cauda eqüina, raízes nervosas de T12 a L3, gânglios sensitivos e nervo ciático variou de acordo com o quadro clínico apresentado pelo animal com EAN.

No decurso da EAN, constatou-se que macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, provavelmente neutrófilos, constituíram grande parte das células inflamatórias produtoras de iNOS e TNF- α . Os macrófagos são considerados células efetoras por “desnudarem” e fagocitarem a mielina das fibras nervosas, sendo comumente observados nas lesões desmielinizantes da EAN (BALLIN e THOMAS, 1969). Experimentos que acarretaram depleção dos macrófagos, por exemplo, através da injeção intraperitoneal de partículas de sílica, resultaram na proteção dos animais contra o desenvolvimento e progressão da EAN (CRAGGS, KING e THOMAS, 1984). A ação desmielinizante dos macrófagos provavelmente é mediada por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. A participação de espécies reativas de oxigênio na evolução da EAN foi demonstrada por alguns autores. Hartung e colaboradores (1988) aplicaram as enzimas superóxido dismutase e catalase como antioxidantes enzimáticos em ratos Lewis, no início do processo patológico. Seus resultados demonstraram que essa aplicação efetivamente reduziu os sinais clínicos e eletrofisiológicos da EAN, bem como a desmielinização perivenular e a infiltração de macrófagos. Os mesmos autores verificaram também que macrófagos obtidos de ratos com EAN geravam quantidades muito maiores de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio *ex-vivo* do que os macrófagos de ratos não-imunizados. Assim, eles mostraram que espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos estavam envolvidas com a deficiência funcional e as lesões teciduais na EAN.

Além disso, os macrófagos ativados liberam uma grande variedade de citocinas, entre elas o TNF- α , que é capaz de causar desmielinização e degeneração axonal (SELMAJ et al., 1991a; REDFORD, HALL e SMITH et al., 1995). Stoll e colaboradores (1993b) observaram que na EAN, os macrófagos aderentes às paredes dos vasos e às fibras nervosas apresentam imunorreatividade para TNF- α , contrariamente aos macrófagos pós-fagocíticos nos estágios mais avançados da desmielinização. O TNF- α

produzido por esses macrófagos aderentes afetaria a bainha de mielina adjacente e assim contribuiria para a patogênese da EAN. No entanto, a análise feita por esses autores restringiu-se às raízes espinhais ventrais, sem estender-se para outras regiões.

Além dos macrófagos, foram evidenciados neutrófilos imunoreativos para iNOS e TNF- α , identificados com base na morfologia típica de seu núcleo multilobulado. Essas células polimorfonucleadas foram observadas principalmente nas fases iniciais da EAN, sendo localizadas dentro de vasos, perivascularmente e no tecido endoneural. Na fase de recuperação e resolução da EAN, essas células raramente foram encontradas. Embora os infiltrados de polimorfonucleares não sejam frequentemente descritos nos casos de GBS ou de EAN induzida pela imunização com mielina, essas células devem ter uma importante participação na patogênese desses processos inflamatórios. Os polimorfonucleares podem atuar na quebra da barreira hemato-nervosa (BNB), pois estão associados ao aumento da permeabilidade vascular em modelos de lesão mecânica e à morte de células endoteliais (VARANI et al., 1994). Além disso, alguns autores relacionaram essas células à patogênese e à fase efetora da EAE (MÄÄTTÄ et al., 1998; McCOLL et al., 1998). Outros autores também relataram a presença de polimorfonucleares nos infiltrados inflamatórios da EAN (IZUMO et al., 1985; HADDEN et al., 2002). Hadden e colaboradores (2002) observaram numerosos leucócitos polimorfonucleares, provavelmente neutrófilos, no endoneuro de animais nos primeiros estágios da EAN, utilizando o modelo de EAN induzido passivamente (AT-EAN). Nossos resultados ressaltam a importância dos neutrófilos na EAN induzida com o peptídeo SP26, uma vez que essas células produzem iNOS e TNF- α , duas moléculas de ampla ação nas doenças auto-imunes.

No início dos sinais clínicos da EAN, macrófagos e neutrófilos foram encontrados em infiltrados inflamatórios nas raízes da cauda eqüina, especialmente próximo à região de transição entre as raízes dorsais e os gânglios sensitivos. Dentre as diferentes estruturas envolvidas na formação do nervo periférico, as raízes são mais suscetíveis à inflamação, sendo afetadas antes do nervo periférico correspondente. A maior susceptibilidade das raízes dorsais ao início do processo inflamatório desmielinizante e à passagem de moléculas nocivas durante a EAN foi constatada por vários autores e pode estar associada à variação da permeabilidade da barreira hemato-nervosa (BNB) (HAHN, FEASBY e GILBERT, 1985; HO, MCKHANN e GRIFFIN, 1998). Assim como o sistema nervoso central, o sistema nervoso periférico está resguardado do trânsito livre de proteínas e outras macromoléculas do sangue para o endoneuro através da BNB. No entanto, essa

barreira não é tão restritiva como a barreira hemato-encefálica (BBB), de modo a permitir a passagem para o espaço endoneural, de pequenas quantidades de proteínas circulantes, tais como albumina, imunoglobulinas e enzimas. A BNB não é homogênea em todo o sistema nervoso periférico. No nervo, o perineuro é constituído por várias camadas de células perineurais e tecido conjuntivo denso ordenado, enquanto que os capilares endoneurais apresentam junções de oclusão e não possuem fenestras. Nas raízes nervosas, alguns trabalhos mostraram que a BNB é mais permeável do que nos nervos periféricos. Além das bainhas das raízes serem mais finas, alguns capilares endoneurais apresentam endotélio fenestrado, principalmente aqueles localizados próximo ou dentro dos gânglios sensitivos (KIERNAN, 1996). Essas características levam alguns autores a considerarem que os gânglios das raízes dorsais (DRG) estão desprovidos de uma BNB como a que se encontra no nervo periférico (ROSEN et al., 1990; DEVOR, 1999). Essas diferenças de permeabilidade entre as raízes nervosas, gânglios e nervo periférico favorece a passagem de moléculas envolvidas na patogênese da EAN, o que por sua vez resulta na ativação de sinais quimiotáticos para as células inflamatórias.

No nervo ciático, onde uma BNB mais efetiva deve retardar um processo inflamatório local, a contribuição dos mastócitos para a quebra da BNB também deve ser considerada. Nossos resultados mostraram a presença de muitos mastócitos no tecido conjuntivo dos nervos ciáticos, enquanto que raros mastócitos foram observados na cápsula que envolve o DRG e no tronco nervoso pós-ganglionar. Se por um lado, as raízes nervosas e os gânglios são mais permeáveis do que o nervo ciático devido a certos aspectos da BNB, por outro, o nervo ciático é mais propenso à quebra da BNB através da ação de numerosos mastócitos perivascularres. Alguns autores sugeriram que a susceptibilidade dos ratos Lewis à indução usual da EAN pode estar relacionada aos grandes números de mastócitos no SNP nesta linhagem. (JOHNSON et al., 1991). Além disso, há evidência de que os mastócitos do sistema nervoso estejam envolvidos na patogênese da EAN e também da EAE (BROSNAN et al., 1985; DINES e POWELL, 1997; SECOR et al., 2000).

A presença de iNOS e TNF- α nos gânglios sensitivos durante a EAN não havia sido relatada por outros autores. Além dessas moléculas, a presença de macrófagos, neutrófilos e mastócitos nos DRG durante a EAN fortemente sugere que os animais afetados pela EAN desenvolvam dor neuropática. Sabe-se que o TNF- α está associado a respostas nociceptivas causando hiperalgesia, e por isso, é alvo de extensos estudos em diferentes modelos de lesão (SEKIGUCHI, KIKUCHI e MYERS, 2004; OHTORI et al., 2004).

Recentemente, Moalem-Taylor e colaboradores (2007) verificaram que ratos imunizados ativamente com P2 desenvolveram hiperalgesia térmica (diminuição do limiar da dor frente a um estímulo térmico) e alodinia mecânica (percepção de dor a estímulo mecânico comumente não doloroso). Em nosso laboratório, experimentos preliminares com o teste de *tail flick* também mostraram alterações na resposta nociceptiva a um estímulo térmico durante a evolução da EAN (observações pessoais). Essas observações tornam a EAN um modelo apropriado para o estudo da dor experimentada pelos pacientes com a síndrome de Guillain Barré. No entanto, a participação da iNOS e do TNF- α nesse processo ainda não foi investigada. Por outro lado, a presença de iNOS nos gânglios sensitivos afetados pela EAN e a conseqüente produção de NO podem acarretar neurodegeneração induzida pela neurotoxicidade, colapso energético e morte celular. Isso poderia explicar as deficiências de sensibilidade em alguns pacientes afetados pela Guillain-Barré.

