ANA AUGUSTA VARRIANO

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS DECORRENTES DO
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL E DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Farmacologia).

São Paulo
-2008-

ANA AUGUSTA VARRIANO

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS DECORRENTES DO
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL E DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: **Farmacologia**

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

São Paulo
-2008-

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Varriano, Ana Augusta.

Alterações clínicas e bioquímicas decorrentes do estresse crônico
imprevisível e do estresse oxidativo em ratos / Ana Augusta Varriano. -
- São Paulo, 2008.

Orientador: Marcelo Nicolás Muscarás.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia. Linha de pesquisa: Farmacologia bioquímica dos radicais
livres.

Versão do título para o inglês: Clinical and biochemical alterations
secondary to chronic unpredictable stress and oxidative stress in rats.

Descritores: 1. Sistema nervoso central 2. Estresse 3.
Encefalomielite animal 4. Isquemia 5. Estresse oxidativo 6. Ratos I.
Muscará, Marcelo Nicolás II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
III. Título.

ICB/SBIB122/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Augusta Varriano.

Título da Tese: Alterações clínicas e bioquímicas decorrentes do estresse crônico imprevisível e do estresse oxidativo em ratos .

Orientador(a): Marcelo Nicolás Muscará.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais:
Sem seu apoio incondicional eu nada seria;
Ao meu marido:
Seu companherismo tem me ajudado a ser quem sou;
E à minha filha Ana Clara:
Sua doçura faz-me lembrar que posso ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. **Dr. Marcelo Nicolás Muscará**, meu agradecimento especial, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Agradeço pela sua compreensão e atuação na minha formação científica.

Ao prof. **Dr. Cristóforo Scavone**, por ter aberto as portas de seu laboratório, pelos preciosos conselhos e reflexões filosófico-científicas.

À prof. **Dra. Soraia K. P. Costa**, pelas importantes sugestões e incentivos constantes.

Ao prof. **Dr. Wothan Tavares de Lima** e aos alunos de seu laboratório, por terem ensinado o modelo de isquemia e reperfusão intestinal.

À prof. **Dra. Rosana Camarini** e aos alunos de seu laboratório, pelo apoio na análise dos testes estatísticos.

Ao Prof. **Dr. Rodrigo Álvaro L. Martins** e aos membros de seu laboratório – **Rodrigo Labat Marcos, Rodney Capp Pallotta, Luciano Ramos e Sócrates Calvoso Penna** - pela amizade e compreensão.

Aos grandes amigos do laboratório de Farmacologia-Bioquímica dos Radicais Livres - **Alexandre Denadai Souza, Aline Maia Dantas, Bruno S. Herrera, Joyce Pinto, Marcelo Yamamoto, Paula Campi L. de Almeida, Rodrigo Martins Porto** - pelo apoio, convivência, brincadeiras e incentivos constantes. Gostaria de registrar meu especial agradecimento a **Carly de Faria Coelho** não somente pelo apoio de bancada, mas, sobretudo pelo privilégio de sua amizade.

Aos amigos **Ana Alice S. Dias** e **André Colaço**, pelas sugestões e apoio ao longo da jornada.

Às amigas do laboratório de Farmacologia Molecular - **Carolina Demarchi Munhoz, Elisa Mitiko Kawamoto, Larissa Lima, Lídia Mitiko Yshii** – pelo auxílio nos ensaios realizados nesse Laboratório e, sobretudo, pela amizade sincera. Devo muito a vocês.

Aos colegas do laboratório de Farmacoregulação da Inflamação Neurogênica e Dor - **Eduardo Ekundi, Enilton A. Camargo, Juliana Florenzano, Juliano Fernandes, Maria Alice Barreto, Paula Rubya de S. Câmara, Sara Miranda e Aila Teles** - por terem pacientemente cedido tantas vezes o espaço físico do laboratório e pela convivência agradável. Em especial, às amigas **Lívia Terezinha P. Branco** e **Lívia Camargo** pela grande ajuda.

Ao **Marco André Alves** e **Manoel Messias Pereira da Silva** (Biotério do Departamento de Farmacologia) e **Maria Aparecida Fernandes** (Biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Departamento de Farmacologia, ICB/USP), pelo zelo, especial cuidado e amor com os animais do Biotério.

À **Irene Maria Gouvea**, pelo importante apoio técnico durante este período e principalmente pela amizade e paciência.

À **Selma Rigonati**, secretária da Pós-graduação do Departamento de Farmacologia, pela paciência, respeito e apoio administrativo.

Aos **funcionários e professores do Departamento de Farmacologia da USP**, muito obrigada.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

As amigas **Simone Aparecida Teixeira**, **Simone Marques Bolonheis** e **Lucília Brochado Lepsch**, cujo caráter, competência e profissionalismo são inquestionáveis. Toda a realização deste trabalho não seria possível sem seus ensinamentos, paciência e apoio de bancada. Mas, sobretudo, meu agradecimento especial pela amizade sincera, cumplicidade e companheirismo.

Cada um que passa em nossa vida,
Passa sozinho, porque cada pessoa é única
e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
mas não vai sozinho, nem nos deixa sós,
Leva um pouco de nós mesmos.

Há os que deixam muito,
Mas não há os que não deixam nada.
Esta é a mais bela responsabilidade em nossa vida,
A prova suprema de que as pessoas
Não se aproximam por acaso.

(Carlos Luiz Gonçalves)

Aos meus irmãos – **Marcos A. Varriano**, **Márcia M. Varriano** e **Andressa S. Ribeiro** -, pelo incentivo, confiança, paciência e amizade verdadeiras. Agradeço em especial aos meus pais – **Sebastião** e **Neide F. Varriano**, por cuidarem da Clarinha para que eu pudesse realizar este trabalho, por seu amor infinito e por ter feito acreditar que eu pudesse chegar sempre mais além!

“Vencer não é nada, se não se teve muito trabalho;
fracassar não é nada se se fez o melhor possível”

Nadia Boulanger

RESUMO

Varriano AA. Alterações clínicas e bioquímicas decorrentes do estresse crônico imprevisível e do estresse oxidativo em ratos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Diversos modelos animais de doenças inflamatórias contribuem para a elucidação dos mecanismos de sinalização envolvidos nas enfermidades humanas; associação do estresse físico/psicológico durante a evolução da doença experimental contribui para investigar a modulação desta resposta. O projeto foi dividido em duas partes. Primeiramente investigou-se a participação do estresse crônico imprevisível (ECI) na evolução clínica da encefalomielite autoimune experimental (EAE) e as concentrações circulantes de corticosterona (CORT). O ECI agravou os sinais clínicos da EAE em ratos Lewis, independentemente do momento no qual o estresse foi aplicado. Entretanto, as concentrações plasmáticas de CORT durante o desenvolvimento dos sinais clínicos pareceram depender unicamente do desafio imunológico. Posteriormente investigaram-se os fenômenos oxidativos e de defesa em diversas áreas do SNC de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal (IRI; estresse físico). Os animais IRI apresentaram aumento na expressão gênica de nNOS no córtex e COX-2 no hipotálamo quando comparados ao grupo Sham. IRI também causou uma redução significativa na atividade de NOS dependente de Ca^{2+} no córtex, hipotálamo e hipocampo, mas não no cerebelo. O oposto ocorreu com a atividade da arginase. A concentração de TBARs diminuiu no córtex e no hipotálamo, contudo a atividade de MPO e o conteúdo de 3-NT não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Baseados nestes resultados, conclui-se que, pelo menos nas primeiras duas horas de reperfusão intestinal, as lesões no SNC devem ser prevenidas por eficientes mecanismos modulatórios de defesa contra o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Estresse crônico imprevisível; Corticosterona; Encefalomielite autoimune experimental; Estresse oxidativo; Isquemia e reperfusão intestinal; Sistema nervoso central; Ratos.

ABSTRACT

Varriano AA. Clinical and biochemical alterations secondary to chronic unpredictable stress and oxidative stress in rats [Doctor thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Different animal models for inflammatory diseases help to clarify the signaling mechanisms involved in several human diseases; hence, the association of physical/psychological stress during the development of an experimental disease contributes to investigate the modulation of that response. The present project was divided in two parts. Firstly, we investigated the effects of chronic unpredictable stress (CUS) on the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and circulating corticosterone (CORT) concentrations. CUS aggravated the clinical signs of the disease in Lewis rats, independently of the moment at which stress was applied. However, plasma CORT during the development of clinical signs seemed to be solely dependent on the immunological challenge. Secondly, we investigated the oxidative and defense mechanisms in several CNS regions of rats submitted to intestinal ischemia-reperfusion (IIR; a physical stress). The results show that IIR animals presented higher levels of mRNA for nNOS in the frontal cortex and COX-2 in the hypothalamus than the Sham group. IIR also caused a marked reduction of calcium-dependent nitric oxide synthase activity in the frontal cortex, hypothalamus and hippocampus, but not in the cerebellum. Opposite results occurred with arginase activity. TBARs content was also lower in cortex and hypothalamus, but no statistically significant differences were observed in either MPO activity or protein 3-NT contents between Sham and IIR animals. Based on these results, we concluded that, at least during the first two hours of intestinal reperfusion, CNS lesions may be efficiently prevented by defense mechanisms able to modulate the oxidative injury.

Key words: Chronic unpredictable stress; Corticosterone; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Oxidative stress; Intestinal ischemia-reperfusion; Central nervous system; Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AA	– Ácido araquidônico
ACTH	– Hormônio adrenocorticotrófico
ADMA	– Dimetilarginina assimétrica
AI	– Arginase I
AII	– Arginase II
AL	– Argininosuccinato liase
AS	– Argininosuccinato sintetase
ATP	– Trifosfato de adenosina
AVP	– Arginina vasopressina
BH ₄	– Tetraidrobiopterina
BHE	– Barreira hematoencefálica
BHT	– Butilhidroxitolueno
Ca ²⁺	– Íon cálcio
CaM	– Calmodulina
CEEA	– Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CO ₃ ^{•-}	– Íon carbonato
CORT	– Corticosterona
COX	– Ciclooxygenase
CRF	– Fator liberador de corticotrofina
EAE	– Encefalomielite autoimune (alérgica) experimental
ECI	– Estresse crônico imprevisível
ELAM-1	– Molécula de adesão endotelial tipo 1
EM	– Esclerose múltipla
FAD	– Flavina-adenina dinucleotídeo
FMN	– Flavina mononucleotídeo
HIF-1	– Fator de transcrição <i>hypoxia inducible factor-1</i>
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
HO ₂ [•]	– Radical hidroperoxila
HPA	– Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal
HSP	– Proteína de choque térmico
HTAB	– Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	– Molécula de adesão intercelular tipo 1

IFN α – Interferon-alfa
IFN γ – Interferon-gama
IL1 – Interleucina-1
IL1 β – Interleucina-1-beta
IL2 – Interleucina-2
IL6 – Interleucina-6
i.p. – Intraperitoneal
IRC – Isquemia e reperfusão cerebral
IRF-1 – Fator de transcrição *interferon regulatory factor-1*
IRI – Isquemia e reperfusão intestinal
ISPF – Isonitrosopropiofenona
L-arg – L-arginina
L-cit – L-citrulina
LC/NE – *Locus ceruleus*/norepinefrina
LPS – Lipopolissacarídeo
MBP – Proteína básica de mielina
gp-MBP – Proteína básica de mielina de cobaia
MCA – Artéria cerebral média
MDA – Malondialdeído
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MODS – Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
MOG – Glicoproteína de oligodendrócito
MPO – Mieloperoxidase
NADPH – Fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NEC – Enterocolite necrotizante
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NMDA – N-metil-D-aspartato
NMMA – N^G-monometil-L-arginina
NO – Óxido nítrico
NO₂[•] – Dióxido de nitrogênio
NOS – Óxido nítrico sintase
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NOH-L-ARG – L-N^G-hidroxi-arginina
3-NT – 3-nitrotirosina
 $O_2^{\bullet-}$ – Radical ânion superóxido
 $OH^{\bullet}$ – Radical hidroxila
 $ONOO^-$ – Ânion peroxinitrito
PG – Prostaglandina
PIN – Proteína inibidora de NOS neuronal
PLP – Proteína de proteolípídeo
PMN – Polimorfonuclear
PSD – Densidade pós-sináptica
RNS – Espécies reativas de nitrogênio
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo
SH – Sham
SII – Síndrome do intestino irritável
SMF – Sistema monocítico fagocitário
SNC – Sistema nervoso central
SNE – Sistema nervoso entérico
SNS – Sistema nervoso simpático
SOD – Superóxido dismutase
SRIS - Síndrome da reação inflamatória sistêmica
S100 β sérica – Proteína de ligação de cálcio
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARs – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCR – Receptor de linfócitos T
TGI – Trato gastrointestinal
TH1 – T helper-1
TH2 – T helper-2
 $TNF\alpha$ – Fator de necrose tumoral-alfa
TXA₂ – Tromboxano A₂

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

Esquema 1 - Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) e mecanismo de retroalimentação	27
--	----

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Efeitos do ECI sobre mudanças de peso corporal (valores percentuais) em ratos <i>naïve</i> relativas ao primeiro dia do protocolo de estresse	43
Figura 2 - Efeitos do ECI sobre as concentrações plasmáticas de CORT em ratos <i>naïve</i>	44
Figura 3 – Efeitos do ECI sobre o peso corporal de ratos Lewis após imunização (relativo ao dia 0)	46
Figura 4 – Efeitos do ECI sobre a evolução clínica da EAE	49
Figura 5 – Efeitos do ECI sobre as concentrações plasmáticas de CORT em ratos Lewis medidas 13 dias após a inoculação com CFA ou gp-MBP	51

CAPÍTULO 2

Esquema 1 - Oxidação da L-arg`a L-cit catalisada pela NOS	61
Esquema 2 - Ciclo Citrulina-NO, <i>uptake</i> de arginina e metabolismo	68
Esquema 3 - O processo de peroxidação lipídica	71
Esquema 4 - Formação de produto de reação entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA)	72
Esquema 5 - Mecanismos para a produção de proteínas nitradas (P-TyrNO ₂)	73
Figura 1 - Efeito da IRI na expressão gênica da COX-1 no baço	92
Figura 2 - Efeito da IRI na expressão gênica da COX-2 no baço	93
Figura 3 - Efeito da IRI na expressão gênica da PIN no baço	94
Figura 4 - Efeito da IRI na expressão gênica da nNOS no baço	95
Figura 5 - Efeito da IRI na expressão gênica da eNOS no baço	96
Figura 6 - Efeito da IRI na expressão gênica da iNOS no baço	97
Figura 7 - Efeito da IRI sobre a atividade da NOS no tecido encefálico	99
Figura 8 – Efeito da IRI sobre a expressão gênica da COX-1 no tecido encefálico	101
Figura 9 – Efeito da IRI sobre a expressão gênica da COX-2 no tecido	102

encefálico	
Figura 10 – Efeito da IRI sobre a expressão gênica da PIN no tecido encefálico	103
Figura 11 – Efeito da IRI sobre a expressão gênica da nNOS no tecido encefálico	104
Figura 12 – Efeito da IRI sobre a expressão gênica da eNOS no tecido encefálico	105
Figura 13 – Efeito da IRI sobre a expressão gênica da iNOS no córtex	106
Figura 14 - Efeito da IRI sobre a atividade de arginase no tecido encefálico	108
Figura 15 - Efeito da IRI sobre o conteúdo de TBARs no tecido encefálico	110
Figura 16 - Efeito da IRI sobre o a atividade de mieloperoxidase no tecido encefálico	112
Figura 17 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos protéicos de tirosina no tecido encefálico	114
Figura 18 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do córtex frontal	115
Figura 19 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do hipotálamo	116
Figura 20 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do hipocampo	117
Figura 21 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do cerebelo	118
Figura 22 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de nNOS no tecido encefálico	120
Figura 23 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de eNOS no tecido encefálico	121
Figura 24 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de SOD1 no tecido encefálico	122
Figura 25 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de SOD2 no tecido encefálico	123
Figura 26 - Efeito da IRI na ativação do NF-κB no tecido encefálico	125

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - EAE em ratos submetidos a diversos protocolos de Estresse	36
Tabela 2 - EAE em ratos submetidos ao protocolo do ECI	38

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Descrição da seqüência de tubos utilizados para determinação da atividade de NOS	80
Tabela 2 - Características dos componentes para <i>Western Blot</i>	82
Tabela 3 - Características dos primers utilizados	84
Tabela 4 - Características dos ciclos de amplificação	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1 O Sistema Nervoso Central, sistema imunológico e o ambiente	23
1.2 Interações entre os sistemas: seus mediadores	24
2 OBJETIVOS GERAIS	28
 <u>CAPÍTULO 1: A MODULAÇÃO DA ENCEFALOMIELE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL EM RATOS LEWIS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL</u>	 29
1.1 Introdução	30
1.1.1 Esclerose múltipla e encefalomielite autoimune experimental	30
1.1.2 Estresse, EM e EAE	32
1.2 Objetivos	37
1.3 Material e Métodos	37
1.3.1 Animais	37
1.3.2 Indução da EAE e avaliação clínica	37
1.3.3 Paradigma do Estresse Crônico Imprevisível (ECI)	38
1.3.4 Medida de CORT plasmática	39
1.3.4.1 Princípio do método	39
1.3.4.2 Ensaio	40
1.3.5 Análise Estatística	41
1.4 Resultados	42
1.4.1 Validação do protocolo de ECI: mudanças de peso corporal e concentrações plasmáticas de CORT em ratos naïve após cada evento estressor	42
1.4.2 Efeitos do ECI sobre a evolução ponderal de ratos Lewis durante a EAE	45
1.4.3 Efeitos do ECI sobre os sinais clínicos da EAE	47
1.4.4 Efeitos do ECI sobre a CORT plasmática em ratos Lewis durante EAE	50
1.5 Discussão	52
 <u>CAPÍTULO 2: ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS DE DEFESA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL</u>	 56
2.1 Introdução	57
2.1.1 Relações entre sistema nervoso central e trato gastrointestinal	57

2.1.2 Isquemia e reperfusão Intestinal	59
2.1.3 Efeitos da IRI em órgãos distantes	60
2.1.4 O papel do NO e das ciclooxygenases na isquemia e reperfusão	60
2.1.5 Arginase e regulação de NO	67
2.1.6 PIN e modulação da nNOS	69
2.1.7 Peroxidação lipídica e 3-nitrotirosina como biomarcadores do estresse oxidativo	70
2.1.8 O papel das superóxido dismutases no estresse oxidativo	74
2.1.9 O papel do baço na IRI	75
2.2 Objetivos	77
2.3 Material e Métodos	78
2.3.1 Animais	78
2.3.2 Indução da isquemia e reperfusão Intestinal	78
2.3.3 Medida da atividade de óxido nítrico sintase (NOS)	79
2.3.4 Avaliação da expressão protéica por Western Blot	80
2.3.5 Expressão gênica de PIN e isoformas de NOS e de COX	83
2.3.5.1 Extração do RNA total	83
2.3.5.2 Transcrição do cDNA	84
2.3.5.3 PCR	84
2.3.5.4 Separação dos produtos de PCR	85
2.3.6 Medida da atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO)	87
2.3.7 Determinação do conteúdo tecidual de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs)	87
2.3.8 Medida da atividade de arginase	88
2.3.9 Ensaio do NF- κ B	89
2.3.9.1 Extração de proteínas nucleares	89
2.3.9.2 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética ("gel shift")	89
2.3.10 Análise estatística	90
2.4 Resultados	91
2.4.1 Expressão gênica de PIN e isoformas de NOS e COX no baço	91
2.4.2 Atividade da NOS no tecido encefálico	98
2.4.3 Expressão gênica de PIN e isoformas de NOS e COX no tecido encefálico	100
2.4.4 Atividade de arginase no tecido encefálico	107
2.4.5 Conteúdo de TBARs no tecido encefálico	109
2.4.6 Atividade de MPO no tecido encefálico	111

2.4.7 Nitração de resíduos protéicos de tirosina no tecido encefálico	113
2.4.8 Expressão protéica de nNOS, eNOS, SOD1 e SOD2 no tecido encefálico	119
2.4.9 Ativação do fator de transcrição NF- κ B no tecido encefálico	124
2.5 Discussão	126
3 CONCLUSÕES GERAIS	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O Sistema Nervoso Central, sistema imunológico e o ambiente

O sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico estão interligados por meio de uma rede bidirecional, capaz de perceber e responder a diferentes estímulos gerados no ambiente interno (como inflamação ou infecção) ou externo (como estresse psicológico). A reatividade imunológica está sob o controle do SNC por meio de rotas neurais e endócrinas, e do lado inverso, mediadores da resposta imunológica celular e humoral, que têm lugar no tecido periférico, exercem efeito intenso na função cerebral (Sternberg, 1997). Este circuito é ativado durante a reação ao estresse, com o objetivo de preservar o organismo por meio da reação de defesa (“luta ou fuga”), caracterizada por respostas moleculares e comportamentais adaptativas às alterações ambientais. Portanto, a interação dos componentes deste circuito e sua ativação pelo estresse são cruciais para a sobrevivência e funcionamento fisiológico e psicológico estáveis. Entretanto, um controle inadequado na resposta ao estresse, com desequilíbrio dos componentes deste circuito, está associado à patogenia de doenças sistêmicas, neurodegenerativas e transtornos afetivos (Lipp, 2003).

A própria definição de estresse é complexa, pois o termo pode ser utilizado tanto para descrever os estímulos que “geram ou representam” uma quebra da homeostasia do organismo, como a resposta comportamental criada por tal desequilíbrio (Lipp, 2003). Do mesmo modo, o estressor pode ser definido como qualquer estímulo físico e/ou psicológico que represente uma ameaça à homeostasia. O estressor físico representa um desafio homeostático genuíno - como trauma, hemorragia e infecção - levando a respostas reativas (reflexas) neuronais, humorais e imunológicas. Já o estressor psicológico, mesmo não representando uma ameaça real à homeostasia, é “interpretado” como tal, gerando uma resposta reativa e antecipatória de defesa no SNC. Nesta categoria de estressores estão incluídos, por exemplo, a presença de predadores e situações ambientais ou sociais aversivas (Herman et al., 2003).

1.2 Interações entre os sistemas: seus mediadores

O SNC era tradicionalmente reconhecido como um sítio imunologicamente privilegiado, uma vez que é desprovido de sistema linfático que captura antígenos potenciais e é protegido do sangue circulante pela barreira hematoencefálica (BHE), uma vasculatura especializada consistindo de células endoteliais firmemente justapostas. Esta barreira é impermeável a muitas substâncias solúveis, incluindo imunoglobulinas e fatores de crescimento e restringe a migração de células linfóides. Também, células do SNC (neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia) expressam constitutivamente níveis baixos de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade I e II (MHC), que têm um papel importante na indução e regulação da resposta imunológica (Benacerraf, 1981; Wong et al., 1984).

No entanto, linfócitos T ativados no tecido periférico têm a capacidade de cruzar a BHE e liberar citocinas no SNC, que em condições adequadas induzem as células gliais a produzirem moléculas relevantes imunologicamente, tais como determinantes MHC, moléculas de adesão celulares e vários outros mediadores solúveis. Estas células gliais, além de tudo, podem processar e apresentar proteínas do SNC para as células T. A migração de linfócitos T através da BHE não é um processo meramente randômico, uma vez que a infiltração é seletiva em áreas do SNC onde ocorrem mudanças degenerativas e caracterizadas pela expressão de moléculas de adesão celular, MHC e citocinas; lembrando, portanto as alterações observadas nas lesões inflamatórias (Neumann e Wekerle, 1998).

Além das células imunológicas ativadas, as citocinas periféricas constituem importante via de comunicação entre o sistema imunológico e o SNC. Estas proteínas têm importante papel na ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) em todos os três níveis: o hipotálamo, pituitária e adrenal. Por exemplo, a ação estimulatória da interleucina-1 (IL1) sobre o eixo HPA tem sido amplamente estudada (Bateman et al., 1989; Navarra et al., 1991; Sapolsky et al., 1987; Tsagarakis et al., 1988). O mecanismo de ativação deste eixo também parece envolver a IL2 (Bindon et al., 1983), IL6 (Naitoh et al., 1988; Navarra et al., 1991), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α ; Sharp et al., 1989), interferon-gama (IFN- γ ; Holsboer et al., 1988) e IFN-alfa (IFN- α ; Roosth et al., 1986).

Citocinas periféricas exercem inúmeros efeitos sobre as funções neuronais, incluindo controle da ingestão de alimento, febre, regulação neuroendócrina e

comportamento. Elas assim o fazem por meio de várias rotas, incluindo transporte através da BHE, passagem pelos órgãos circunventriculares (sítios que têm capilares com junções abertas e abundantes fenestrações) e sinalização direta do cérebro por meio do nervo vago (Sternberg, 1997). No SNC, as citocinas podem agir de forma direta ou pela liberação de intermediários, tais como prostaglandinas (PG, Navarra et al., 1991) e óxido nítrico (NO). A síntese de NO pode ser induzida no cérebro como uma consequência de inflamação sistêmica e assim alterar a função do eixo HPA (Wong et al., 1996).

Citocinas também podem ser produzidas localmente por diferentes células do SNC, tais como neurônios, glia e vasculatura cerebral, onde desempenham um importante papel tanto no desenvolvimento normal do cérebro, atuando como fatores neurotróficos, bem como nas lesões cerebrais. Embora as citocinas e seus receptores sejam expressos no cérebro (normalmente em baixos níveis), o aumento de sua produção está associado a vários distúrbios neurodegenerativos, tais como esclerose múltipla, neuroaids e doença de Alzheimer (Sredni-Kenigsbuch, 2002).

O SNC regula a reação ao estresse e a resposta imunológica por meio de vários circuitos neurais interligados que incluem o eixo HPA, o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema límbico.

O eixo HPA tem seu papel bem caracterizado como importante via envolvida na adaptação do organismo ao desafio homeostático. Primeiramente, o hipotálamo é ativado por diferentes mecanismos (tais como citocinas, fibras nervosas aferentes viscerais e estresse psicológico) produzindo o CRF (fator liberador de corticotrofina). Este flui por via venosa para a glândula pituitária que, por sua vez, libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no sangue, estimulando as glândulas adrenais a produzir hormônios glicocorticóides. Estes hormônios têm uma importância primária nos estados de estresse, influenciando o metabolismo celular e gerando uma mobilização de substratos energéticos necessários para a produção de respostas fisiológicas adaptativas à presença dos agentes estressores. Por exemplo, os glicocorticóides podem inibir a proliferação de células T para controlar uma resposta inflamatória sistêmica. Outro importante mediador co-expresso no hipotálamo é o peptídeo arginina-vasopressina (AVP), que atua sinergicamente com o CRF para aumentar a liberação de ACTH. Finalmente a atividade do eixo HPA é controlada por retroalimentação negativa, mediada pela ligação de glicocorticóides a receptores específicos situados em neurônios de diversas áreas do sistema nervoso central. O

primeiro mecanismo regulatório é um mecanismo de retroalimentação negativa direta, no qual glicocorticóides se ligam em receptores localizados nos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico e na hipófise, levando a uma redução na expressão de CRF e a conseqüente redução na liberação de ACTH e glicocorticóides. O segundo mecanismo regulatório atua em paralelo com o primeiro e ocorre por meio do circuito límbico inibitório. Várias estruturas do sistema límbico ricas em receptores para glicocorticóides estão envolvidas, como hipocampo e córtex pré-frontal. A ativação destes receptores induz excitação neuronal de neurônios GABAérgicos nas regiões da estria terminal e área pré-óptica que se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo, aumentando a inibição nessa região, com conseqüente redução na produção de CRF e inibição do eixo HPA (Herman et al., 2003); (esquema 1).