Um importante achado deste trabalho é a correlação entre a distribuição topográfica das células iNOS e TNF- α imunorreativas e a evolução clínica da EAN. Isso sugere que a produção local dessas moléculas deva contribuir para as alterações neurológicas observadas. De acordo com a relação topográfica entre medula espinhal, raízes dorsais e coluna vertebral (HEBEL e STROMBERG, 1986), a região analisada da cauda eqüina incluiu as raízes dorsais e ventrais oriundas do segmento medular L4 a Co3 e os gânglios sensitivos L4 a L6. Dessa forma, ela abrangeu as raízes motoras e sensitivas responsáveis pela composição do nervo ciático (oriundas de L3 a L6 ou S1), além das raízes nervosas responsáveis pela inervação motora dos músculos da cauda (oriundas de L4 a Co3).

Na fase inicial da EAN, células imunorreativas para iNOS/ TNF- α foram encontradas em vasos situados entre algumas raízes nervosas da cauda eqüina. Várias destas raízes são responsáveis pela inervação dos músculos da cauda. Considerando-se a estrutura do envoltório das raízes (mencionada anteriormente) e a proximidade das células iNOS/ TNF- α -imunorreativas com as fibras nervosas, sugere-se que o NO produzido possa interferir de modo reversível na condução do impulso nervoso, acarretando a perda do tônus caudal (REDFORD, KAPOOR e SMITH, 1997). No nervo ciático, porém, o NO produzido pelas células imunorreativas dentro de alguns vasos epineurais não deve ter sido capaz de atingir e afetar as fibras nervosas, visto que a organização de seus envoltórios dificultaria sua difusão. Quanto às raízes que originam o nervo ciático, elas ainda não devem ter sido funcionalmente afetadas nesta fase, uma

vez que nenhuma célula imunorreativa para iNOS foi observada próxima aos gânglios sensitivos, local mais susceptível à infiltração celular.

A produção de NO e de TNF- α pelas células inflamatórias logo no início dos sinais clínicos da EAN pode atuar na quebra da barreira hemato-nervosa, facilitando o recrutamento de outras células e contribuindo para o agravamento da EAN (TAYLOR e POLLARD, 2007). Nossos dados reforçam essa hipótese, evidenciando nas fases posteriores, o recrutamento de uma maior população de células inflamatórias contendo iNOS e TNF- α . O aumento desta população nos vasos da cauda eqüina provavelmente resulta na produção de altas concentrações de NO, capazes de afetar muitas fibras nervosas, inclusive as responsáveis pela formação do nervo ciático. Essas observações, juntamente com a presença de células contendo iNOS e TNF- α em vasos entreposto ao segmento da intumescência lombar e às raízes T12-L6 adjacentes, descrevem um quadro fisiopatológico condizente com a paraparesia exibida pelos animais.

Considerando-se a anatomia do rato, as raízes nervosas adjacentes ao segmento da intumescência lombar correspondem às raízes dorsais e ventrais oriundas do segmento medular T12 a L3. As fibras nervosas das raízes originadas dos segmentos L1 a L3 formam os nervos do plexo lombar envolvidos na inervação de alguns músculos do quadril e da coxa, ao passo que as fibras oriundas dos segmentos T12 e T13 inervam músculos da parede abdominal, o músculo cremaster externo, o escroto e a pele perivulvar (HEBEL e STROMBERG, 1986). Nos animais obtidos em grau 3 e que portanto, apresentam uma paraparesia severa, o agravamento do quadro clínico é coerente com a ampla distribuição das células contendo iNOS e TNF- α nos infiltrados perivascularares do nervo ciático, ao longo das raízes nervosas da cauda eqüina e nas raízes oriundas de segmentos mais altos, responsáveis por inervar a musculatura da coxa e do quadril do rato. Nesta fase da EAN, os resultados referentes à histoquímica de Sudan Black evidenciaram a desmielinização de fibras nervosas, principalmente no nervo ciático. De acordo com Redford e seus colaboradores (1997), axônios desmielinizados e em início de remielinização também têm a condução do impulso nervoso bloqueado pelo NO. Paralelamente ao possível bloqueio da condução nervosa, o NO produzido pelas células imunorreativas para iNOS/ TNF- α também pode atuar no processo de desmielinização, contribuindo para o agravamento da EAN. Em trabalho recente verificamos que camundongos C57BL/6 nocauteados para iNOS apresentaram reduzida produção de TNF- α no sistema nervoso central e uma significativa redução na gravidade dos sinais clínicos na fase aguda da encefalomielite auto-imune experimental (EAE) (FARIAS et al., 2007).

Mostramos que o TNF- α e o NO agem sinergicamente no processo de dano à mielina, confirmando as observações de outros autores sobre a atuação desses mediadores inflamatórios na destruição da mielina e de oligodendrócitos (SELMAJ et al., 1991b).

À medida que os sinais clínicos da EAN regrediram, ocorreu a diminuição da quantidade de células inflamatórias iNOS/ TNF- α -imunorreativas, concomitantemente à redução do tamanho e do número dos infiltrados. À semelhança do relatado por outros autores em relação aos infiltrados, esta redução foi primeiramente observada nas raízes de níveis mais altos (da porção da intumescência lombar) e depois nas raízes da cauda equina (HADDEN et al., 2002; ROSEN et al., 1990). Na fase de recuperação (animais em grau 1), a imunoistoquímica revelou raras células imunorreativas para TNF- α e iNOS, presentes no interior de vasos. Por outro lado, a histoquímica de Sudan Black evidenciou o auge do processo de fragmentação e degradação da mielina no nervo ciático, fenômeno também mencionado por outros autores (SCHOTT et al., 1988).

Nos animais na fase de resolução da EAN, nenhuma célula duplamente imunorreativa foi observada. Observou-se também a presença de raras fibras fragmentadas, além de fibras com delgadas bainhas de mielina, indicativo de remielinização. Esses resultados reforçam a hipótese de que moléculas como o NO, liberadas nos locais de inflamação, sejam responsáveis pela deficiência motora na EAN através de sua atuação no bloqueio da condução nervosa (HADDEN et al., 2002). Paralelamente, a atuação do NO no início do processo desmielinizante e sua associação com o agravamento dos sinais clínicos também deve ser considerada.

Nossos dados mostram que o NO deve estar envolvido na patogênese da EAN, uma vez que a isoforma iNOS está presente em macrófagos logo no início dos sinais clínicos e tem sua presença ampliada à medida que essas células são recrutadas. Conti et al. (2004) observaram a expressão dessa isoforma concomitantemente ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos, mas somente nas raízes espinhais ventrais. No entanto, por meio de imunocitoquímica e microscopia eletrônica, eles evidenciaram essa isoforma em macrófagos, células de Schwann e linfócitos. Estes autores sugeriram que a expressão de iNOS nas raízes nervosas teria um importante papel na patogênese da desmielinização do sistema nervoso periférico mediada por células, exercendo uma possível e relevante ação citotóxica contra o axônio. Lee e Shin (2002) verificaram no nervo ciático a expressão protéica aumentada da iNOS no pico da EAN, seguido de uma diminuição na fase de recuperação. Por meio de imunoistoquímica, os macrófagos foram identificados como principais produtores de iNOS, enquanto que as células endoteliais e as células de

Schwann apresentaram-se imunomarcadas para a eNOS. Esses autores sugeriram um papel regulatório benéfico da iNOS, eNOS e do NO produzido na EAN. Utilizando técnica de TUNEL e marcadores fluorescentes para células necróticas e apoptóticas, esses autores propuseram que o NO poderia atuar na supressão da proliferação celular ou indução da apoptose, contribuindo assim para a fase de recuperação da EAN. Provavelmente, o NO exerça diferentes funções no desenvolvimento da EAN, conforme o local e a fase do processo patológico em que é produzido, o que dificulta a análise de sua atuação. O envolvimento da NOS na patogênese da EAN foi investigado por Zielasek e colaboradores (1995), que administraram diferentes inibidores para essas isoformas em ratos Lewis induzidos ativamente e passivamente para EAN. Na EAN induzida passivamente, eles observaram uma redução significativa na gravidade dos sinais clínicos e nos infiltrados celulares do nervo ciático através da administração de inibidores não-seletivos para as 3 isoformas, como o N-monometilarginina (NMMA) e o nitro-arginina-metilester ou L-NAME. No entanto, na indução por imunização ativa, os inibidores não alteraram a evolução do processo patológico.

Paralelamente ao processo desmielinizante que acomete o tecido nervoso periférico, graus variáveis de degeneração axonal também podem ser observados na evolução da EAN. O grau de degeneração axonal está relacionado com a forma de indução da EAN, a concentração da mielina ou do peptídeo neuritogênico inoculado e a região analisada do sistema nervoso periférico (HAHN et al., 1991).

Nossos dados de imunofluorescência para neurofilamentos (NF) no nervo ciático mostraram diferentes perfis de marcação nos diferentes estágios da EAN. As alterações foram evidentes no momento anterior à fase de pico da EAN, quando então a imunomarcagem de NF apresentou-se fragmentada ou aglomerada, perdendo o aspecto contínuo observado nos axônios do nervo normal. Nos cortes transversais do nervo ciático verificou-se uma marcação menos intensa e com maior lacunidade que a marcação intensa e homogênea exibida pelo nervo normal. Na fase de recuperação, essa lacunidade foi ainda maior e correspondeu ao pico de desmielinização no nervo. Um padrão semelhante de marcação é observado durante a degeneração Walleriana (DW) no coto distal de um nervo periférico seccionado. A DW caracteriza-se pelo colapso do citoesqueleto axonal e pela fragmentação e degradação da bainha de mielina por células de Schwann e macrófagos (GRIFFIN e HOFFMAN, 1993). Durante a primeira semana de degeneração os NF, vão se fragmentando em segmentos cada vez menores até formarem aglomerados dispersos ao longo do nervo (DE LA HOZ et al., 2003). Em casos severos da

Síndrome de Guillain Barré, bem como em alguns modelos de EAN, também foi relatada a ocorrência de DW (HAHN et al., 1991; POWELL et al., 1991). A técnica imunistoquímica empregada é indicativa da ocorrência de degradação dos neurofilamentos. Contudo, ela não demonstra o processo em si. Para esta imunistoquímica empregou-se um anticorpo monoclonal específico para epítomos fosforilados das subunidades que formam os NF. Com isso, alterações na imunomarcaçãõ destes elementos representam a princípio, alterações no seu estado de fosforilação. Os eventos decorrentes da defosforilação dos NF podem limitar-se a mudanças na organização estrutural ou resultar na sua degradação. As interações entre as subunidades que formam os NF ou entre os próprios NF e as estruturas vizinhas, bem como a dinâmica do citoesqueleto, dependem dos sítios de fosforilação das subunidades M e H dos neurofilamentos (NIXON e SHAG, 1991; WAEGH, LEE e BRADY, 1992). Por outro lado, sabe-se também que NF defosforilados são susceptíveis à degradação por proteases dependentes de cálcio, como por exemplo, as calpaínas (SCHLAEPFER, 1987; MELLER, EYSEL e SCHMIDT-KASTNER, 1994).

A imunomarcaçãõ de epítomos defosforilados nos NF e a observaçãõ dos nervos através de microscopia eletrônica, por exemplo, poderiam confirmar se a mudançãõ do estado de fosforilação dos NF durante a EAN observada em nossos resultados está associada à sua degradação ou a alterações estruturais que interferem na formaçãõ dos próprios neurofilamentos. No entanto, com base na temporalidade dos resultados morfológicos obtidos e na descriçãõ histopatológica feita por alguns autores (HAHN et al., 1991), deduziu-se que essas alterações não devem estar associadas à ocorrência de degeneraçãõ axonal.

É reconhecidamente importante a influênciã da célula de Schwann sobre a regulaçãõ da organizaçãõ axonal e do calibre axonal. De acordo com Waegh, Lee e Brady (1992), nas regiões desmielinizadas o calibre axonal é menor devido à maior compactaçãõ dos neurofilamentos. Esta compactaçãõ ou aproximaçãõ dos neurofilamentos, por sua vez, se deve à defosforilaçãõ de suas subunidades. Os mecanismos de controle do estado de fosforilaçãõ dos NF não estão bem estabelecidos, mas envolvem a interaçãõ da bainha de mielina e da célula de Schwann com o axônio, provavelmente através da modulaçãõ de enzimas quinases e fosfatases. Assim, propõe-se que o processo inflamatório auto-imune que acarreta intensa desmielinizaçãõ das fibras nervosas conduza a alterações na organizaçãõ estrutural dos NF axonais, ao menos neste

modelo de EAN estudado. Estas alterações estruturais, por sua vez, podem contribuir para os sinais clínicos observados.

O modelo de EAN estudado caracterizou-se pelo baixo grau de degeneração axonal e pelo moderado processo desmielinizante perivascular e multifocal das raízes espinhais e do nervo ciático. Por outro lado, as alterações morfofuncionais nos neurofilamentos indicam a influência do processo inflamatório na interação entre célula de Schwann-mielina-axônio.

A correlação entre a evolução clínica da EAN e a presença de diferentes células produtoras de iNOS e TNF- α reforça a importância em se investigar os mecanismos de ação dessas moléculas, bem como os mecanismos envolvidos na sua regulação. O estudo da interação dessas moléculas com seus receptores (no caso do TNF- α) e com as citocinas envolvidas na EAN é importante para que se compreenda melhor a participação das mesmas no surgimento, desenvolvimento e resolução do processo patológico.

Futuras pesquisas devem considerar a complexidade biológica associada à iNOS e ao TNF- α ao buscarem novos tratamentos para os processos inflamatórios auto-imunes entre elas a esclerose múltipla e a síndrome de Guillain Barré.

7. CONCLUSÕES GERAIS

7. CONCLUSÕES GERAIS

- Durante a EAN, células inflamatórias contendo iNOS e TNF- α distribuem-se no nervo ciático, nas raízes espinhais ventrais e dorsais de diferentes níveis e também nos gânglios sensitivos.
- A presença da iNOS e do TNF nos gânglios sensitivos provavelmente acarreta alterações nociceptivas durante a EAN.
- O surgimento e a gravidade dos sinais clínicos da EAN estão correlacionados com a localização e o tamanho da população de células inflamatórias contendo iNOS e TNF- α no tecido nervoso periférico. A presença da iNOS e a provável produção de NO podem alterar o funcionamento normal das fibras nervosas.
- Dentre as células inflamatórias, macrófagos ativados e neutrófilos apresentam iNOS e TNF- α , o que os torna um importante componente associado à evolução clínica da EAN.
- No nervo ciático, alterações morfofuncionais no citoesqueleto axonal ocorrem nos animais com paraparesia severa e em fase de recuperação, concomitantemente ao acentuado processo desmielinizante. Essas alterações provavelmente são decorrentes da desestabilização da interação célula de Schwann-mielina-axônio e não de processo degenerativo axonal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, Set. 2003.

ALTER, M. The Epidemiology of Guillain-Barré-Syndrome. **Annals of Neurology**, v. 27p. S7-S12, 1990.

ARCHELOS, J. J.; MAURER, M.; JUNG, S.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Suppression of Experimental Allergic Neuritis by An Antibody to the Intercellular-Adhesion Molecule Icam-1. **Brain**, v. 116, n. 5, p. 1043-1058, Out. 1993.

ARMATI, P. J.; POLLARD, J. D. Immunology of the Schwann cell. **Baillieres Clinical Neurology**, v. 5, n. 1, p. 47-64, Mar. 1996.

ARMSTRONG, R. The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1501-1512, Ago. 2001.

ARNASON, B. G. W.; SOLIVEN, B. Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. (Eds.) **Peripheral neuropathy**. 3a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. v. 2, Cap. 80, p. 1437-1497.

ASBURY, A. K.; ARNASON, B. G.; ADAMS, R. D. The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis: its role in pathogenesis. **Medicine**, v. 48, p. 173-215, 1969.

ASBURY, A. K.; ARNASON, B. G.; KARP, H. R.; McFARLIN, D. E. Criteria for diagnosis of Guillain-Barré syndrome. **Annals of Neurology**, v. 3, p. 565-566, 1978.

ASBURY, A. K. Guillain-Barré-Syndrome - Historical Aspects. **Annals of Neurology**, v. 27, p. S2-S6, 1990.

ASBURY, A. K.; CORNBATH, D. R. Assessment of Current Diagnostic-Criteria for Guillain-Barré-Syndrome. **Annals of Neurology**, v. 27, p. S21-S24, 1990.

BAI, X. F.; ZHU, J.; ZHANG, G. X.; KAPONIDES, G.; HOJEBERG, B.; VANDERMEIDE, P. H.; LINK, H. IL-10 suppresses experimental autoimmune neuritis and down-regulates T(H)1-type immune responses. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 83, n. 2, p. 117-126, Mai 1997.

BAKER D, BUTLER D, SCALLON BJ, O'NEILL JK, TURK JL, 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. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 9, p. 2040-2048, Set. 1994.

BALLIN, R. H. M.; THOMAS, P. K. Electron Microscope Observations on Demyelination and Remyelination in Experimental Allergic Neuritis .1. Demyelination. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 1969.

BAO, L.; LINDGREN, J. U.; ZHU, Y.; LJUNGGREN, H. G.; ZHU, J. Exogenous soluble tumor necrosis factor receptor type I ameliorates murine experimental autoimmune neuritis. **Neurobiology of Disease**, v. 12, n. 1, p. 73-81, Fev. 2003.

BARON, P.; CONSTANTIN, G.; DANDREA, A.; PONZIN, D.; SCARPINI, E.; SCARLATO, G.; TRINCHIERI, G.; ROSSI, F.; CASSATELLA, M. A. Production of Tumor-Necrosis-Factor and Other Proinflammatory Cytokines by Human Mononuclear Phagocytes Stimulated with Myelin P2-Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 10, p. 4414-4418, Mai 1993.

BARTEN, D. M.; RUDDLE, N. H. Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 51, n. 2, p.123-33, Mai 1994.

BERGSTEINSDOTTIR, K.; KINGSTON, A.; JESSEN, K. R. Rat Schwann cells can be induced to express major histocompatibility complex class II molecules in vivo. **Journal of Neurocytology**, v. 21, n. 5, p. 382-390, Mai. 1992.