O SNS constitui outra via pela qual o SNC estabelece o controle sobre o restabelecimento da homeostasia. Além dos efeitos cardiovasculares, hemodinâmicos e metabólicos, neurotransmissores liberados pelo SNS afetam a função imunológica por meio de caminhos adrenérgicos mediados por receptor (Molina, 2005). Por exemplo, catecolaminas por meio da sua interação com receptores β_2 nos macrófagos inibem a produção de $\text{TNF}\alpha$; o contrário ocorre por meio de sua interação com receptores α_1 -adrenérgicos (Lorton et al., 2003).

O estresse psicológico constitui o fator externo capaz de alterar o estado fisiológico de inúmeros órgãos do organismo, de modo a prepará-lo para reações de luta ou fuga para assegurar sua sobrevivência. De modo semelhante ao que ocorre no estresse físico, os diversos eventos adaptativos também são complexamente orquestrados e envolvem muitas regiões do cérebro em circuitos de retroalimentação, que algumas vezes podem amplificar a resposta. Estão envolvidos principalmente o eixo HPA, tendo os glicocorticóides como moléculas efetoras finais e o *locus ceruleus*, com produção de norepinefrina (LC/NE), além da produção de epinefrina pela medula adrenal. Entretanto, estes estressores requerem primeiramente a participação de estruturas límbicas interligadas sinapticamente como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal para dar início ao processamento das respostas adaptativas (Herman et al., 2003); (esquema 1).

Desequilíbrios dos circuitos do estresse, envolvendo tanto superativação ou hipo-ativação do eixo HPA, estão associados a diversas patologias humanas, constituindo alvos terapêuticos potenciais. Por exemplo, antagonistas do CRF têm

sido úteis no tratamento da depressão melancólica e transtorno da ansiedade associadas com hiperatividade crônica do sistema de estresse. Inversamente, potencializadores da secreção/ação de CRF devam ser úteis para tratar depressão atípica, depressão pós-parto e fibromialgia, todas caracterizadas por embotamento da atividade do eixo HPA e atividade LC/NE, fadiga, sintomatologia depressiva, hiperalgesia e resposta aumentada a estímulos imunológicos/inflamatórios (Tsigos e Chrousos, 2002).

Esquema 1 - Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) e mecanismo de retroalimentação. Os principais hormônios que ativam o eixo HPA são o CRF (fator liberador de corticotrofina), AVP (arginina vasopressina) e ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). O eixo é regulado por meio de uma alça de retroalimentação comandada pelos glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) atuando em diversas áreas cerebrais, como hipotálamo e pituitária. A liberação simultânea de glicocorticóides para a circulação resulta em inúmeros efeitos, incluindo ações metabólicas, antiinflamatórias e imunossupressoras. Estruturas límbicas cerebrais (como hipocampo e amígdala), neuropeptídeos e neurotransmissores também são capazes de regular o eixo HPA. FONTE: Lundbeck Institute, 2003.

2 OBJETIVOS GERAIS

Tendo primeiramente como base a interação entre o SNC e o ambiente interno/externo e levando em consideração que:

1) diversos modelos animais de doenças inflamatórias e imunológicas contribuem para a elucidação dos mecanismos de sinalização centrais envolvidos nas diversas enfermidades humanas;

2) o estresse durante a evolução de doença experimental contribui para investigar a modulação (atenuação ou amplificação) desta resposta;

os objetivos do presente trabalho foram:

a) investigar os efeitos do estresse crônico imprevisível em ratos com encefalomielite autoimune experimental (EAE), sobre a evolução clínica da doença e relacionar com as concentrações de corticosterona plasmática (Capítulo 1);

b) investigar os efeitos da isquemia e reperfusão intestinal (IRI; uma forma de estresse físico) sobre a expressão e atividade de mediadores inflamatórios e o estresse oxidativo no sistema nervoso central de ratos (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

A MODULAÇÃO DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL EM RATOS LEWIS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

1.1 Introdução

1.1.1 Esclerose múltipla e encefalomielite autoimune experimental

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica inflamatória crônica, caracterizada pela infiltração de células do sistema imunológico no sistema nervoso central (SNC), destruição localizada de mielina e perda de oligodendrócitos. Acomete predominantemente adultos jovens, entre os 20 e 40 anos. É mais comum em mulheres (proporção de 2 para 1) e em indivíduos da raça branca. Embora sua distribuição e caracterização clínica no Brasil não sejam bem conhecidas, estudos de prevalência nos municípios de São Paulo (Callegaro et al., 2001) e Belo Horizonte (Lana-Peixoto et al., 2002) revelam taxas de 15/100.000 habitantes e 18/100.000 habitantes, respectivamente. A EM traz consigo, além do sofrimento individual e familiar, grande sobrecarga econômica à sociedade, devido à perda de força de trabalho, curso prolongado e elevado custo do tratamento.

Acredita-se que seja uma doença autoimune, na qual o sistema imunológico do organismo ataca a própria mielina (provocando a desmielinização dos neurônios), bem como seus constituintes lipoprotéicos. O ataque à mielina interfere na condução dos impulsos nervosos ao longo dos axônios. Sintomas mais comuns resultantes deste processo patológico, que são observados durante os surtos, incluem: dormências, formigamentos, fraqueza afetando um ou mais membros, turvação visual, diplopia, falta de coordenação motora, zumbido, vertigem, tremores, dor, distúrbios esfinterianos (incontinência) e fadiga. São sintomas mais raros: demência, afasia, convulsões, movimentos involuntários dos membros, cefaléia e dificuldade para engolir (Rolak, 1996). Pacientes com EM, além de apresentarem sintomas físicos, apresentam também sintomas emocionais. Por exemplo, estudos demonstram que 80% dos pacientes com EM apresentam algum tipo de alteração de humor, sendo que a depressão é o transtorno mais comumente relatado. Outros transtornos que podem estar associadas à EM são: depressão bipolar, riso e choro patológico, psicose e deterioração cognitiva (Baretz e Stephenson, 1981). As alterações provocadas pela EM sobre o humor e o comportamento são baseadas em evidências clínicas, não havendo ainda estudos animais que possibilitem o melhor entendimento dessas alterações.

Embora os antígenos específicos responsáveis pela resposta autoimune na EM não tenham sido totalmente determinados, postula-se que esse processo seja iniciado quando macrófagos, que expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II), apresentam peptídeos antigênicos aos receptores de linfócitos-T (TCR) nas células T helper-1 (TH1). Posteriormente, leucócitos circulantes da vasculatura cerebral aderem à superfície das células endoteliais. Proteases liberadas pelos leucócitos lesam o tecido e facilitam a diapedese dessas células para o parênquima cerebral. Desta forma, a destruição da mielina seria mediada pela ação de: células T (que secretariam o TNF- α , tóxico para oligodendrócitos), macrófagos (por meio de sua ação fagocitária e liberação de TNF- α , radicais livres e proteases) e linfócitos B (que se diferenciam em plasmócitos, secretando anticorpos que ativam o sistema complemento, promovendo o ataque à bainha de mielina).

Apesar dos recentes avanços no conhecimento da EM, sua patogênese permanece em parte desconhecida, deste modo dificultando a intervenção de estratégias terapêuticas mais efetivas. Uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na sua etiologia e evolução é importante, não somente para o esclarecimento da patogênese da EM, como também para a formulação de estratégias terapêuticas mais efetivas na intervenção imunológica. Neste sentido, o emprego do modelo experimental da EM, a encefalomielite autoimune (ou alérgica) experimental (EAE), tem trazido grandes contribuições.

Estudada desde a década de 30, a EAE pode ser induzida ativamente em roedores por imunização com constituintes da mielina, tais como a proteína básica de mielina (MBP), proteína de proteolípídeo (PLP), e glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG). Também pode ser induzida pela transferência passiva de células T CD4⁺ encefalitogênicas. De acordo com a espécie e linhagem animal, a doença pode apresentar-se, por exemplo, sob a forma monofásica aguda ou sob a forma crônica com ataques e remissões (Martin e McFarland, 1995; Teixeira et al., 2005).

A forma monofásica aguda pode ser induzida em ratos Lewis por imunização ativa ou por transferência passiva. Em ambos os casos, a doença é caracterizada por um curso paralisante ascendente, que primeiramente afeta a cauda e os membros posteriores, progredindo para os membros anteriores, levando eventualmente à morte. O exame histopatológico demonstra que a forma

monofásica aguda da doença está associada à inflamação do parênquima perivascular (Wekerle et al., 1994).

Assim como a EM, a patogênese da EAE não está completamente compreendida. Resultados de vários estudos sugerem que citocinas e outras substâncias solúveis secretadas por células inflamatórias ativadas nas lesões medeiam alterações patológicas, enquanto que citocinas provenientes de células TH2 e corticosterona (CORT) são importantes na fase de recuperação da doença.

1.1.2 Estresse, EM e EAE

O estresse é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das maiores ameaças à saúde humana do século XXI. Estima-se que cerca da metade das interações diárias nos Estados Unidos atualmente é causada por distúrbios decorrentes do estresse. Muito embora a reação ao estresse constitua estratégia de defesa (reação de luta ou fuga), a relação entre estresse físico e psicológico em humanos e animais tem sido implicada no desenvolvimento e curso de doenças estreitamente relacionadas a mecanismos imunológicos, tais como infecções, neoplasias e doenças autoimunes (da Silva, 1999). Embora o estresse tenha mostrado induzir supressão da resposta imunológica, ele pode também causar imunopotenciação (Zalcman, Richter e Anisman, 1989).

Em humanos, estima-se que cerca de um terço das diferenças nas reações ao estresse são condicionadas pelos fatores genéticos. Além disso, a sensibilidade ao estresse parece estar relacionada também a fatores ambientais, tais como experiências sofridas na primeira infância. A estrutura da personalidade do indivíduo também constitui fator importante envolvido na sua suscetibilidade. Por exemplo, pessoas cuja personalidade se caracteriza por irritabilidade, animosidade e desconfiança parecem mais propensas ao estresse do que aquelas que se destacam pela sensibilidade, pela alegria e pelo anseio por harmonia. Porém, o componente psicossocial parece constituir o fator determinante no desencadeamento de doenças relacionadas ao estresse: quanto mais autônoma e dona do seu destino é uma pessoa, menos sujeita estará às tensões e ao estresse (Sadre-Chirazi-Stark e Sandmayer, 2006).

Similarmente, nos modelos animais, o efeito do estresse depende de inúmeros fatores, como: natureza do estímulo, duração e frequência, relação

temporal entre estresse e evento imunológico, idade do animal, genética, gênero, prévia exposição ao estresse e habilidade de adaptação (Monjan, 1981).

Em humanos e animais, experiências estressantes que têm se mostrado imunossupressivas resultam em aumento na incidência e na gravidade de doenças infecciosas e neoplasias. No caso de doenças autoimunes como a EM, esta imunossupressão deveria ser benéfica ao hospedeiro, por suprimir respostas imunológicas indesejadas e deletérias. Porém, isso nem sempre parece corresponder à realidade; alguns relatos na literatura sobre pacientes com EM correlacionam situações estressantes ao desencadeamento de surtos. Charcot (1877) já relatava, há mais de um século, que situações pessoais de súbita tristeza e de mudanças sociais poderiam ser desencadeantes de surtos. No entanto, é necessário considerar que, apesar da relação entre o sistema imunológico e o estresse, não é fácil classificar o tipo ou o efeito do estresse sobre um determinado indivíduo. Alguns estudos não mostraram relação entre o estresse e os surtos de EM (Antonovsky et al., 1968; Pratt, 1951). Entretanto, outros mostraram uma possível relação entre os fatos (Ackerman et al., 2003; Buljevac et al., 2003; Schwartz et al., 1999; Warren, Warren e Cockerill, 1991). É interessante inclusive notar que um estudo mostrou que o estresse excessivo e contínuo resultante de um estado de guerra pareceu mostrar uma relação inversa com a presença de novos surtos da doença (Nisipeanu e Korczyn, 1993). A possibilidade da liberação de cortisol endógeno mediante tais situações foi aventada como fator protetor de surtos durante o estresse (Munck e Naray-Fejes-Toth, 1994). Continua, portanto aberta à questão da relação entre estresse e surtos de EM e avaliações clínicas prospectivas necessitam ser conduzidas.

Uma vez que o estresse deve modular respostas imunológicas por meio da ativação do eixo HPA e do sistema nervoso simpático, e sendo a EAE uma doença autoimune, esta deveria, portanto estar sob a influência do eixo HPA, do sistema nervoso simpático e, provavelmente, do estresse. A supressão da EAE pelo estresse foi demonstrada pela primeira vez em ratas Lewis expostas ao estresse crônico de contenção (*restraint*), iniciado seis dias antes da indução de EAE e prolongado por 19 dias durante o curso da doença; o mesmo não foi observado quando as sessões de estresse eram iniciadas mais tardiamente (Levine et al., 1962). Griffin et al. (1993) e Whitacre, Dowdell e Griffin (1998), utilizando um protocolo similar ao de Levine et al. (1962), observaram que o efeito supressor do

estresse ocorria somente para sessões diárias de 9 horas de contenção, o mesmo não se reproduzia com sessões de est

resse reduzidas a 1 hora/dia. Ohashi, Shouzu e Arita (1997) demonstraram que ratas Lewis imersas diariamente em banho de água a 44°C por cinco minutos, durante 13 dias após imunização, também apresentaram redução na gravidade da doença. Também foi demonstrado que ratos submetidos a sessões de choques durante 19 dias após imunização apresentavam diminuição na incidência e gravidade da doença (Bukilica et al., 1991). Kuroda, Mori e Hori (1994), demonstraram que uma supressão significativa da doença ocorria somente quando ratos eram submetidos ao estresse de contenção por três noites consecutivas durante a fase tardia pré-clínica da doença, mas não durante a fase inicial pré-clínica. Estes resultados encontram-se organizados e descritos de forma resumida na Tabela 1.