BERGSTRESSER, P. R.; TIGELAAR, R. E.; THARP, M. D. Conjugated avidin identifies cutaneous rodent and human mast cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, n. 3, p. 214-218, Set. 1984.

BIDRI, M.; FEGER, F.; VARADARADJALOU, S.; BEN HAMOUDA, N.; GUILLOSSON, J. J.; AROCK, M. Mast cells as a source and target for nitric oxide. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1543-1558, Ago. 2001.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64-76, Fev. 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, Out. 2001.

BONETTI, B.; VALDO, P.; STEGAGNO, C.; TANEL, R.; ZANUSSO, G. L.; RAMARLI, D.; FIORINI, E.; TURAZZI, S.; CARNER, M.; MORETTO, G. Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. **Journal of Neuropathology Experimental Neurology**, v. 59, n. 1, p. 74-84, Jan. 2000.

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**, v. 6, n. 3, p. 271-282, Mai. 2002.

BRENNER, T.; BROCKE, S.; SZAFER, F.; SOBEL, R. A.; PARKINSON, J. F.; PEREZ, D. H.; STEINMAN, L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 158, n. 6, p. 2940-2946, Mar. 1997.

BRETTLE, R. P.; GROSS, M.; LEGG, N. J.; LOCKWOOD, M.; PALLIS, C. Treatment of acute polyneuropathy by plasma exchange. **Lancet**, v. 2, n. 8099, p. 1100, Nov. 1978.

BROSMAN, C. F.; LYMAN, W. D.; TANSEY, F. A.; CARTER, T. H. Quantitation of mast cells in experimental allergic neuritis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 44, n. 2, p. 196-203, Mar. 1985.

BROSNAN, J. V.; FELLOWES, R.; CRAGGS, R. I.; KING, R. H. M.; BOWLEY, T. J.; THOMAS, P. K. Changes in Lymphocyte Subsets During the Course of Experimental Allergic Neuritis. **Brain**, v. 108, n. 2, p. 315-334, Jun. 1985.

BROSTOFF, S. W.; LEVIT, S.; POWERS, J. M. Induction of Experimental Allergic Neuritis with A Peptide from Myelin-P2 Basic-Protein. **Nature**, v. 268, n. 5622, p. 752-753, 1977.

BROSTOFF, S. W.; POWERS, J. M.; WEISE, M. J. Allergic encephalomyelitis induced in guinea pigs by a peptide from the NH₂-terminus of bovine P2 protein. **Nature**, v. 285, n. 5760, p. 103-104, Mai. 1980.

BUSSOLATI, G.; GUGLIOTTA, P. Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC). **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 1419-1421, Dez. 1983.

CASTRO, F. R.; FARIAS, A. S.; PROENCA, P. L.; DE LA HOZ, C.; LANGONE, F.; OLIVEIRA, E. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. The effect of treatment with crotafotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 299-305, Mar. 2007.

CHEN, Y.; KUCHROO, V. K.; INOBE, J.; HAFNER, D. A.; WEINER, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, v. 265, n. 5176, p. 1237-1240, Ago. 1994.

CHIA, L. S.; THOMPSON, J. E.; MOSCARELLO, M. A. Changes in lipid phase behaviour in human myelin during maturation and aging. Involvement of lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 157, n. 1, p. 155-158, Jun. 1983.

CIFONE, M. G.; ULISSE, S.; SANTONI, A. Natural killer cells and nitric oxide. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1513-1524, Ago. 2001.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, Ago. 2001.

CONTI, G.; ROSTAMI, A.; SCARPINI, E.; BARON, P.; GALIMBERTI, D.; BRESOLIN, N.; CONTRI, M.; PALUMBO, C.; DE POL, A. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. **Experimental Neurology**, v. 187, n. 2, p. 350-358, Jun. 2004.

CRAGGS, R. I.; KING, R. H. M.; THOMAS, P. K. The Effect of Suppression of Macrophage Activity on the Development of Experimental Allergic Neuritis. **Acta Neuropathologica**, v. 62, n. 4, p. 316-323, 1984.

CRÉANGE, A.; LEFAUCHEUR, J. P.; AUTHIER, F. J.; GHERARDI, R. K. Cytokines et neuropathies périphériques. **Revue neurologique** (Paris), v. 154, n. 3, p. 208-216, Abr. 1998.

CRÉANGE, A.; SHARSHAR, T.; PLANCHENAU, T.; CHRISTOV, C.; PORON, F.; RAPHAEL, J. C.; GHERARDI, R. K. Matrix metalloproteinase-9 is increased and correlates with severity in Guillain-Barré syndrome. **Neurology**, v. 53, n. 8, p. 1683-1691, Nov. 1999.

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. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 6, p. 2684-2690, Jun. 1994.

DALAKAS, M. C. The use of intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune neuromuscular diseases: evidence-based indications and safety profile. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 3, p. 177-193, Jun. 2004.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide actions in neurochemistry. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 2, p. 97-110, Ago. 1996.

DE LA COUR, C. D.; JAKOBSEN, J. Residual neuropathy in long-term population-based follow-up of Guillain-Barre syndrome. **Neurology**, v. 64, n. 2, p. 246-253, Jan. 2005.

DE LA HOZ, C. R.; OLIVEIRA A. L. R.; DE S. QUEIROZ, L.; LANGONE, F. Wallerian degeneration in C57BL/6J and A/J mice: differences in time course of neurofilament and myelin breakdown, macrophage recruitment and iNOS expression. **Journal of Anatomy**, v. 203, n. 6, p. 567-578, Dez. 2003.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, Suppl. 6, p. S27-S35, Ago. 1999. Suplemento.

DIAS-TOSTA, E.; KUCKELHAUS, C. S. Guillain Barré syndrome in a population less than 15 years old in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 2B, p. 367-373, Jun. 2002.

DINES, K. C.; POWELL, H. C. Mast cell interactions with the nervous system: relationship to mechanisms of disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 56, n. 6, p. 627-640, Jun. 1997.

FARIAS, A. S., DE LA HOZ, C., CASTRO, F.R., OLIVEIRA, E. C., REIS, J. R. R., SILVA, J. S., LANGONE, F., SANTOS, L. M. B. Nitric Oxide and TNF α effects in Experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 1, p. 32-38, Ago. 2007.

FELTS, P. A.; SMITH, K. J.; GREGSON, N. A.; HUGHES, R. A. C. Brain-derived neurotrophic factor in experimental autoimmune neuritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 124, n. 1-2, p. 62-69, Mar. 2002.

FORSYTHE, P.; GILCHRIST, M.; KULKA, M.; BEFUS, A. D. Mast cells and nitric oxide: control of production, mechanisms of response. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1525-1541, Ago. 2001.

GBS/ CIDP FOUNDATION INTERNATIONAL. Guillain Barré Syndrome – Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy. Disponível em: <<http://www.gbsfi.com>>. Acesso em: 15 abr. 2007.

GOLD, R.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Synergistic Effect of Ifn-Gamma and Tnf-Alpha on Expression of Immune Molecules and Antigen Presentation by Schwann-Cells. **Cellular Immunology**, v. 165, n. 1, p. 65-70, Out. 1995.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; RUSTIONI, A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 2, p.198-207, Jan. 1999.

GOVONI, V.; GRANIERI, E. Epidemiology of the Guillain-Barré syndrome. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, n. 5, p. 605-613, Out. 2001.

GREENFIELD, S.; BROSTOFF, S. W.; HOGAN, E. L. Characterization of the basic proteins from rodent peripheral nervous system myelin. **Journal of Neurochemistry**. V. 34, n. 2, p. 453-455, Fev. 1980.

GRIFFIN, J. W.; GEORGE, R.; LOBATO, C.; TYOR, W. R.; LI, C. Y.; GLASS, J. D. Macrophage Responses and Myelin Clearance During Wallerian Degeneration - Relevance to Immune-Mediated Demyelination. **Journal of Neuroimmunology**, v. 40, n. 2-3, p. 153-166, Out. 1992.

GRIFFIN, J. W.; HOFFMAN, P. N. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. (Eds.) **Peripheral neuropathy**. 3a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. v. 1, Cap. 80, p. 361-376.

GROSSMAN, M. L.; BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Afferent and efferent connections of the rat tail flick reflex (a model used to analyze pain control mechanisms). **Journal of Comparative Neurology**, v. 206, n. 1, p. 9-16, Mar. 1982.

GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME SUPPORT GROUP. Disponível em: <<http://www.gbs.org.uk/>>. Acesso em : 15 abr. 2007.

GUILLAIN, G.; BARRÉ, J. A.; STROHL, A. Sur un syndrome de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquide céphalorachidien sans reaction cellulaire: remarques sur les caractères cliniques et graphiques des reflexes tendineux. **Bulletin et mémoires de la Société des Médecins des Hôpitaux de Paris**, v. 40, p. 1462-1470, Out. 1916.

HADDEN, R. D. M.; CORNBLATH, D. R.; HUGHES, R. A. C.; ZIELASEK, J.; HARTUNG, H. P.; TOYKA, K. V.; SWAN, A. V. Electrophysiological classification of Guillain-Barré syndrome: Clinical associations and outcome. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 5, p. 780-788, Nov. 1998.

HADDEN, R. D. M.; GREGSON, N. A.; GOLD, R.; SMITH, K. J.; HUGHES, R. A. C. Accumulation of immunoglobulin across the 'blood-nerve barrier' in spinal roots in adoptive transfer experimental autoimmune neuritis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 28, n. 6, p. 489-497, Dez. 2002.

HAFER-MACKO, C. E.; SHEIKH, K. A.; LI, C. Y.; HO, T. W.; CORNBLATH, D. R.; MCKHANN, G. M.; ASBURY, A. K.; GRIFFIN, J. W. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. **Annals of Neurology**, v. 39, n. 5, p. 627-637, Mai. 1996.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; GILBERT, J. J. Blood-nerve barrier studies in experimental allergic neuritis. **Acta Neuropathologica (Berl)**, v. 68, n. 2, p. 101-109, 1985.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; STEELE, A.; LOVGREN, D. S.; BERRY, J. Demyelination and Axonal Degeneration in Lewis Rat Experimental Allergic Neuritis Depend on the Myelin Dosage. **Laboratory Investigation**, v. 59, n. 1, p. 115-125, Jul. 1988.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; WILKIE, L.; LOVGREN, D. P2-Peptide Induced Experimental Allergic Neuritis - A Model to Study Axonal Degeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 82, n. 1, p. 60-65, 1991.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; WILKIE, L.; LOVGREN, D. Antigalactocerebroside Antibody Increases Demyelination in Adoptive Transfer Experimental Allergic Neuritis. **Muscle & Nerve**, v. 16, n. 11, p. 1174-1180, Nov. 1993.

HAHN, A. F. Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. **Revue Neurologique**, v. 152, n. 5, p. 328-332, Mai. 1996.

HALL, S. M.; REDFORD, E. J.; SMITH, K. J. Tumor necrosis factor alpha has few morphological effects within the dorsal columns of the spinal cord, in contrast to its effects in the peripheral nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v. 106, n. 1-2, p. 130-136, Jul. 2000.

HARTUNG, H. P.; SCHAFFER, B.; HEININGER, K.; TOYKA, K. V. Production of Prostaglandins, Leukotrienes, and Oxygen-Free Radicals by Macrophages Ex vivo in the Course of Experimental Autoimmune Neuritis. **Annals of Neurology**, v. 24, n. 1, p. 142-142, Jul. 1988.

HARTUNG, H. P.; SCHAFFER, B.; VAN DER MEIDE, P. H.; FIERZ, W.; HEININGER, K.; TOYKA, K. V. The role of interferon-gamma in the pathogenesis of experimental autoimmune disease of the peripheral nervous system. **Annals of Neurology**, v. 27, n. 3, p. 247-257, Mar. 1990.

HARTUNG, H. P.; JUNG, S. F.; STOLL, G.; ZIELASEK, J.; SCHMIDT, B.; ARCHELOS, J. J.; TOYKA, K. V. Inflammatory Mediators in Demyelinating Disorders of the Cns and Pns. **Journal of Neuroimmunology**, v. 40, n. 2-3, p. 197-210, Out. 1992.

HARTUNG, H. P.; STOLL, G.; TOYKA, K. V. Immune reactions in the peripheral nervous system. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. (Eds.) **Peripheral neuropathy**. 3a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993, v. 1, Cap. 26, p. 418-444.

HARTUNG, H. P.; POLLARD, J. D.; HARVEY, G. K.; TOYKA, K. V. Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barré syndrome--Part I. **Muscle Nerve**, v. 18, n. 2, p. 137-153, Fev. 1995.

HEBEL R., STROMBERG, M.W. Nervous System. In: HEBEL R., STROMBERG, M.W. (Eds.) **Anatomy and Embryology of the laboratory rat**. Worthese: BioMed Verlag, 1986, p. 124-217.

HEININGER, K.; STOLL, G.; LININGTON, C.; TOYKA, K. V.; WEKERLE, H. Conduction Failure and Nerve-Conduction Slowing in Experimental Allergic Neuritis Induced by P2-Specific T-Cell Lines. **Annals of Neurology**, v. 19, n. 1, p. 44-49, Jan. 1986.

HIBBS, J. B. Infection and nitric oxide. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. S9-S17, Fev. 2002.

HO, T. W.; MCKHANN, G. M.; GRIFFIN, J. W. Human autoimmune neuropathies. **Annual Review of Neuroscience**, v. 21, p. 187-226, 1998.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 378-384, Mai. 1999.

HOOPER, D. C.; OHNISHI, T. S.; KEAN, R.; NUMAGAMI, Y.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 12, p. 5312-5316, Jun. 1995.

HUGHES, R. A. C.; CORNBATH, D. R. Guillain-Barré syndrome. **Lancet**, v. 366, n. 9497, p. 1653-1666, Nov. 2005.

HUGHES, R. A.; SWAN, A. V.; RAPHAEL, J. C.; ANNANE, D.; VAN KONINGSVELD, R.; VAN DOORN, P. A. Immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: a systematic review. **Brain**, v. 130, n. 9, p. 2245-2257, Mar. 2007.

HUNGER, R. E.; CARNAUD, C.; GARCIA, I.; VASSALLI, P.; MUELLER, C. Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p55. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 255-261, Jan. 1997.

IZUMO, S.; LININGTON, C.; WEKERLE, H.; MEYERMANN, R. Morphologic study on experimental allergic neuritis mediated by T cell line specific for bovine P2 protein in Lewis rats. **Laboratory Investigation**, v. 53, n. 2, p. 209-218, Ago. 1985.

JANDER, S.; POHL, J.; GILLEN, C.; STOLL, G. Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 43, n. 2, p. 254-259, Jan. 1996.

JANJUA, M. Z.; LEONG, S. K. Organization of neurons forming the femoral sciatic, common peroneal and tibial nerves in rats and monkeys. **Brain Research**, v. 310, n. 2, p. 311-323, Set. 1984.

JOHNSON, D.; YASUI, D.; SEELDRAYERS, P. An analysis of mast-cell frequency in the rodent nervous-system - numbers vary between different strains and can be reconstituted in mast cell-deficient mice. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, n. 3, p. 227-234, Mai. 1991.

KIEFER, R.; KIESEIER, B. C.; STOLL, G.; HARTUNG, H. P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 2, p.109-127, Jun. 2001.

KIERNAN, J. A. Vascular permeability in the peripheral autonomic and somatic nervous systems: controversial aspects and comparisons with the blood-brain barrier. **Microscopy Research and Technique**, v. 35, n. 2, p. 122-136, Out.1996.

KIESEIER, B. C.; KIEFER, R.; GOLD, R.; HEMMER, B.; WILLISON, H. J.; HARTUNG, H. P. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. **Muscle Nerve**, v. 30, n. 2, p. 131-156, Ago. 2004.

KONAT, G. W.; WIGGINS, R. C. Effect of reactive oxygen species on myelin membrane proteins. **Journal of Neurochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1113-1118, Out. 1985.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 7, p.3024-3027, Apr. 1993. Erratum in: **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 90, n. 11, p. 5378, Jun. 1993.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; SJSCHKEK, C.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1407-1420, Ago. 2001.

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. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 8, p. 4371-4382, Out. 1993.

KUCHROO, V.K., PRABHU DAS, M., BROWN, JA., RANGER, A.M., ZAMVIL, SS, SOBEL, R.A., WEINER, H.L., NABAVI,N., GLIMCHER, L.H. B7.1, B7-2 Co-stimulatory molecules activate differentially the Th1-Th2 developmental pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. **Cell**, v. 80, n. 5, p. 707-718, Mar. 1995.

LANGREHR, J. M.; HOFFMAN, R. A.; LANCASTER, J. R. Jr.; SIMMONS, R. L. Nitric oxide--a new endogenous immunomodulator. **Transplantation**, v. 55, n. 6, p. 1205-1212, Jun. 1993.

LEDGERWOOD, E. C.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. **Laboratory Investigation**, v. 79, p. 1041-1050, Set. 1999.

LEE, Y.; SHIN, T. Expression of constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in the sciatic nerve of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 126, n. 1-2, p. 78-85, Mai. 2002.

LEVY, D.; KUBES, P.; ZOCHODNE, D.W. Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 60, n. 5, p. 411-421, Mai. 2001.

LIEFNER, M.; SIEBERT, H.; SACHSE, T.; MICHEL, U.; KOLLIAS, G.; BRÜCK, W. The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. **Journal of Neuroimmunology**, v. 108, p. 147-152, Ago. 2000.

LIN, R.F.; LIN, T. S.; TILTON, R. G.; CROSS, A. H. Nitric oxide localized to spinal cords of mice with experimental allergic encephalomyelitis: an electron paramagnetic resonance study. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 643-648, Ago. 1993.