A natureza do estresse crônico (previsível ou imprevisível) também parece ser crucial para se determinar a influência do estresse sobre o desenvolvimento de EAE. De fato, Correa et al. (1998), expondo ratas Wistar ao estresse crônico imprevisível, encontraram resultados divergentes: enquanto a exposição a uma seqüência de eventos estressores 14 dias após a imunização agravava a doença, a mesma exposição durante os 14 dias prévios à imunização com mielina bovina teve efeito supressor sobre o curso da EAE (Tabela 1).

Durante a EAE, há aumento de glicocorticóides endógenos que, se acredita serem responsáveis pela recuperação espontânea da doença. Em estudos nos quais foram aplicados diversos paradigmas de estresse crônico previsível, seria de se esperar um maior aumento de glicocorticóides pelo estresse, que exerceriam seu efeito imunossupressor e antiinflamatório, com posterior habituação das respostas do eixo HPA e rebaixamento nos níveis de glicocorticóides. Entretanto, se o estresse crônico é aplicado de modo imprevisível, mediante situações aversivas das quais não há escape ou sobre as quais não se tem controle, a adaptação é muito menos provável de ocorrer, com níveis altos de glicocorticóides mantidos durante tempos mais prolongados. Apesar de seu efeito antiinflamatório e imunossupressor, glicocorticóides podem exercer efeitos pró-inflamatórios, que dependem da dose, duração do estresse e célula/tecido em questão. Por exemplo, trabalhos recentes têm demonstrado que tanto o tratamento crônico com corticosterona ou o estresse crônico imprevisível podem aumentar neurotoxicidade

no hipocampo após insultos excitotóxicos (Dinkel, MacPherson e Sapolsky, 2003; MacPherson, Dinkel e Sapolsky, 2005; Munhoz et al., 2006). Além de glicocorticóides, outros mediadores, tais como citocinas e catecolaminas podem ser modulados diferentemente de acordo com a natureza do estresse, contribuindo deste modo para as variações na susceptibilidade à doença.

Tabela 1 - EAE em ratos submetidos a diversos protocolos de Estresse

Citação	Animal	Protocolos de Estresse	Resultados
Levine et al., 1962	Lewis fêmeas	Contenção diária: • Dias -6 a 18 • Dias 9 a 18 após imunização	• Redução na incidência e escore clínico • Sem efeitos sobre a EAE
Bukilica et al., 1991	Ratos Dark Agouti	Choques elétricos: 80 choques de 1mA, duração 5s, 5-120 s entre os choques • Durante 19 dias após imunização • Durante 19 dias antes da imunização	• Atraso no aparecimento dos sinais clínicos, redução na incidência, duração, escore clínico e histopatológico • Sem efeitos sobre a EAE
		Som: 90 db, 1 h/dia, 60x, duração 5 s, 5-115s entre cada campainha) • Durante 19 dias após imunização • Durante 19 dias antes da imunização	• Estresse apenas atrasou o aparecimento dos sinais clínicos • Sem efeitos sobre a EAE
Griffin et al., 1993	Lewis machos e fêmeas	Contenção diária: • 1 h/dia: dias -5 a 18 • 9h/dia: dias -5 a 18	• Estresse pareceu agravar sinais clínicos da EAE em ratos machos (não significativo) • supressão da EAE em ambos os sexos, mais significativa nas fêmeas
Kuroda, Mori e Hori, 1994	Lewis fêmeas	Contenção por 3 noites consecutivas • Dias 1 a 3 após imunização • Dias 8 a 10 após imunização	• Sem efeitos sobre a EAE • Atraso no início da doença, redução do escore clínico e histopatológico
Owhashi, Shouzui e Arita, 1997	Lewis fêmeas	Imersão das gaiolas em água a 44 graus, 5 min: • Durante 13 dias após imunização • Durante 10 dias antes da imunização	• Atraso no aparecimento dos sinais clínicos, redução da incidência e escore clínico • Sem efeitos sobre a EAE
Whitacre, Dowdell e Griffin, 1998	Lewis, machos e fêmeas	Contenção diária: • 1h/dia: dias -5 a 18 • 9h/dia: dias -5 a 18	• Estresse agravou EAE em machos (não significativo) • Redução do escore clínico e histopatológico, mais significativa nas fêmeas.
	B10.PL	Contenção diária: • 12-14h/dia: dia -1 a 14 12-14h/dia: dia 20 a 35	• Supressão dos sinais clínicos, retornando 10 dias após término do estresse. • Sem efeitos sobre a EAE
Correa et al., 1998	Wistar, fêmeas	ECI: • 14 dias antes imunização • 14 dias após imunização	• Redução do escore clínico e histopatológico • Piora do escore clínico e histopatológico
Dowdell et al., 1999	B10.PL	Contenção diária: • 1, 6 e 12 h/dia	• Supressão da EAE somente quando o estresse era aplicado 12 h/dia.

1.2 Objetivos

Investigar os efeitos do estresse crônico imprevisível aplicado em ratos com encefalomielite autoimune experimental (EAE), avaliando a evolução dos sinais clínicos da doença, evolução do ganho ponderal e a influência sobre o eixo HPA.

1.3 Material e Métodos

1.3.1 Animais

Ratos machos Lewis de aproximadamente seis semanas de idade (160 - 180g) foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). Os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (Departamento de Farmacologia, ICB/USP) onde foram aleatoriamente alocados nos diferentes grupos experimentais, após um período de aclimatização de pelo menos duas semanas antes de qualquer manipulação relacionada ao protocolo experimental. Durante todo o período experimental, os ratos eram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de 3-5 animais, sob condições controladas de temperatura e iluminação ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro 12/12 h - claro entre as 07h00min e as 19h00min), com acesso à água e ração *ad libitum*, exceto pelas ocasiões em que estes fatores foram modificados como parte do procedimento do estresse crônico imprevisível (ECI).

Os animais foram utilizados seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e após aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

1.3.2 Indução da EAE e avaliação clínica

A indução de EAE nos animais (**grupo I**) consistiu na administração de 100 μL de uma emulsão contendo 25 μg de proteína básica de mielina de cobaia (gp-MBP, Sigma Chemical Co., USA) emulsionada com igual volume de adjuvante completo de Freund's (CFA), suplementado a 4 mg/ml com *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco laboratory, Detroit, MI, USA). Esta emulsão foi injetada subcutaneamente no coxim plantar de cada pata posterior dos animais. A

imunização seguiu-se após anestesia com halotano por via inalatória, e o dia da administração foi considerado o dia zero da doença. Animais não imunizados com a proteína encefalitogênica receberam uma emulsão de CFA em solução salina fisiológica (0,9% NaCl, 1:1), servindo como controle para excluir quaisquer efeitos próprios do CFA (**grupo CFA**).

Parte dos animais de cada um dos grupos **I** e **CFA** foi submetida ao protocolo do ECI, descrito mais adiante (*“Paradigma do Estresse Crônico Imprevisível- ECI”*), definindo desta forma todos os grupos experimentais do estudo: **CFA, I, E-CFA, E-I, CFA-E, I-E**.

Os animais foram pesados e examinados diariamente para verificar a presença de sinais neurológicos. Os sinais da EAE foram classificados em diferentes estágios clínicos, refletindo a gravidade da doença e a cada um deles foi outorgado uma pontuação como segue:

- 0: sem sinais clínicos;
- 0,5: atonia parcial da cauda;
- 1: perda completa do tônus da cauda;
- 2: paralisia parcial das patas traseiras;
- 3: paralisia completa das patas traseiras;
- 4: tetraplegia;
- 5: morte.

1.3.3 Paradigma do Estresse Crônico Imprevisível (ECI)

O protocolo consistiu em expor os animais a um tipo diferente de evento de estresse a cada dia, durante 7 dias consecutivos, descrito como segue:

- Evento 1: imobilização por 60 minutos em tubos de PVC (manhã);
- Evento 2: luzes apagadas por 2 horas (tarde);
- Evento 3: frio (4°C) por 60 minutos (tarde);
- Evento 4: luzes acesas por 24 horas;
- Evento 5: natação por 15 minutos (tarde);
- Evento 6: privação de água e alimento por 12 horas (noite);
- Evento 7: imobilização por 60 minutos (manhã).

Após a validação do protocolo do ECI em ratos *naïve*, o mesmo foi aplicado em parte dos animais dos grupos **I** e **CFA**, durante a semana prévia (dia -7 ao dia -1; definindo os grupos **E-I** and **E-CFA**) ou após (dia 1 ao dia 7; definindo os grupos

I-E e **CFA-E**) à imunização (dia 0). Os animais não submetidos ao procedimento de estresse (grupos **CFA** e **I**) eram mantidos em gaiolas coletivas e recebiam os mesmos cuidados de manipulação, exceto quanto à aplicação dos procedimentos do protocolo.

Animais de todos os grupos experimentais (**CFA**, **I**, **E-CFA**, **E-I**, **CFA-E**, **I-E**) foram eutanasiados por decapitação 13 dias após a inoculação (correspondendo à fase de evolução inicial da doença) para medida das concentrações circulantes de CORT, ou no 24º dia (quando totalmente recuperados da EAE) para avaliação ponderal e do escore clínico.

1.3.4 Medida de CORT plasmática

Primeiramente, ratos Lewis *naïve* foram expostos diariamente ao protocolo do ECI descrito anteriormente (grupo **Estresse**). Animais não estressados foram definidos como grupo **Controle**. Os animais eram pesados diariamente, ao fim de cada evento de estresse (dias 1 a 7) e 24 horas após o último evento (dia 8).

Quatro a cinco animais de cada grupo foram eutanasiados por decapitação após cada evento e amostras de sangue foram coletadas em solução salina isotônica heparinizada (1:10) para medida de CORT por radioimunoensaio.

Posteriormente, foram determinados os níveis de CORT, após 13 dias da imunização, nos seis grupos experimentais (**CFA**, **I**, **E-CFA**, **E-I**, **CFA-E**, **I-E**), como relatado no item 1.3.3.

As dosagens de CORT foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Cristóforo Scavone. As amostras foram preparadas seguindo o método do McEwen. Inicialmente, alíquotas de 20 µL de plasma foram transferidas para 980 µL de tampão PBS 0,01 M e incubadas em banho de água a 75 °C durante 1 hora, para deslocar a CORT da sua ligação com a globulina plasmática. Após a incubação, alíquotas de 100 µL foram utilizadas para a dosagem da concentração de CORT.

1.3.4.1 Princípio do método

O ensaio consiste na adição de um anticorpo contra a CORT presente nas amostras e de ³H- CORT como traçador da reação. O anticorpo se liga tanto à CORT quanto à ³H-CORT. Ao adicionar a solução de carvão ativado no meio de reação, o carvão precipita o complexo CORT-anticorpo e a CORT que não se ligou

ao anticorpo fica em solução. A Leitura da radioatividade é realizada na fase líquida, ou seja, mede-se a quantidade de CORT livre. Desta forma, quanto maior a concentração de CORT na amostra, maior será a fração da mesma ligada ao anticorpo e, portanto, precipitada pelo carvão disponibilizando mais ^3H - CORT livre na fase líquida e maior será a contagem de radioatividade.

1.3.4.2 Ensaio

Adicionou-se em tubo de polipropileno 100 μL de plasma ou padrão de CORT ou tampão de diluição (0,01 M de PBS) para os tubos Totais e brancos (total representa a contagem da radioatividade total de traçador adicionado; branco representa ausência total de CORT) e 100 μL da solução de anticorpo diluído (corticosterone antiserum developed in rabbit Sigma[®] cat# C8784) em tampão PBS 0,01 M, acrescido de 0,1% de gelatina de pele de porco – ^3H CORT (~ 20.000 cpm por tubo). Os tubos foram incubados a 4°C, durante 24 horas.

Após este período, adicionou-se 500 μL de suspensão de carvão ativado (1,25g de carvão ativo, PM=12,01 e 0,125g de Dextran 70, para 500 ml de solução preparada em Tampão PBS 0,01 M) em todos os tubos, exceto para os tubos Totais onde adicionou-se 500 μL de Tampão 0,01M PBS.

Os tubos foram submetidos à agitação em “vórtex” após cada uma das etapas, garantindo com isso menor variabilidade dos resultados.

Os tubos foram centrifugados a 12000 g por 10 minutos a 4°C. 400 μL do sobrenadante foram removidos e colocados em um vial contendo 6 ml de líquido de cintilação (Packard; ULTIMA GOLD- Perkin Elmer) e a contagem em cpm de ^3H -CORT foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida (contador β por 1minuto).

A curva padrão foi plotada usando $\ln[\text{cort}]$ no eixo x, e no eixo y: $\ln[\text{cpm}/(\text{branco-cpm})]$. Os valores das amostras foram calculados interpolando-se os valores de y na curva padrão e expressos $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ de plasma.

1.3.5 Análise estatística

Os resultados, expressos como média $\pm$ EPM e área sob a curva (AUC), foram submetidos à análise da variância (ANOVA) de 2 vias ou de 3 vias, seguida da aplicação do teste de Student–Newman-Keuls para comparações múltiplas. Na análise paramétrica de dois grupos experimentais foi aplicado o teste t de Student não pareado. Os resultados expressos como mediana foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e do teste post hoc de Dunn's para comparações múltiplas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

1.4 Resultados

1.4.1 Validação do protocolo de ECI: mudanças de peso corporal e concentrações plasmáticas de CORT em ratos *naïve* após cada evento estressor

O grupo **Estresse** apresentou um ganho de peso significativamente menor quando comparado ao grupo **Controle** (Figura 1). Esta observação valida a eficiência deste protocolo de ECI como um estressor crônico. As concentrações plasmáticas de CORT em ratos *naïve* (Figura 2) foram significativamente mais altas após alguns eventos: imobilização (eventos 1 e 7), frio (dia 3) e natação (dia 5). Um dia após o último evento imprevisível não havia diferença entre os valores de CORT para os grupos **Estresse** e **Controle**.