LINDENLAUB, T.; TEUTEBERG, P.; HARTUNG, T.; SOMMER, C. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. **Brain Res.**, v. 866, n. 1-2, p. 15-22, Jun. 2000.

LININGTON, C.; IZUMO, S.; SUZUKI, M.; UYEMURA, K.; MEYERMANN, R.; WEKERLE, H. A Permanent Rat T-Cell Line That Mediates Experimental Allergic Neuritis in the Lewis Rat in vivo. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1946-1950, Out. 1984.

LININGTON, C.; LASSMANN, H.; OZAWA, K.; KOSIN, S.; MONGAN, L. Cell-Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Supergene Family As Tissue-Specific Autoantigens - Induction of Experimental Allergic Neuritis (EAN) by Po Protein-Specific T-Cell Lines. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 7, p. 1813-1817, Jul. 1992.

MÄÄTTÄ, J. A.; SJÖHOLM, U. R.; NYGÅRDAS, P. T.; SALMI, A. A.; HINKKANEN, A. E. Neutrophils secreting tumor necrosis factor alpha infiltrate the central nervous system of BALB/c mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 90, n. 2, p. 162-175, Out. 1998.

MacEWAN DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cellular Signaling**, v. 14, n. 6, p. 477-492, Jun. 2002.

MacMICKING, J. D.; WILLENBORG, D. O.; WEIDEMANN, M. J.; ROCKETT, K. A.; COWDEN, W. B. Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 303-307, Jul. 1992.

McCARRON RM, WANG L, RACKE MK, MCFARLIN DE, SPATZ M. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 43, n. 1-2, p. 23-30, Mar. 1993.

McCOLL, S. R.; STAYKOVA, M. A.; WOZNIAK, A.; FORDHAM, S.; BRUCE, J.; WILLENBORG, D.O. Treatment with Anti-Granulocyte Antibodies Inhibits the Effector Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 11, p. 6421-6426, Dez. 1998.

McCOMB, J.; GOULD, T.; CHLIPALA, E.; SENNELO, G.; FRAZIER, J.; KIEFT, G.; SEELY, J.; EDWARDS, C. K. 3rd, BENDELE, A. Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy. **Journal of Rheumatology**, v.26, n. 6, p.1347-1351, 1999.

McKHANN, G. M.; GRIFFIN, J. W.; CORNBLATH, D. R.; MELLITS, E. D.; FISHER, R. S.; QUASKEY, S. A. Plasmapheresis and Guillain-Barré-Syndrome - Analysis of Prognostic Factors and the Effect of Plasmapheresis. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 347-353, Abr. 1988.

McKHANN, G. M. Guillain-Barré-Syndrome - Clinical and Therapeutic Observations. **Annals of Neurology**, v. 27p. S13-S16, 1990.

McKHANN, G. M.; CORNBLATH, D. R.; HO, T.; LI, C. Y.; BAI, A. Y.; WU, H. S.; YEI, Q. F.; ZHANG, W. C.; ZHAORI, Z.; JIANG, Z.; GRIFFIN, J. W.; ASBURY, A. K. Clinical and Electrophysiological Aspects of Acute Paralytic Disease of Children and Young-Adults in Northern China. **Lancet**, v. 338, n. 8767, p. 593-597, Set. 1991.

McKHANN, G. M.; CORNBLATH, D. R.; GRIFFIN, J. W.; HO, T. W.; LI, C. Y.; JIANG, Z.; WU, H. S.; ZHAORI, G.; LIU, Y.; JOU, L. P.; LIU, T. C.; GAO, C. Y.; MAO, J. Y.; BLASER, M. J.; MISHU, B.; ASBURY, A. K. Acute Motor Axonal Neuropathy - A Frequent Cause of Acute Flaccid Paralysis in China. **Annals of Neurology**, v. 33, n. 4, p. 333-342, Abr. 1993.

McMANIS, P. G.; LOW, P. A.; LAGERLUND, T. D. Microenvironment of nerve: blood flow and ischemia. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. (Eds.) **Peripheral neuropathy**. 3a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. v. 1, Cap. 28, p. 453-473.

MELLER, D., EYSEL, U. T.; SCHMIDT-KASTNER, R. Transient immunohistochemical labelling of rat retinal axons during Wallerian degeneration by a monoclonal antibody to neurofilaments. **Brain Research**, v. 648, n. 1. p. 162-166, Jun. 1994.

MOALEM-TAYLOR, G.; ALLBUTT, H. N.; IORDANOVA, M. D.; TRACEY, D. J. Pain hypersensitivity in rats with experimental autoimmune neuritis, an animal model of human inflammatory demyelinating neuropathy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 5, p. 699-710, Jul. 2007.

MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p.1676-1689, Jun. 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun. 1991.

MOULIN, D. E.; HAGEN, N.; FEASBY, T. E.; AMIREH, R.; HAHN, A. Pain in Guillain-Barré syndrome. **Neurology**, v. 48, n. 2, p. 328-331, Fev. 1997.

MYERS, R. R.; CAMPANA, W. M.; SHUBAYEV, V. I. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 1-2, p. 8-20, Jan. 2006.

NICHOLSON, L.B.& KUCHROO, V. Manipulation of the Th1/Th2 balance of autoimmune diseases. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 6, p. 837-842, Dez. 1996.

NIXON, R. A.; SHAG, R. K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. **Trends in Neuroscience**, v.14, n. 11, p. 501-506, Nov. 1991. Review.

OGAWARA, K.; KUWABARA, S.; MORI, M.; HATTORI, T.; KOGA, M.; YUKI, N. Axonal Guillain-Barré syndrome: Relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. **Annals of Neurology**, v. 48, n. 4, p. 624-631, Out. 2000.

OHTORI, S.; TAKAHASHI, K.; MORIYA, H.; MYERS, R. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury. **Spine**, v. 29, n. 10, p. 1082-1088, Mai. 2004.

OLSSON, Y. Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system. **Acta Neuropathologica** (Berlin), v. 10, n. 1, p. 26-33, Jan. 1968.

PARADISO, G.; TRIPOLI, J.; GALICCHIO, S.; FEJERMAN, N. Epidemiological, clinical, and electrodiagnostic findings in childhood Guillain-Barré syndrome: A reappraisal. **Annals of Neurology**, v. 46, n. 5, p. 701-707, Nov. 1999.

PARKINSON, J. F.; MITROVIC, B.; MERRILL, J. E. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **Journal of Molecular Medicine (Berlin)**, v. 75, n.3, p. 174-186, Mar. 1997.

PENTLAND, B.; DONALD, S. M. Pain in the Guillain-Barré-Syndrome - A Clinical Review. **Pain**, v. 59, n. 2, p. 159-164, Nov. 1994.

PILARTZ, M.; JESS, T.; INDEFREI, D.; SCHRODER, J. M. Adoptive transfer-experimental allergic neuritis in newborn Lewis rats results in inflammatory infiltrates, mast cell activation, and increased Ia expression with only minor nerve fiber degeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 104, n. 5, p. 513-524, Nov. 2002.

POLLARD, J. D.; WESTLAND, K. W.; HARVEY, G. K.; JUNG, S.; BONNER, J.; SPIES, J. M.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Activated T-Cells of Nonneural Specificity Open the Blood-Nerve Barrier to Circulating Antibody. **Annals of Neurology**, v. 37, n. 4, p. 467-475, Abr. 1995.

PORTEU F, BROCKHAUS M, WALLACH D, ENGELMANN H, NATHAN CF. Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the

proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 28, p.18846-53, Out. 1991.

POWELL, H. C.; OLEE, T.; BROSTOFF, S. W.; MIZISIN, A. P. Comparative Histology of Experimental Allergic Neuritis Induced with Minimum Length Neuritogenic Peptides by Adoptive Transfer with Sensitized Cells Or Direct Sensitization. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, n. 5, p. 658-674, Set. 1991.

RADHAKRISHNAN, V. V.; SUMI, M. G.; REUBEN, S.; MATHAI, A.; NAIR, M. D. Serum tumour necrosis factor-alpha and soluble tumour necrosis factor receptors levels in patients with Guillain-Barré syndrome. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 109, n. 1, p. 71-74, Jan. 2004.

REALE, E.; LUCIANO, L.; SPITZNAS, M. Freeze-fracture aspects of the perineurium of spinal ganglia. **Journal of Neurocytology**, v. 5, n. 4, p. 385-394, Ago.1976.

REDFORD, E. J.; HALL, S. M.; SMITH, K. J. Vascular Changes and Demyelination Induced by the Intraneural Injection of Tumor-Necrosis-Factor. **Brain**, v. 118p. 869-878, Ago. 1995.

REDFORD, E. J.; KAPOOR, R.; SMITH, K. J. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. **Brain**, v. 120, n.12, p. 2149-2157, Dez. 1997.

REDFORD, E. J.; SMITH, K. J.; GREGSON, N. A.; DAVIES, M.; HUGHES, P.; GEARING, A. J. H.; MILLER, K.; HUGHES, R. A. C. A combined inhibitor of matrix metalloproteinase activity and tumour necrosis factor-alpha processing attenuates experimental autoimmune neuritis. **Brain**, v. 120, n. 10, p. 1895-1905, Out. 1997.

ROSEN, J. L.; BROWN, M. J.; HICKEY, W. F.; ROSTAMI, A. Early Myelin Lesions in Experimental Allergic Neuritis. **Muscle & Nerve**, v. 13, n. 7, p. 629-636, Jul. 1990.

ROSTAMI, A.; GREGORIAN, S. K.; BROWN, M. J.; PLEASURE, D. E. Induction of Severe Experimental Autoimmune Neuritis with A Synthetic Peptide Corresponding to the 53-78 Amino-Acid-Sequence of the Myelin P2-Protein. **Journal of Neuroimmunology**, v. 30, n. 2-3, p. 145-151, Dez. 1990.

SAID, G. M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Nerve lesions induced by macrophage activation. **Research in Immunology**, v. 143, n. 6, p. 589-599, Jul-Ago. 1992.

SANTOS, J. S. Aspectos epidemiológicos da síndrome de Guillain-Barré em Ribeirão Preto de 1987 a 1997 e suas relações com as epidemias de dengue e sarampo. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina (Neurologia)) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

SCHÄFERS, M.; SORKIN, L. S.; GEIS, C.; SHUBAYEV, V. I. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 347, n. 3, p. 179-182, Ago. 2003.

SCHLAEPFER, W.W. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 46, n. 2, p. 117-129, Mar. 1987.

SCHMIDT, B.; STOLL, G.; VANDERMEIDE, P.; JUNG, S.; HARTUNG, H. P. Transient Cellular Expression of Gamma-Interferon in Myelin-Induced and T-Cell Line-Mediated Experimental Autoimmune Neuritis. **Brain**, v. 115p. 1633-1646, Dez. 1992.

SCHOTT, K.; JENNER, A.; WIETHOLTER, H.; SCHABET, M.; STEVENS A. Demyelination of sciatic nerve in acute experimental allergic neuritis of the rat. A gel electrophoresis investigation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 20, n.1, p. 53-61, Nov. 1988.

SCOTT, G. S.; WILLIAMS, K. I.; BOLTON, C. A pharmacological study on the role of nitric oxide in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. **Inflammation Research**, v. 45, n. 10, p. 524-529, Out. 1996.

SECOR, V. H.; SECOR, W. E.; GUTEKUNST, C. A.; BROWN, M. A. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 5, p. 813-822, Mar. 2000.

SEKIGUCHI, M.; KIKUCHI, S.; MYERS, R. R. Experimental spinal stenosis: relationship between degree of cauda equina compression, neuropathology, and pain. **Spine**, v. 29, n. 10, p. 1105-1111, Mai. 2004.

SELMAJ, K.; RAINE, C. S.; CANNELLA, B.; BROSANAN, C. F. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 3, p. 949-954, Mar. 1991a.

SELMAJ, K.; RAINE, C. S.; FAROOQ, M.; NORTON, W. T.; BROSANAN, C. F. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. **Journal of Neuroimmunology**, v. 147, n. 5, p. 1522-1529, Set. 1991b.

SELMAJ, K. W.; RAINE, C. S. Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. **Neurology**, v. 45, n. 6, Suppl 6, p. S44-9, Jun. 1995. Suplemento.

SHUBAYEV, V. I.; MYERS, R. R. Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 114, n. 1/2, p. 48-56, Mar. 2001.

SHUBAYEV, V.I.; ANGERT, M.; DOLKAS, J.; CAMPANA, W. M.; PALENSCAR, K. MYERS, R. R. TNF-alpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 31, n. 3, p. 407-415, Mar. 2006.

SKOFF, A. M.; LISAK, R. P.; BEALMEAR, B.; BENJAMINS, J. A. TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 53, n. 6, p. 747-56, Set. 1998.

SPIES, J. M.; WESTLAND, K. W.; BONNER, J. G.; POLLARD, J. D. Intraneural Activated T-Cells Cause Focal Breakdown of the Blood-Nerve Barrier. **Brain**, v. 118, n. 4, p. 857-868, Ago. 1995.

STEVENS, A.; SCHABET, M.; SCHOTT, K.; WIETHOLTER, H. Role of Endoneural Cells in Experimental Allergic Neuritis and Characterization of A Resident Phagocytic Cell. **Acta Neuropathologica**, v. 77, n. 4, p. 412-419, 1989.

STOLL, G.; SCHMIDT, B.; JANDER, S.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Presence of the Terminal Complement Complex (C5B-9) Precedes Myelin Degradation in Immune-Mediated Demyelination of the Rat Peripheral Nervous-System. **Annals of Neurology**, v. 30, n. 2, p. 147-155, Ago. 1991.

STOLL, G.; JANDER, S.; JUNG, S.; ARCHELOS, J.; TAMATANI, T.; MIYASAKA, M.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Macrophages and Endothelial-Cells Express Intercellular-Adhesion Molecule-1 in Immune-Mediated Demyelination But Not in Wallerian Degeneration of the Rat Peripheral Nervous-System. **Laboratory Investigation**, v. 68, n. 6, p. 637-644, Jun. 1993a.

STOLL, G.; JUNG, S.; JANDER, S.; VANDERMEIDE, P.; HARTUNG, H. P. Tumor-Necrosis-Factor-Alpha in Immune-Mediated Demyelination and Wallerian Degeneration of the Rat Peripheral Nervous-System. **Journal of Neuroimmunology**, v. 45, n. 1-2, p. 175-182, Jun. 1993b.

STUEHR, D. J. Purification and properties of nitric oxide synthases. **Methods in Enzymology**, v. 268, p. 324-333, 1996.

TARTAGLIA LA, ROTHE M, HU YF, GOEDEL DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 213-216, Abr. 1993.

TAYLOR, J. M.; POLLARD, J. D. Dominance of autoreactive T cell-mediated delayed-type hypersensitivity or antibody-mediated demyelination results in distinct forms of experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 60, n. 6, p. 637-646, Jun. 2001.

TAYLOR, J. M.; POLLARD, J. D. Neurophysiological changes in demyelinating and axonal forms of acute experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. **Muscle & Nerve**, v. 28, n. 3, p. 344-352, Set. 2003.

TAYLOR, J. M.; POLLARD, J. D. Soluble TNFR1 inhibits the development of experimental autoimmune neuritis by modulating blood-nerve-barrier permeability and inflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 183, n. 1-2, p. 118-124, Fev. 2007.

TEIXEIRA, S. A.; CASTRO, G. M.; PAPES, F.; MARTINS, M. L.; ROGERIO, F.; LANGONE, F.; SANTOS L. M.; ARRUDA, P.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M. N. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 99, n. 1, p. 17-25, Fev. 2002.

THARP, M. D.; SEELIG, L. L.; TIGELAAR, R. E.; BERGSTRESSER, P. R. Conjugated avidin binds to mast cell granules. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 27-32, Jan. 1985.

THOMAS, P. K., BERTHOLD, C. H.; OCHOA, J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. (Eds.) **Peripheral neuropathy**. 3a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. v. 1, Cap. 3, p. 28-91.

UNCINI, A.; DI MUZIO, A.; DI GUGLIELMO, G.; DE ANGELIS, M. V.; DE LUCA, G.; LUGARES, A.; GAMB, D. Effect of rhTNF-alpha injection into rat sciatic nerve. **Journal of Neuroimmunology**, v. 94, n. 1-2, p. 88-94, Fev. 1999.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERS, W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 392-399, Out. 1995.

VAN DER VEEN, R. C. Nitric oxide and T helper cell immunity. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1491-1500, Ago. 2001.

VAN DOORN, P. A. Treatment of Guillain-Barré syndrome and CIDP. **Journal of Peripheral Nervous System**, v. 10, n. 2, p. 113-127, Jun. 2005.

VAN ZEE KJ, KOHNO T, FISCHER E, ROCK CS, MOLDAWER LL, LOWRY SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 4845-9, Jun. 1992.

VARANI, J.; WARD, P. A. Mechanisms of neutrophil-dependent and neutrophil-independent endothelial cell injury. **Biological Signals**, v. 3, n. 1, p. 1-14, Jan-Fev. 1994.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annual Review of Immunology**, v. 10, p. 411-452, 1992.

WAEGH, S.M. de; LEE, V. M. Y.; BRADY, S.T. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 451-463, Fev. 1992.

WAGNER, R., MYERS, R. R. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, v. 73, n. 3, p. 625-629, 1996.

WARE, C. F.; CROWE, P. D.; VANARSDALE, T. L.; ANDREWS, J. L.; GRAYSON, M. H.; JERZY, R.; SMITH, C. A.; GOODWIN, R. G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 12, p. 4229-38, Dez. 1991.

WAKSMAN, B. H.; ADAMS, R.D. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. **Journal of Experimental Medicine**, v. 102, n. 2, p. 213-236, Ago. 1955.

WILLENBORG, D. O.; STAYKOVA, M. A.; COWDEN, W. B. Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. **Journal of Neuroimmunology**, v. 100, n. 1-2, p. 21-35, Dez. 1999.