Figura 1 - Efeitos do ECI sobre mudanças de peso corporal (valores percentuais) em ratos *naïve* relativos ao primeiro dia do protocolo de estresse.

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (9-10 ratos/grupo aos dias 1 a 7 e 4-5 ratos/grupo no dia 8). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, versus o respectivo grupo **Controle** (teste t de Student). A figura inserida (canto superior esquerdo) representa a área sob a curva (AUC) da variação ponderal entre os dias 1 a 8 ** $P < 0,01$ versus grupo **Controle** (teste t).

Figura 2 - Efeitos do ECI sobre as concentrações plasmáticas de CORT em ratos *naïve*.

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (4-5 ratos/grupo); colunas brancas representam o grupo **Controle** e colunas pretas representam o grupo submetido ao **Estresse**. Valores de CORT foram significativamente mais altos após alguns eventos de estresse (eventos 1,3, 5 e 7). ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, versus o respectivo grupo **Controle** (teste t).

1.4.2 Efeitos do ECI sobre a evolução ponderal de ratos Lewis durante a EAE

Para avaliação dos efeitos do estresse sobre o peso corporal (Figura 3) foram utilizados somente os animais que tiveram acompanhamento durante os 24 dias de avaliação; portanto, aqueles eutanasiados para medida de CORT no dia 13, ou os animais que morreram em decorrência da doença, não foram considerados na análise estatística. ANOVA de 3 vias foi utilizada para análise dos resultados, com os fatores de interesse sendo: tratamento (inoculação com CFA ou gp-MBP), estresse (não estressado, estresse aplicado previamente e posteriormente as inoculações) e tempo (dias 0 a 24).

ANOVA revelou que os animais imunizados com gp-MBP perderam mais peso que os animais inoculados com CFA [$F(1,53)=68,55$; $P<0,001$]. Uma análise *a posteriori* mostrou que as diferenças entre os grupos aparecem a partir do 13º dia (o que coincide com o começo da manifestação dos sinais específicos da EAE) e continuaram até o final da avaliação ponderal.

ANOVA revelou uma interação entre os três fatores [$F(48, 1272)=3,59$; $P<0,001$]. Análises post hoc destas interações mostraram que o paradigma do ECI aplicado antes ou após a indução da EAE prejudicou a evolução ponderal da doença: o grupo **E-I** apresentou perda de peso significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle (grupo **I**) a partir do dia 16 até o final do experimento (dia 24); grupo **I-E** também apresentou perda de peso significativa, entres os dias 16 a 21. Não houve diferenças na perda de peso entre os grupos **E-I** e **I-E**, tanto no período de evolução como também durante a fase de recuperação dos sinais clínicos.

O paradigma do estresse também afetou a evolução ponderal dos animais inoculados com CFA: o grupo **CFA-E** apresentou significativa perda de peso a partir do 16º dia de inoculação sem posterior recuperação até o fim do experimento, quando comparado com seu grupo controle (**CFA**). O mesmo não ocorreu pra o grupo **E-CFA** que não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Sendo assim, diferenças entre os grupos **E-CFA** e **CFA-E** foram significativas durante grande parte da análise experimental (dias 7, 8, 10 a 24).

Figura 3 - Efeitos do ECI sobre o peso corporal de ratos Lewis após imunização (relativo ao dia 0).

Os valores de peso corporal estão expressos como média $\pm$ EPM (7-14 ratos/grupo). O grupo **CFA** mostrou um gradual aumento do peso corpóreo durante o experimento. Grupos **I**, **E-I** e **I-E** mostraram um padrão similar até o início dos sinais neurológicos, quando os grupos **E-I** e **I-E** começaram a apresentar perda de peso significativa comparados ao grupo **I**. Grupo **CFA-E** não apresentou ganho de peso normal quando comparado com o respectivo grupo controle (**CFA**). Não houve diferenças entre os grupos **E-CFA** e **CFA**. (ANOVA de 3 vias e teste de Student-Newman-Keuls, índices de significância não foram plotados).

1.4.3 Efeitos do ECI sobre os sinais clínicos da EAE

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que o protocolo do ECI não afetou a incidência da doença e o dia do aparecimento dos sinais neurológicos. Entretanto, enquanto o grupo **E-I** apresentou maior escore clínico máximo ($P < 0,01$ vs **I**; $P < 0,05$ vs **I-E**), a duração da manifestação da EAE foi sutilmente mais prolongada no grupo **I-E** ($P < 0,01$ versus **I**; $P < 0,05$ versus **E-I**).

A Figura 4 mostra que as curvas de evolução dos sinais neurológicos nos três grupos foram simétricas. Entretanto, a análise de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn's revelou que o grupo **E-I** apresentou escore clínico significativamente mais elevado no dia 12 ($P < 0,001$ vs **I**; $P < 0,01$ vs **I-E**) e no dia 15 da doença ($P < 0,05$ vs **I**). Já a análise do escore acumulado (calculado como AUC) mostrou uma diferença significativa no escore global para ambos os grupos estressados, **E-I** e **I-E**, com intensidade mais alta na manifestação dos sinais clínicos de EAE relativo ao grupo controle (grupo **I**), sem, contudo haver diferença entre eles ($P < 0,05$ e $P < 0,01$; ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela 2 - EAE em ratos submetidos ao protocolo do ECI

grupos	E-I (n=10)	I (n=12)	I-E (n=11)
<i>Incidência da doença</i>	100%	100%	100%
<i>Dia do início da doença^Φ</i>	12,8 ± 0,3	13,7 ± 0,3	12,9 ± 0,2
<i>Último dia da doença^Φ</i>	17,3 ± 0,1	17,9 ± 0,2	18,7 ± 0,2 ^{**} , ^{♦♦}
<i>Duração em dias</i>	5,5 ± 0,3	5,2 ± 0,2	6,6 ± 0,2 ^{**} [♦]
<i>Dia do escore clínico máximo</i>	14,8 ± 0,5	14,9 ± 0,3	14,7 ± 0,3
<i>Escore clínico máximo</i>	3,5 ± 0,3 ^{**} [#]	2,2 ± 0,3	2,7 ± 0,2
<i>Taxa de mortalidade</i>	2/10	0/12	0/11

^{**} P<0,01 vs I; [#] P<0,05 vs I-E; [♦] P<0,05 vs E-I; ^{♦♦} P<0,001 vs E-I

(média ± EPM; ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls)

^Φ - considerou-se o dia do início da doença, como o primeiro dia em que foi detectado algum sinal clínico; o último dia da doença constitui aquele em que ainda existia alguma manifestação de sinal clínico.

Figura 4 - Efeitos do ECI sobre a evolução clínica da EAE.

Resultados estão expressos como medianas (21-29 ratos/grupo até o dia 13 e 7-15 ratos/grupo do dia 14-24). Sinais clínicos da doença foram avaliados diariamente considerando uma escala de valores de 1 a 5 conforme o grau de severidade observado, como descrito em Material e Métodos. *** $P < 0,001$, versus grupo I; ## $P < 0,01$, versus grupo I-E; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, versus grupo E-I (Kruskal Wallis e teste de Dunns). O escore acumulado é mostrado no gráfico de AUC em função do tempo (Figura inserida no canto superior esquerdo). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, versus grupo I (ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls).

1.4.4 Efeitos do ECI sobre a CORT plasmática em ratos Lewis durante EAE

Os resultados das concentrações de CORT plasmática obtidos após 13 dias da inoculação com CFA ou gp-MBP foram analisados por ANOVA de duas vias, considerando como principais fatores o tratamento (inoculação com CFA ou gp-MBP) e estresse (não estressado, estresse aplicado previamente e posteriormente as inoculações), conforme mostrado na Figura 5. Os animais imunizados com gp-MBP apresentaram concentrações plasmáticas de CORT significativamente mais elevadas em relação aos animais inoculados com CFA [$F(1,48) = 20,1$; $P < 0,001$]. O estresse não exerceu influência sobre os valores de CORT [$F(2,48) = 0,32$; $P > 0,05$]. Análise da interação dos fatores imunização x estresse não mostrou diferenças significativas [$F(2,48) = 1,18$; $P > 0,05$], demonstrando que as diferenças encontradas deveram-se unicamente à imunização.

Figura 5 - Efeitos do ECI sobre as concentrações plasmáticas de CORT em ratos Lewis medidas 13 dias após a inoculação com CFA ou gp-MBP.

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM para cada grupo (n=9 ratos/grupo). *** $P < 0,001$ versus grupos inoculados com **CFA** (ANOVA de 2 vias).

1.5 Discussão

Fatores estressantes podem modular a vulnerabilidade e o curso de doenças estreitamente relacionadas com mecanismos imunológicos. Em trabalhos prévios, os efeitos do estresse na EAE foram investigados e alguns dos resultados que se apresentaram foram dicotômicos (Bukilica et al., 1991; Correa et al., 1998; Dowdell et al., 1999; Griffin et al., 1993; Kuroda, Mori e Hori, 1994; Levine et al., 1962; Owhashi, Shouzui e Arita, 1997; Whitacre, Dowdell e Griffin, 1998).

Os mecanismos pelos quais o estresse pode alterar a resposta imunológica são bastante complexos. Há uma comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imunológico, portanto a modulação mediada pelo estresse ocorre em parte, por mediadores de ambos os sistemas. Assim, citocinas, mediadores do eixo HPA e do sistema nervoso simpático devem contribuir para as variações na susceptibilidade à EAE.

Ratos Lewis apresentam uma resposta reduzida do eixo HPA a estímulos de diferentes naturezas (como físicos, psicológicos e imunológicos), comparados a outras linhagens, resultando em menor produção de corticosterona e consequentemente, alta suscetibilidade a doenças autoimunes, como a artrite e EAE (Calogero et al., 1992; Mason, MacPhee e Antoni, 1990; Sternberg et al., 1989a,b, 1992; Villas, Dronsfield e Blankenhorn, 1991). Na EAE, a inflamação do SNC ativa o eixo HPA e a elevação de glicocorticóides endógenos claramente contribui para a recuperação da doença (MacPhee, Antoni e Mason, 1989). Neste sentido, a possibilidade de uma maior elevação de glicocorticóides pelo estresse poderia suprimir a susceptibilidade à EAE em ratos Lewis. Paradoxalmente, como glicocorticóides podem exercer efeitos pró-inflamatórios (Dinkel, MacPherson e Sapolsky, 2003; MacPherson, Dinkel e Sapolsky, 2005; Munhoz et al., 2006; Wilckens e De Rijk, 1997), torna-se difícil estabelecer uma relação precisa entre estresse e o curso da EAE, particularmente quando os eventos de estresse ocorrem antes da indução da doença.

Nossos resultados demonstraram que ratos Lewis *naive* responderam ao protocolo de estresse (Figura 2), entretanto o aumento da produção de CORT foi observado somente após alguns eventos (imobilização, frio e nado forçado). Isto poderia, em princípio, sugerir que essa linhagem responde apenas a alguns tipos de desafios, sendo mais resistente a outros. Entretanto, sabe-se que o pico de

produção de CORT em ratos Lewis ocorre antes da primeira hora de exposição ao evento estressor, quando começa então a declinar, normalizando-se em duas horas de exposição (Dhabhar, McEwen e Spencer, 1996). Seria, portanto previsível que os valores de CORT medidos no grupo **Estresse** para os demais eventos de longa duração (luzes apagadas durante 2h, luzes acesas por 24h e privação de água e alimento por 12h) se mostrassem similares aos respectivos controles, uma vez que as amostras foram coletadas posteriormente. No 7º dia do protocolo de estresse (Figura 2), os valores de CORT foram menores que os medidos no final do mesmo evento aplicado no dia 1 e no oitavo dia, esses valores mostraram-se similares aos valores basais. Estes dados demonstram adaptação do eixo HPA ao paradigma de estresse aplicado. Dhabhar, McEwen e Spencer (1997) também encontraram constância nos valores de CORT plasmática em ratos Lewis após dias consecutivos de estresse de contenção. As variações nos valores de CORT do grupo **Controle** para os diferentes dias são dependentes não somente do ritmo circadiano de secreção desse hormônio como também estão sujeitas à possível adaptação às condições de manipulação, uma vez que os animais eram pesados diariamente. Entretanto, o menor ganho ponderal do grupo **Estresse** (Figura 1) valida nosso protocolo como um estressor crônico, mesmo considerando a adaptação do eixo HPA.

Após a validação do protocolo de ECI em animais *naive*, passamos a observar os efeitos do estresse em animais com EAE. Os resultados de nosso estudo demonstram que o paradigma do ECI exerceu influência na gravidade da EAE, afetando a magnitude do escore clínico global, a duração da doença, o escore clínico máximo (Tabela 2 e Figura 4) e a evolução ponderal dos animais com EAE (Figura 3).

Del Rey, Klusman e Besedovsky (1998) demonstraram que a imunização com gp-MBP resulta em aumento de CORT iniciando-se no dia 11, alcançando o máximo no dia 13 e permanecendo elevado até 19 dias após a imunização. Por esse motivo, alguns animais deste estudo foram eutanasiados 13 dias após a imunização, para verificar se o protocolo de estresse utilizado exerceria alguma influência nos valores de CORT que pudessem justificar os resultados encontrados dos efeitos modulatórios do estresse sobre a EAE. Como mostrado na Figura 5, os valores de CORT dos ratos dos três grupos experimentais que receberam CFA (**CFA**, **CFA-E** e **E-CFA**) permaneceram dentro dos valores basais. Em

contrapartida, os valores de CORT dos ratos que receberam gp-MBP (**I**, **E-I** e **I-E**) foram três vezes mais altos que os medidos nos grupos que receberam o adjuvante, coincidindo com o relatado por del Rey, Klusman e Besedovsky (1998), os quais demonstraram que a elevação de glicocorticóides observada em ratos Lewis é paralela à evolução clínica da EAE e não causada pelo uso de CFA. Nossos resultados também demonstraram que o protocolo de ECI, aplicado antes ou depois do desafio imunológico, não exerce qualquer influência sobre a CORT circulante durante a evolução da EAE, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos **E-I** ou **I-E** e o grupo imunizado e não estressado (grupo **I**). Desta forma, conclui-se que a reatividade aumentada do eixo HPA 13 dias após o desafio com gp-MBP está associada unicamente à imunização e não ao protocolo de estresse aplicado previamente.

Entretanto, o fato de não termos encontrado diferenças nos valores de CORT entre os grupos, não necessariamente exclui a participação do eixo HPA nos efeitos do estresse sobre a EAE, embora outros mecanismos possam estar envolvidos. Por exemplo, Dowdell et al. (1999) verificaram que o estresse de contenção de 12 h diárias aplicados no período noturno em camundongos com EAE, foi capaz de reduzir os sinais da doença e que este efeito supressor não ocorreu quando os animais eram submetidos a uma menor exposição diária ao estresse (1 e 6 horas). Apesar dos efeitos diferenciais do estresse sobre a evolução clínica, estes autores observaram que os valores de CORT aumentaram similarmente nos 3 grupos durante os períodos de aplicação do estresse, não sendo diferentes do grupo controle (EAE) logo após o término do protocolo. Assim a participação da CORT na supressão da EAE só foi revelada quando o efeito supressor do estresse sobre a evolução da doença foi revertido pelo tratamento dos animais com o antagonista específico de receptores de glicocorticóides (RU486); similarmente, a administração exógena de corticosterona mimetizou os efeitos supressores do estresse. Portanto, conclui-se que os valores circulantes de CORT exercem pouca importância informativa sobre a contribuição do eixo HPA na modulação da EAE, que pode ser bem evidenciada empregando-se ferramentas farmacológicas apropriadas.

O protocolo de ECI também exerceu influência sobre a evolução ponderal dos animais que receberam o adjuvante. Neste caso, apenas os animais que foram submetidos ao estresse após inoculação com CFA nas patas traseiras (grupo **CFA-E**) apresentaram sério prejuízo na evolução ponderal (Figura 3), observado após a

finalização do protocolo do estresse. O mesmo protocolo não teve igual magnitude quando aplicado antes da administração de adjuvante, tendo o grupo **E-CFA** apresentado evolução ponderal similar aquela do grupo controle (**CFA**). Apesar das diferenças de peso encontradas entre os animais estressados, os valores circulantes de CORT foram similares entre si e em relação ao grupo controle, conforme relatado acima. Similarmente, Seres et al. (2002), não encontraram relação entre as concentrações circulantes de CORT e os efeitos diferenciais do estresse sobre a artrite experimental induzida em ratos Long Evans. Nesse trabalho, o ECI, iniciado 14 dias antes da indução da artrite e extendido por mais 14 dias, potencializou o edema articular, enquanto que o estresse de restrição de alimento amenizou o mesmo parâmetro. Apesar dos efeitos diferenciais do estresse sobre a evolução da doença, os valores de CORT plasmática medidos 23 dias após a indução da artrite experimental, portanto cerca de 10 dias após a finalização do estresse, foram similares em ambos os grupos e aos animais artríticos não estressados.

Algumas das diferenças observadas quanto aos efeitos do estresse em animais que receberam CFA e os imunizados com gp-MBP devem-se ao fato de tratar-se de grupos experimentais distintos, isto é, um modelo de doença neurológica de caráter imunológico (EAE) e outro modelo de dor crônica e inflamação. Cada um destes modelos é caracterizado por um diferente curso de resposta inflamatória, e cada modelo está sob influência do estresse, levando a alterações imunológicas e neuroendócrinas específicas.

Ratos Lewis parecem constituir uma linhagem adequada para o estudo dos efeitos do estresse em doenças imunológicas. Uma vez que o protocolo do ECI foi aplicado em períodos próximos ao desafio imunológico (7 dias antes ou após a inoculação com o antígeno), pode-se sugerir que o estresse deve influenciar a reatividade de populações *naïve* de células T. Como existem muitas vias de sinalização influenciadas pelo estresse, investigações adicionais são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos permissivos do estresse nestes dois modelos diferentes de inflamação. A administração de antagonistas específicos como RU486, pode constituir ferramenta interessante para estudar a participação do eixo HPA na modulação dos efeitos do estresse nas doenças inflamatórias.

CAPÍTULO 2

ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS DE DEFESA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

2.1 Introdução

2.1.1 Relações entre sistema nervoso central e trato gastrointestinal

A comunicação entre sistema nervoso central (SNC) e trato gastrointestinal (TGI) pode ser observada em inúmeras condições fisiológicas e patológicas. Por exemplo, fatores psicossociais são capazes de alterar a função digestiva e inversamente, a dor visceral pode afetar a percepção de dor, o humor e o comportamento. Isto ocorre porque o SNC e o intestino encontram-se integrados por meio de rotas neurais, imunológicas e endócrinas. Estas vias de comunicação encontram-se amplificadas diante de perturbações da homeostasia, sejam elas causadas pelo estresse físico (como trauma, hemorragia e inflamação) ou psicológico. Os efeitos do aumento de resposta ao estresse sobre a função gastrointestinal podem incluir alteração na motilidade e permeabilidade intestinais, alterações imunológicas, hipersensibilidade visceral, ocasionando a síndrome do intestino irritável (SII) e outras disfunções intestinais. Ao lado das alterações gastrintestinais, várias comorbidades apresentando um componente central, tais como transtornos afetivos (Mayer et al., 2001) e fibromialgia (Triadafilopoulos, Simms e Goldenberg, 1991) também parecem ser engatilhados pelo estresse.

No sistema nervoso central (SNC), o sistema límbico constitui a região responsável pela homeostasia do organismo, sendo o hipotálamo importante membro desse sistema. O sistema límbico tem também um papel central na emocionalidade, que é um sistema não verbal que facilita a sobrevivência e lida com a esquivas, interação social e aprendizagem. O fator liberador de corticotrofina (CRF) liberado pelos neurônios da divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo desempenha importante papel dentro desse contexto. Por exemplo, o CRF aumenta a motilidade intestinal e exerce efeitos ansiogênicos (via receptores CRF1) e a sua hipersecreção no cérebro deve ter relevância clínica na comorbidade de ansiedade/depressão e SII (Patacchioli et al., 2001; Tache et al., 1999, 2001). O aumento da atividade do sistema noradrenérgico central, em particular do *locus ceruleus*, também tem sido implicado como um mecanismo central envolvido nos sintomas intestinais e extra-intestinais da SII (Mayer, 2000).

Uma série de outras observações sustenta as interações bidirecionais entre o SNC e o sistema imunológico do intestino. Desgranulação de mastócitos no

intestino ocorre em resposta ao estresse psicológico (Santos et al., 1998) e seus produtos liberados (tais como proteases e histamina) têm o potencial de ativar e/ou sensibilizar as fibras aferentes viscerais (Vergnolle et al., 2001). Circuitos do estresse central, do qual fazem parte o eixo HPA e respostas simpáticas e simpatoadrenais, devem ter profundas influências sobre o sistema imunológico intestinal, incluindo celularidade e balanço TH1/TH2 (Chrousos, 2000; Elenkov e Chrousos, 1999). Respostas de estresse alteradas podem ser associadas ao aumento da permeabilidade do intestino (Soderholm et al., 2002), alterando o acesso de microorganismos e antígenos ao sistema imunológico intestinal (Kiliaan et al., 1998; Saunders, Hanssen e Perdue, 1997). Alternativamente, a produção intestinal de diferentes citocinas e quimiocinas deve trazer profundas influências sobre o SNC, influenciando a expressão gênica do CRF e vasopressina (Kresse et al., 2001). Produtos de células do sistema imunológico que sinalizam o SNC via nervo vago também desempenham um papel importante na patogênese de uma complexidade de sintomas, tais como hiperalgesia, febre, anorexia e aversão ao paladar (Goehler et al., 2000; Hansen et al., 2001).

Levando-se em consideração que eventos que ocorrem dentro do SNC ou no trato gastrointestinal (TGI) não acontecem isoladamente, uma vez que ambos os sistemas interagem entre si sob condições normais e particularmente durante perturbações da homeostasia, diversos modelos animais de disfunções gastrointestinais visam investigar os aspectos periféricos e centrais decorrentes dessa interação (Mayer e Collins, 2002). Estes modelos são divididos em duas categorias, aqueles deflagrados centralmente (tais como estresse neonatal e transtorno do estresse pós-traumático) e aqueles que são iniciados especificamente no intestino (como inflamação e infecção).

Desse modo, um melhor entendimento das interações do SNC com o sistema nervoso entérico (SNE) e o sistema imunológico contribuirá para melhorar nossa compreensão não somente dos mecanismos centrais e periféricos envolvidos nas disfunções gastrointestinais, como também trarão novos conhecimentos sobre os mecanismos de defesa e excitotoxicidade centrais decorrentes de eventos provenientes da periferia, sejam eles decorrentes do intestino ou do sistema imunológico periférico propriamente dito.

2.1.2 Isquemia e reperfusão Intestinal

As lesões da isquemia e reperfusão intestinal (IRI) ocorrem de forma secundária a muitas situações encontradas na prática clínica, tais como aneurisma de aorta abdominal, sepse, trauma, enterocolite necrotizante (NEC) em neonatos, angina abdominal e gangrena aguda intestinal (Caplan e MacKendrick, 1993; Haglund e Bergqvist, 1999; Hansen, Dresner e Wait, 1998; Huang e Warner, 2001; Nowicki e Nankervis, 1994). Seqüelas comuns da IRI compreendem a síndrome da reação inflamatória sistêmica (SRIS) e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS), as quais contribuem para a alta taxa de mortalidade destes pacientes.

A interrupção do fluxo sanguíneo resultante de um processo isquêmico rapidamente prejudica os tecidos metabolicamente ativos, ocasionando a redução de reservas energéticas, acúmulo de metabólitos e eventualmente necrose. Paradoxalmente, o restabelecimento do fluxo sanguíneo ao intestino inicia uma resposta inflamatória pós-isquêmica, conhecida como lesão da reperfusão, que frequentemente excede o dano isquêmico original (Stallion et al., 2002). Assim, diversos mecanismos estariam envolvidos na produção das lesões intestinais após a isquemia e reperfusão, à semelhança de diversos outros processos isquêmicos. Dentre estes mecanismos poder-se-iam destacar as lesões causados por metabólitos de ácidos graxos livres, por metabólitos das purinas, por formação de óxido nítrico (NO) e por ação de leucócitos.

Entre os órgãos internos, o intestino é o primeiro órgão sensível à IRI (Granger, Hollwarth e Parks, 1986; Yamamoto et al., 2001) e o grau de lesão tecidual depende da duração e da intensidade da isquemia. Há várias evidências de que a mucosa do intestino é sítio de produção de citocinas (Mester et al., 1993; Meyer et al., 1995), proteínas de fase aguda (Molmenti, Ziambaras e Perlmutter, 1993; Wang et al., 1998) e hormônios (Zamir et al., 1992), que não somente influenciam o intestino, mas também contribuem para afetar a função e a integridade de órgãos distantes. A mitocôndria, organela responsável pela produção de trifosfato de adenosina (ATP) para a vitalidade celular, tem sido reconhecida como sítio inicial de anormalidade na isquemia (Jassem et al., 2002). À queda do ATP, segue-se uma extensa seqüência de eventos intra/extracelulares, tais como falência das bombas de Na^+/K^+ e acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) no citossol, liberação de glutamato, ativação de proteases, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e lipoperoxidação. A ativação de leucócitos, liberação de

mediadores inflamatórios e prejuízo na microvasculatura também constituem elementos importantes nas lesões da IRI (Carden e Granger, 2000).

2.1.3 Efeitos da IRI em órgãos distantes

A IRI resulta na ativação de leucócitos, translocação bacteriana e liberação de mediadores inflamatórios, que contribuem para o prejuízo em órgãos distantes. Por exemplo, uma das conseqüências é o desenvolvimento da SRIS que pode progredir para a MODS, que é caracterizada por progressiva deterioração da função dos pulmões, rins, fígado, coração e endotélio (Ceppa, Fuh e Bulkley, 2003). A IRI também resulta em infiltração pulmonar de neutrófilos, o que contribui para o desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA, Koksoy et al., 2001).

Contudo não existem resultados conclusivos sobre as conseqüências neurológicas da IRI. Em humanos, por exemplo, a IRI é associada a uma variedade de condições clínicas, como sepse e NEC, sendo que esta última constitui uma doença extremamente grave em crianças caracterizada pelo desenvolvimento de gangrena intestinal. A maioria das crianças que desenvolvem NEC é prematura e como tal, têm risco aumentado de desenvolver dano cerebral, quer seja de natureza hemorrágica ou isquêmica. Alguns estudos realizados em neonatos com NEC sugerem uma associação desta doença a atraso do desenvolvimento neuronal, em maior proporção ao esperado para neonatos prematuros (Sonntag et al., 2000; Tobiansky et al., 1995); no entanto, outros estudos não encontram esta associação (Mayr, Fasching e Hollwarth, 1994; Walsh, Kliegman e Hack, 1989). Também é conhecido que encefalopatia e polineuropatia ocorrem em 70% dos pacientes sépticos (Bolton, Young e Zochodne, 1993), e neste sentido, a IRI poderia agravar o dano neurológico da sepse.

2.1.4 O papel do NO e das ciclooxygenases na isquemia e reperfusão

O NO é um importante mensageiro de vários sistemas do organismo, participando, por exemplo, na regulação do tônus vascular, na defesa imunológica do hospedeiro, neurotransmissão, aprendizagem e memória, além de inúmeras funções endócrinas. Algumas disfunções vasculares estão associadas à produção prejudicada de NO. Entretanto, conforme a sua concentração e o tecido em questão, o NO (tanto diretamente como por meio de espécies derivadas) pode atuar

como um agente citotóxico, produzindo desintegração em membranas celulares, dano ao DNA e engatilhamento da morte celular programada (apoptose). Assim, diversas doenças caracterizam-se pela produção aumentada de NO, como o choque séptico, infarto cerebral, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e auto-imunes (Barreto, Correa e Muscará, 2005).

O NO é sintetizado a partir da oxidação da L-arginina (L-arg) pela enzima NO sintase (NOS). Primeiramente, a L-arg é oxidada ao intermediário L-N^G-hidroxil-arginina (NOH-L-arg) que é convertido em L-citrulina (L-cit) e NO. Ambos os passos requerem oxigênio molecular (O₂) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) como co-substratos, além de tetraidrobiopterina (BH₄), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferroprotoporfirina IX (heme) como cofatores (Marletta, 1994); (esquema 1).

Esquema 1 - Oxidação da L-arg à L-cit catalisada pela NOS
 FONTE: adaptado de Marletta, 2004

Três isoformas de NOS foram clonadas e descritas, denominadas NOS neuronal (nNOS, bNOS ou NOS-I), NOS endotelial (eNOS ou NOS-III) e NOS imunológica (iNOS ou NOS-II). nNOS e eNOS existem constitutivamente na maioria dos tecidos, sendo denominadas de isoformas constitutivas (cNOS). Como sua ativação requer a interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelas concentrações de Ca²⁺ (70 a 100 nM) estas isoformas são também designadas

dependentes de Ca^{2+} . A iNOS não está normalmente presente em condições fisiológicas, podendo ser a sua síntese induzida em macrófagos e outras células imunológicas por estímulos inflamatórios, motivo pelo qual é comumente designada por NOS induzível (iNOS). Como a atividade da iNOS requer concentrações de Ca^{2+} bem menores (30-70 nM) das necessárias para as cNOS, esta isoforma é também denominada independente de Ca^{2+} (Moncada, Palmer e Higgs, 1991). Como sua atividade não é controlada por mobilização de Ca^{2+} , a iNOS é capaz de produzir NO de forma contínua durante todo o tempo em que está expressa.

A regulação da atividade da NOS estende-se além da disponibilidade de Ca^{2+} /calmodulina, sendo mais complexa e envolvendo inúmeros fatores, tais como concentração de substratos e cofatores, estados de fosforilação e presença de inibidores endógenos. Por exemplo, em baixas concentrações de L-arg e/ou BH₄, a NOS é incapaz de transferir eficientemente elétrons do NADPH para L-arg, que são transferidos para o O₂, conseqüentemente gerando O₂^{•-} (Cosentino e Luscher, 1998). Interessantemente, as células também são capazes de sintetizar diversos análogos metilados da arginina, tais como, N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) e dimetilarginina assimétrica (ADMA), que agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (Moncada, Palmer e Higgs, 1991), resultando em ponto adicional de controle da produção de NO.

Similarmente, a expressão gênica da NOS pode ser regulada por vários mecanismos. Por exemplo, *shear stress* aumenta a expressão da eNOS em células endoteliais e diversas citocinas, tais como TNF- α , promovem a expressão da iNOS. Portanto, a regulação da produção de NO é complexa, envolvendo tanto respostas imediatas, tais como aquelas que se realizam quando a L-arg não está disponível, como respostas adaptativas em longo prazo, resultando em alterações na expressão gênica da NOS (Postovit et al., 2005).

A nNOS é a principal isoforma expressa no SNC, onde apresenta distribuição precisa em populações discretas de neurônios, tendo atividade mais alta no cerebelo (Bredt et al., 1991). No SNC, a nNOS é também encontrada em astrócitos e vasos sanguíneos. A respeito do papel do NO em várias funções fisiológicas dentro do SNC, tais como regulação da liberação de neurotransmissores em muitas áreas do cérebro, modulação da nocicepção, controle do sono, termorregulação, potenciação e depressão de longo prazo no hipocampo e cerebelo, respectivamente, a sua liberação excessiva pelos neurônios tem

implicação fisiopatológica em muitas doenças neurodegenerativas e na isquemia cerebral, por meio da formação de RNS (Calabrese et al., 2007).

No SNC, a eNOS é expressa pelas células endoteliais cerebrais, onde regula o fluxo sanguíneo cerebral, por uma pequena população de neurônios piramidais no hipocampo e células granulosas no giro dentado (Calabrese et al., 2007). Com relação à iNOS, seu grau de expressão no SNC é baixo, entretanto, há evidência crescente do seu envolvimento no envelhecimento do SNC e em processos neurodegenerativos (Vernet et al., 1998; Weldon, Maggio e Mantyh, 1997; Calabrese et al., 2007).

A iNOS é induzida em muitas células por componentes bacterianos (tais como o lipopolissacarídeo - LPS da parede de bactérias Gram-negativas) e citocinas. Em macrófagos, a transcrição da iNOS por LPS requer a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), enquanto que sua ativação pelo IFN γ requer o fator de transcrição *interferon regulatory factor-1* (IRF-1). A hipóxia também ativa a transcrição de iNOS e envolve o fator *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1, Iadecola, 1997). A nNOS pode ser regulada por mecanismos pós-transcricionais, por meio da alteração na estabilidade do RNAm, ou pós-traducionais, por fosforilação da enzima. Estas modificações poderiam fornecer um poderoso mecanismo de diminuição da atividade da NOS e importante estratégia de neuroproteção, desde que a indução desta isoforma no SNC está relacionada à neurotoxicidade (Dawson et al., 1993).

O papel do NO e de inúmeros mediadores inflamatórios tem sido amplamente estudado na isquemia e reperfusão cerebral (IRC). Estudos demonstraram que os danos neuronais conseqüentes de uma isquemia transitória envolvem diversos mecanismos que ocorrem simultaneamente, tais como excitotoxicidade associada à superestimulação dos receptores NMDA com aumento de Ca²⁺ intracelular (Choi, 1995), expressão local de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e infiltração de neutrófilos (Kim et al., 1995; Pozzili et al., 1985), produção de ROS e RNS (Chan, 1996), aumento de expressão das enzimas como a NOS (Osuka et al., 2001) e COX-2 (Collaco-Moraes et al., 1996; Nogawa et al., 1997; 1998; Iadecola et al., 2001).

Sabe-se que alguns minutos após a indução da isquemia cerebral, genes de resposta imediata são ativados, tais como c-fos, c-jun e zif268. Posteriormente, inicia-se a ativação de genes que codificam proteínas de fase aguda, como

proteínas de choque térmico de 70 e 72 kDa (HSP70 e HSP72, respectivamente). Uma terceira onda de expressão gênica compreende a ativação de muitos mediadores inflamatórios, tais como, citocinas inflamatórias [fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-1 β (IL1 β), IL6] e moléculas de adesão [como molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), molécula de adesão endotelial tipo 1 (ELAM-1), P-selectina] e outros inúmeros genes relacionados à resposta inflamatória, tais como NOS e COX-2. Em estágios tardios da isquemia cerebral, além do envolvimento da resposta inflamatória, a expressão gênica de produtos envolvidos na morte celular programada, tais como p53, contribuem para a progressão das lesões (Iadecola, 1997).

A isquemia cerebral exerce profundos efeitos sobre a biossíntese do NO, influenciando a expressão gênica e protéica de NOS e a consequente síntese de NO. Após oclusão da artéria cerebral média (MCA), a ativação da via glutamatérgica resulta em aumento da concentração de NO proveniente da nNOS na área isquêmica (níveis de mM), dentro dos 20 min após a isquemia, sendo que posteriormente começa a declinar, provavelmente porque a concentração de substrato torna-se um fator limitante para a síntese de NO (Malinski et al., 1993). Tal aumento na atividade da NOS acompanha-se da transcrição gênica de nNOS (Zhang et al., 1994). A expressão protéica e atividade da eNOS também aumentam no tecido isquêmico, cujo perfil temporal acompanha aquele da nNOS (Nagafuji, Sugiyama e Matsui, 1994; Zhang et al., 1993). A isquemia cerebral produz também aumento na transcrição do RNAm para iNOS, acompanhado de aumento da expressão protéica e atividade enzimática. No entanto, este aumento ocorre mais tardiamente em relação ao aumento da eNOS e nNOS, iniciando-se em 6-12 h após oclusão da MCA (Iadecola et al, 1995; 1996) e sendo provavelmente engatilhado por citocinas pró-inflamatórias. Estudos experimentais empregando inibidores seletivos de nNOS (Nagafuji et al., 1995; Yoshida et al., 1994; Zhang et al., 1996) e iNOS (Iadecola et al., 1996; Iadecola, Zhang e Xu, 1995; Zhang et al, 1996) têm demonstrado proteção no tecido infartado, sugerindo que atividade de ambas as enzimas é prejudicial ao cérebro isquêmico, enquanto que a atividade de eNOS deveria ser protetora, pelo menos nos estágios iniciais.

Portanto, nas fases iniciais de IRC, o aumento da produção de NO decorre da super-expressão de nNOS e eNOS; sendo que as ações vasodilatadora, anti-adesão

leucocitária e anti-agregante plaquetária benéficas do NO derivado da eNOS tentariam sobrepujar as ações neurotóxicas do NO de origem neuronal. Em fases tardias, a iNOS é a grande responsável pela síntese de NO, contribuindo para a progressão do prejuízo decorrente da nNOS.

Juntamente com a iNOS, a expressão de COX-2 também tem sido considerada importante determinante de citotoxicidade associada à inflamação. Esta situação é observada em várias doenças neurológicas, incluindo Alzheimer, esclerose múltipla e acidentes vasculares cerebrais.

COX é a enzima que catalisa os dois primeiros passos da síntese de prostaglandinas (PG) e tromboxano A_2 (TXA₂) a partir do ácido araquidônico (AA). Estes são a oxidação do AA para PGG₂ e sua subsequente redução a PGH₂. A PGH₂ é então transformada por diversas enzimas e mecanismos não enzimáticos em diversos prostanóides, PGE₂, PGF₂, PGD₂, PGI₂ e TXA₂ (Vane, Bakhle e Botting, 1998).

A COX é encontrada como duas isoformas principais – COX-1 e COX-2. A primeira ocorre na maioria das células como enzima constitutiva; acredita-se que os prostanóides por ela produzidos estejam envolvidos na homeostasia normal. A COX-1 é distribuída em neurônios por todo o cérebro, sendo mais prevalente no prosencéfalo. A COX-2 é induzida em uma variedade de tipos celulares mediante estímulo inflamatório. É também expressa constitutivamente em poucos órgãos, dentre os quais o SNC, onde sua distribuição ocorre especialmente no córtex, hipotálamo, hipocampo e medula espinhal (Breder, Dewit e Kraig, 1995; Breder e Saper, 1996). Embora a expressão de COX-2 no SNC também esteja aumentada após LPS, sua ativação transcricional não ocorre em neurônios, mas no endotélio dos vasos sanguíneos cranianos e na micróglia (Cao et al., 1996; Elmquist et al., 1997). Portanto, a PGE₂ envolvida na resposta febril deriva da COX-2 induzida em células não neuronais, provavelmente de células endoteliais dos vasos sanguíneos perfundindo o hipotálamo.

O aumento na expressão gênica de COX-2, mas não de COX-1, tem sido observado em neurônios que circundam a área isquêmica de animais submetidos a IRC, iniciando-se entre 3 a 6h após a reperusão, sendo máximo entre 12 a 24h, e retornando ao basal entre 48 e 96h (Nogawa et al., 1997, 1998). A COX-2 tem localização e curso temporal semelhantes à iNOS e ambas contribuem para o prejuízo tardio da IRC (Nogawa et al., 1998). Os mecanismos moleculares

envolvidos no aumento da expressão de COX-2 que ocorrem no SNC tardiamente incluem interações com elementos regulatórios como o NF- κ B (Sirois e Richards, 1993). Entretanto, o achado que iNOS e COX-2 sejam co-localizadas e co-induzidas após IRC sugerem também a ativação da COX-2 pelo NO, uma vez que inibidores da iNOS reduziram a produção de PGE₂ pela COX-2 na área do infarto. Portanto, a ativação da COX-2 poderia representar outro mecanismo de citotoxicidade mediada pelo NO (Nogawa et al., 1998)

Glutamato e NO têm ampla distribuição no SNC, incluindo o SNE, a rede neural innervando o TGI. Igualmente, existem evidências da participação do sistema glutamatérgico local e sua interação com o NO na isquemia e reperfusão mesentérica. Por exemplo, a reperfusão por 24 horas do intestino isquêmico parece induzir liberação local de glutamato e a conseqüente ativação dos receptores subtipo NMDA, levando ao aumento da produção de NO (via nNOS) e alterações adaptativas em transmissores entéricos (NO, substância P e peptídeo intestinal vasoativo), possivelmente contribuindo para a redução da motilidade intestinal (Calcina et al., 2005). Intensa produção entérica de NO pela iNOS, via ativação do NF- κ B, também contribui para as lesões decorrentes da IRI (Hassoun et al., 2002).

Embora existam muitos estudos sobre os efeitos da IRI em vários órgãos periféricos, suas conseqüências sobre o SNC necessitam ser investigadas, uma vez que os trabalhos até agora publicados são escassos e pouco elucidativos. Por exemplo, o trabalho de Hall et al. (2005) mostrou que a isquemia e reperfusão mesentérica não resultou em alterações histológicas ou bioquímicas em cérebro de ratos após reperfusão de 2 horas, pelo menos no que se refere aos níveis de N-acetil-aspartato (marcador de lesão tecidual) ou de S100 β sérica (proteína de ligação de Ca²⁺ marcadora de lesão pelos astrócitos). Entretanto, Olanders et al. (2002) encontraram significativo aumento na expressão de ICAM-1 no cérebro de ratos submetidos à IRI; porém, não estabeleceram se este aumento estaria relacionado ao recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente ao prejuízo neuronal.

Assim, o estudo das alterações sobre o SNC causadas pela IRI, relacionadas à ocorrência de estresse oxidativo, em particular aos mecanismos envolvendo as isoformas de NOS e COX, devem trazer novas contribuições para compreensão dos processos inflamatórios no SNC em resposta a IRI, considerando a relevância

clínica deste fenômeno em pacientes com alto risco de comprometimento neurológico, como na sepse e provavelmente na NEC em recém-nascidos.

2.1.5 Arginase e regulação de NO

O aminoácido L-arg participa de vias metabólicas importantes no organismo. É utilizado para a síntese de creatina e de outras proteínas e sob a ação da arginase é metabolizado a ornitina e uréia. De acordo com a maquinaria enzimática local, a ornitina pode ser metabolizada a poliaminas, glutamato ou L-cit. A L-arg também pode ser metabolizada pela NOS para produzir L-cit e NO (Braissant et al., 1999); (esquema 2). Como tanto a arginase quanto a NOS utilizam a L-arg como substrato comum, tem-se sugerido que a arginase poderia inibir a produção de NO por competir com a NOS pelo substrato (Mori e Gotoh, 2004). Outras duas vias de metabolismo da L-arg envolvem a sua descarboxilação (gerando a agmatina) e a N_g-metilação. Estas duas rotas também parecem ser importantes no controle da atividade da NOS inibindo a síntese de NO por competição com a L-arg pelo sítio de ligação à enzima ou com o sistema transportador y⁺ na membrana plasmática das células (Wiesinger, 2001).

No SNC não há síntese *de novo* de L-arg, que é obtida por proteólise ou através dos sistemas de transporte específicos que captam o aminoácido do sangue ou transferem-no de uma célula a outra. Esses carreadores fazem parte de uma família de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT) denominados de sistema y⁺. A L-arg também pode ser formada a partir da L-cit, pela ação da argininosuccinato sintetase (AS) e argininosuccinato liase (AL), integrantes do ciclo da citrulina-NO (Braissant et al., 1999); (esquema 2).

Esquema 2 - Ciclo Citrulina-NO, captação da arginina e metabolismo. AI+II: arginase I e II, AL: argininosuccinato liase, Arg: arginina, AS: argininosuccinato sintetase, ASA: ácido argininosuccínico, Asp: aspartato, CAT: transportador de aminoácido catiônico, Cit: citrulina, Fum: fumarato, NO: óxido nítrico, NOS: óxido nítrico sintase, Orn: ornitina
 FONTE: Braissant et al., 1999

Poliaminas atuam como reguladores bivalentes da função celular, podendo promover tanto o crescimento como a morte celular, dependendo dos sinais ambientais (Wallace, Fraser e Hughes, 2003); o NO também atua como molécula de sinalização e agente citotóxico. Assim, a atividade da arginase, que participa tanto da síntese de poliaminas como da regulação da síntese de NO, merece consideração na IRI.

Duas isoformas de arginase foram descritas, sendo codificadas por diferentes genes e apresentando padrões distintos de distribuição tecidual e subcelular. A arginase tipo I (AI) ou hepática é altamente expressa no fígado como uma enzima citossólica, sendo importante componente do ciclo da uréia. Como sua expressão no SNC é difusa, a atividade da arginase no cérebro parece depender predominantemente da arginase mitocondrial, ou tipo II (Mori e Gotoh, 2004).

iNOS, AI e AII são co-induzidas em diferentes tipos celulares estimulados com LPS. O papel da indução da AI e da AII para limitar a produção de NO

proveniente de iNOS parece claro e mais fácil de compreender, uma vez que esta isoforma utiliza grandes quantidades de substrato para produzir NO. A regulação da atividade da nNOS e eNOS pela arginase pareceria, a princípio, um tanto improvável, já que ambas isoformas constitutivas de NOS requerem menor concentração de substrato para gerar NO, de tal modo que em situações fisiológicas estariam funcionando sob condições de saturação do mesmo. No entanto, o efeito regulatório das arginases sobre a produção de NO proveniente das isoformas constitutivas de NOS nas situações em que estas enzimas estão induzidas merecem ser investigados.

Por exemplo, a atividade da arginase está aumentada na sepse e parece contribuir para limitar a produção de NO pela eNOS (Luiking et al., 2004). Resultados similares foram observados por Li et al. (2001), que verificaram que a super-expressão de All transgênica inibiu a produção de NO pela eNOS em células endoteliais da veia umbilical humana.

Como o NO está envolvido tanto em processos fisiológicos como patológicos no SNC, a regulação de sua produção pela arginase é de grande interesse, embora pouco investigada. Enquanto o RNAm para nNOS é restrito a uma sub-população de neurônios, o RNAm para All encontra-se amplamente presente em células gliais e neurônios, incluindo aqueles positivos para nNOS (Braissant et al., 1999). Portanto, em neurônios expressando nNOS e All, esta poderia regular a produção de NO dependente de nNOS. No entanto, Que et al. (2001), transfectando células 293nNOS (que super-expressam nNOS) com plasmídios Al de rato, detectaram uma diminuição da produção de NO; a All não foi efetiva em regular esta produção.

Uma vez que o metabolismo da arginase parece participar da regulação de moléculas envolvidas na sinalização e morte celular, como NO, glutamato e poliaminas, o papel desta enzima no SNC em situações de estresse oxidativo como na IRI merece ser mais bem explorado.

2.1.6 PIN e modulação da nNOS

A proteína inibidora da nNOS (PIN), identificada por Jaffrey e Snyder (1996), tem peso molecular de 10kD, contém 89 resíduos de aminoácidos e encontra-se em diversas regiões do cérebro, sendo sua expressão mais alta no córtex, mesencéfalo, hipocampo e medula e menor no cerebelo (Greenwood et al., 1997). Interage especificamente com a porção N-terminal da nNOS, inibindo a dimerização

necessária para a atividade catalítica (Jaffrey e Snyder, 1996). A principal implicação deste achado é que a produção de NO nas células neuronais poderia ser determinada não somente pela disponibilidade dos fatores que ativam a enzima, tais como Ca^{2+} , L-arg e BH_4 , mas também pela presença de inibidores endógenos, tais como a PIN. De fato, sua concentração mais alta no córtex, mesencéfalo, hipocampo e medula poderiam explicar a menor atividade da NOS nessas regiões, comparadas com o cerebelo, que concentra maior atividade e expressão de nNOS (Bredt et al., 1991).

Como a nNOS está envolvida em diversas funções fisiológicas dentro do SNC e a excessiva liberação de NO pelos neurônios tem implicação fisiopatológica em muitas doenças neurodegenerativas e na isquemia cerebral, os estudos da participação da PIN nos diversos processos biológicos e fenômenos que envolvam a nNOS, como na isquemia e reperfusão, reservam futura investigação.

2.1.7 Peroxidação lipídica e 3-nitrotirosina como biomarcadores do estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais o "desafio" por espécies reativas resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Augusto, 2006).

Espécies reativas ocorrem naturalmente no organismo, como um subproduto do metabolismo. Desempenham papéis diversos, podendo participar de processos de sinalização e colaborar na destruição de invasores patogênicos. Entretanto, se não forem eliminados em excesso (e/ou inapropriadamente antagonizados), podem causar lesão ou mesmo morte celular no hospedeiro (Augusto, 2006). Essas espécies oxidam proteínas, ácidos nucleicos, açúcares e lipídeos e danificam as membranas celulares. As alterações oxidativas nas biomoléculas podem conduzir a mudanças nas funções biológicas e, às vezes, provocar morte celular. Entretanto, como a maioria das espécies reativas tem vida extremamente curta, a identificação de seus diversos produtos por técnicas laboratoriais, como a peroxidação lipídica (lipoperoxidação) e a nitração de proteínas, constitui recurso importante que permite inferir indiretamente a participação destas espécies nos fenômenos de sinalização e dano celular.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação e tendo como subproduto o malondialdeído (MDA). O MDA também pode ser gerado durante o metabolismo de eicosanóides (Bose, Sutherland e Pinsky, 1989).

A lipoperoxidação inicia-se com o sequestro do hidrogênio do grupo metileno do ácido graxo da membrana celular. O radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora mais importante da lipoperoxidação.

O radical hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$), que representa a forma protonada do $\text{O}_2^{\bullet-}$, também é bastante reativo e pode retirar $\text{H}^\bullet$ de ácidos graxos como ácido linolênico, ácido linoléico e ácido araquidônico.

O esquema 3 representa a seqüência de reações (iniciação, propagação e terminação) envolvidas na peroxidação lipídica e a formação do MDA, como subproduto da reação:

Esquema 3 - O processo de peroxidação lipídica. Na fase de iniciação, um radical reativo como o radical $\text{OH}^\bullet$ remove hidrogênio do ácido graxo insaturado do lipídio (LH) produzindo um radical de lipídio ($\text{L}^\bullet$). Este reage com o O_2 , formando o radical peroxila ($\text{LOO}^\bullet$), o qual atrai hidrogênio de outro lipídio. Na fase de propagação, forma-se o hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outro $\text{L}^\bullet$ que reage com o O_2 , e assim por diante. Depois, na terminação, os dois radicais se combinam e formam um não radical. O LOOH pode sofrer outras reações, a maioria degradativa, que produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares. Esses produtos são utilizados para monitorar os processos de peroxidação lipídica em condições fisiológicas e patológicas.

FONTE: Augusto, 2006.

A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) constitui uma das estratégias para identificar a ocorrência da peroxidação lipídica. O resultado desta reação é um composto de cor rosa que pode ser detectado espectrofotometricamente medindo a sua absorção a 535 nm .

Esquema 4 - Formação de produto de reação entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA).

FONTE: Halliwell e Gutteridge, 1999

A nitração de resíduos de tirosina em proteínas, particularmente a 3-nitrotirosina (3-NT), constitui outro importante biomarcador do estresse oxidativo. O ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), produto da reação entre NO e $O_2^{\bullet-}$, é um agente oxidante e nitrante que é capaz de atravessar membranas, mas que não reage diretamente com a tirosina. A reação ocorre mediante a formação de radicais secundários [$OH^{\bullet}$, dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$) e íon carbonato ($CO_3^{\bullet-}$)] que reagem com a tirosina produzindo o radical tirosila que combina-se com NO_2 para produzir 3-NT. Resíduos de NT em proteínas também podem ser produzidos mediante sistemas enzimáticos, principalmente a mieloperoxidase (MPO), abundante em neutrófilos. As peroxidases oxidam o íon nitrito a $NO_2^{\bullet}$, e resíduos de tirosina ao radical tirosila. A recombinação desses radicais produz a 3-NT (esquema 5). Portanto, a determinação enzimática de MPO constitui não somente uma estimativa da migração de polimorfonucleares (PMN), mas quando está associada ao aumento da formação de 3-NT pode indicar que a nitração é proveniente da atividade desta enzima.

Assim, a identificação dos produtos de oxidação e nitração em fluidos e tecidos biológicos, como o MDA e 3-NT, constituem importantes biomarcadores do

estresse oxidativo que têm contribuído para elucidar a participação das espécies reativas nos fenômenos fisiológicos e patológicos. Deste modo, desde que a IRI está associada à geração de ROS/RNS e dano oxidativo em diversos tecidos, o conteúdo de TBARs e 3-NT nas estruturas encefálicas de ratos submetidos a este modelo experimental constitui ferramenta importante para estabelecer uma participação das espécies reativas nos fenômenos envolvidos na interação entre TGI e SNC.

Esquema 5 - Mecanismos para a produção de proteínas nitradas (P-TyrNO₂). Os mecanismos mais eficientes parecem ser os que produzem radicais tirosila de proteínas (P-Tyr^{*}) em paralelo com NO_2^* , como peroxinitrito/dióxido de carbono e a atividade peroxidásica de hemoproteínas.
FONTE: Augusto, 2006

2.1.8 O papel das superóxido dismutases no estresse oxidativo

Como as espécies reativas são continuamente formadas em pequenas quantidades nos organismos vivos, pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos antioxidantes para mitigar seus efeitos agressores. Uma dessas defesas é a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 , na presença de H^+ :

A enzima SOD é amplamente distribuída em organismos aeróbios. Até o momento foram identificadas três isoformas, todas capazes de eliminar eficientemente o $O_2^{\bullet -}$, mas localizadas em diferentes compartimentos celulares e apresentando grupos prostéticos distintos. A isoforma contendo zinco e cobre (SOD1 ou Cu,Zn-SOD) consiste de um dímero contendo 153 aminoácidos e é localizada no citossol das células, onde sua concentração é estimada ser da ordem de 10 μM (Rae et al., 1999). Já a SOD contendo manganês (Mn-SOD ou SOD2) é uma isoenzima de 24 kDa localizada na mitocôndria, enquanto que a SOD extracelular contendo zinco e cobre no grupo prostético (EC-SOD ou SOD3), localiza-se no espaço extracelular (Maier e Chan, 2002).

A manipulação genética de animais para a expressão de SODs tem trazido importantes contribuições para o entendimento da sua importância como molécula protetora do hospedeiro durante o estresse oxidativo. Por exemplo, camundongos transgênicos desprovidos de SOD1 não mostram grandes alterações fenotípicas, mas são mais sensíveis a oxidantes. Já os camundongos privados de SOD2 nascem menos desenvolvidos que os animais normais, apresentam anormalidades, principalmente no coração e, em menor extensão, no fígado e músculo esquelético e morrem cerca de 10 dias após o nascimento (Augusto, 2006).

SOD1 e SOD2 estão diferentemente distribuídas no compartimento neuronal e glial, sendo sua imunoreatividade baixa sob condições fisiológicas. SOD1 é localizada principalmente em astrócitos, mas também é detectada em neurônios; o contrário ocorre com a SOD2 que é predominantemente neuronal (Maier e Chan, 2002).

$$2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{(catalase)}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GHS}_{\text{glutathiona}} \xrightarrow{\text{(glutathiona peroxidase