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. **Journal of Neuroimmunology**, v. 64, n. 2, p. 123-133, Fev. 1996.

ZHU, J.; MIX, E.; ISSAZADEH, S.; LINK, H. Dynamics of mRNA expression of interferon-gamma, interleukin 4 and transforming growth factor beta 1 in sciatic nerves and lymphoid organs In experimental allergic neuritis. **European Journal of Neurology**, v. 3, n. 3, p. 232-240, Mai. 1996.

ZHU, J.; BAI, X. F.; MIX, E.; LINK, H. Cytokine dichotomy in peripheral nervous system influences the outcome of experimental allergic neuritis: Dynamics of mRNA expression for IL-1 beta, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha, TNF-beta, and cytolysin. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 1, p. 85-94, Jul. 1997.

ZHU, J.; MIX, E.; LINK, H. Cytokine production and the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. **Journal of Neuroimmunology**, v. 84, n. 1, p. 40-52, Abr. 1998.

ZHU, J.; ZOU, L. P.; BAKHIET, M.; MIX, E. Resistance and susceptibility to experimental autoimmune neuritis in Sprague-Dawley and Lewis rats correlate with different levels of autoreactive T and B cell responses to myelin antigens. **Journal of Neuroscience Research**, v. 54, n. 3, p. 373-381, Nov. 1998.

ZHU, W.; MIX, E.; NENNESMO, I.; ADEM, A.; ZHU, J. Anti-cytokine autoantibodies in experimental autoimmune neuritis in Lewis rats. **Experimental Neurology**, v. 190, n. 2, p. 486-494, Dez. 2004.

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. **Journal of Neuroimmunology**, v. 58, n. 1, p. 81-88, Abr. 1995.

10. ANEXOS

10 ANEXOS

10.1 Trabalhos e resumos científicos publicados (autora e co-autora)

1. DE LA HOZ, C.L.R.; CASTRO, F. R.; SANTOS, L. M. B.; LANGONE, F. TNF-alpha and iNOS in peripheral nervous system during experimental autoimmune neuritis. **8th International Congress, Abstract in Journal of Neuroimmunology**, v. 178, n. suppl. 1, p. 220, Oct. 2006. Suplemento.
2. FARIAS, A. S.; DE LA HOZ, C.; CASTRO, F. R.; OLIVEIRA, E. C.; REIS, J. R. R.; SILVA, J. S.; LANGONE, F.; SANTOS, L. M. B. Nitric Oxide and TNF α effects in Experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 1, p. 32-38, Aug. 2007.
3. CASTRO, F. R.; FARIAS, A. S.; PROENCA, P. L.; DE LA HOZ, C.; LANGONE, F.; OLIVEIRA, E. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 299-305, Mar. 2007.

[J Neuroimmunol.](#) 2006 Sep;178 Suppl 1:220.

Abstracts of the 8th International Conference of Neuroimmunology, October 2006.

TNF- α and iNOS in peripheral nervous system during experimental autoimmune neuritis.

- [de la Hoz CLR,](#)
- [Castro FR,](#)
- [Santos LM.](#)
- [Langone F.](#)

Department of Physiology and Biophysics, State University of Campinas, SP, Brazil.

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) are involved in inflammatory processes such as Guillain Barré Syndrome and its animal model, Experimental Autoimmune Neuritis (EAN). We have investigated the presence of TNF- α and iNOS in peripheral nervous system during EAN. At different stages of the disease, spinal roots adjacent to lumbar intumescence, *cauda equina*, sensitive ganglia and sciatic nerves were obtained from induced-EAN Lewis rats and processed for double iNOS and TNF- α fluorescence immunohistochemistry. Large oval TNF- α ⁺ cells and smaller rounded TNF- α ⁺/iNOS⁺ cells were evidenced. All experimental groups, including the control group showed TNF- α ⁺ cells around ganglia and in perineurium, with slight differences among groups. At the onset of clinical signs, few TNF- α ⁺/iNOS⁺ cells were found in blood vessels of *cauda equina* and sciatic nerve. During the acute phase there has been an increase in the amount of these cells around vessels and inflammatory infiltrates in ganglia, *cauda equina* and the other spinal roots. Just before the peak stage, TNF- α ⁺/iNOS⁺ cells in these regions and in sciatic nerve were widely distributed around numerous infiltrates. In the recovery stage, some TNF- α ⁺/iNOS⁺ cells have been still found in *cauda equina* and sciatic nerve vessels, while in the resolution stage they were not evidenced. Evolution of EAN clinical signs may be related to TNF- α and iNOS-immunoreactive cells in different nervous regions. Probably these cells are stimulated to produce TNF- α and iNOS simultaneously before reaching peripheral nervous microenvironment.

[Neuroimmunomodulation](#). 2007 Aug 15;14(1):32-38.

Nitric Oxide and TNF α effects in Experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination.

- ^a [Farias AS](#),
- ^b [de La Hoz C](#),
- ^a [Castro FR](#),
- ^a [Oliveira EC](#),
- ^a [Reis, JRR](#),
- ^c [Silva JS](#),
- ^b [Langone F](#),
- ^a [Santos LM](#).

^aNeuroimmunology unit, Dept. Microbiology and Immunology, ^bDept. Physiology, University of Campinas – Campinas- SP – Brazil. and ^cDept. Immunology, University of São Paulo – Ribeirão Preto – SP- Brazil

The involvement of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which plays various roles in the progression of autoimmune diseases was studied in iNOS knockout (KO) mice and wild type (WT) controls for Experimental autoimmune encephalomyelitis. The iNOS (KO) mice presented a less severe form of the disease than did the wild type control mice. Although the levels of TNF α in the periphery diminished 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 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced in the WT mice, but no in the KO mice. These findings suggest that NO and TNF α contribute to pathogenesis during acute EAE.

PMID: [PubMed - in process]

[Toxicol.](#) 2007 Mar 1;49(3):299-305.

The effect of treatment with crotopotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats.

- ^a[Castro FR](#),
- ^a[Farias AS](#),
- ^a[Proenca PL](#),
- ^b[de La Hoz C](#),
- ^b[Langone F](#),
- ^a[Oliveira EC](#),
- ^c[Toyama MH](#),
- ^c[Marangoni S](#),
- ^a[Santos LM](#).

^aNeuroimmunology unit, Dept. Microbiology and Immunology, ^bDept. Physiology and Biophysics, ^cDept. Biochemistry, University of Campinas – Campinas- SP – Brazil

Biomedical research in which venom components are being investigated for their potential as novel therapeutic agents has emerged as an interesting option. Crotopotin, which is purified from the venom of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, has been described as an anti-inflammatory agent that acts on the innate arm of the immune response. Here we have demonstrated that intraperitoneal administration of crotopotin significantly reduces the severity of experimental autoimmune neuritis (EAN), an experimental model for Guillain-Barré syndrome. The reduction of the severity of the disease is associated with a reduction in the mononuclear cells infiltrating the sciatic nerve and a significant decrease in the lymphocyte proliferative response to neuritogenic peptide.

PMID: 17145071

10.2 Trabalho científico submetido para publicação

[J Neuroimmunol.](#) (Submitted in July, 2007).

Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in the peripheral nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis.

- ^a[de la Hoz CLR,](#)
- ^b[Castro FR,](#)
- ^b[Santos LMB.](#)
- ^a[Langone F.](#)

^aDepartments of Physiology and Biophysics, ^bMicrobiology and Immunology, State University of Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

This study describes the immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the peripheral nervous system (PNS) of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis (EAN). As the disease progressed, iNOS/TNF- α -immunoreactive macrophages and neutrophils gradually infiltrated the dorsal root ganglia, Th_{XII}-L_{III} spinal roots, *cauda equina*, and sciatic nerve. The results suggest that the presence of iNOS and TNF- α bearing cells in the different parts of the PNS affects the normal functioning of nerve fibers and is involved in the development of the clinical signs observed at each stage of EAN.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada “Estudo da participação da iNOS e do TNF-alfa na evolução da neurite experimental auto-imune em ratos Lewis”

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1291-1). *Ap. 5/11/07*

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Cristiane L.R. de la Hoz.

Aluna: Cristiane Lucia Rodriguez de la Hoz

Francesco Langone

Orientador: Francesco Langone

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Anamaria A. Guaraldo

Nome: _____
Função: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP



CEEAA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp

CERTIFICADO

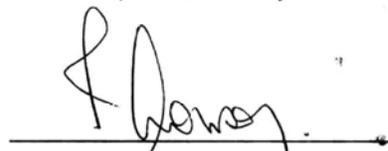
Certificamos que o Protocolo nº 1291-1, sobre "Expressão de iNOS e TNF- α no sistema nervoso periférico de ratos lewis com neurite auto-imune experimental", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francesco Lagone / Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos / Cristiane Lucia Rodrigues del la Hoz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 05 de julho de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1291-1, entitled "TNF- α and iNOS expression in peripheral nerve during the experimental autoimmune neuritis induced in lewis rat", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 5, 2007.

Campinas, 05 de julho de 2007.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva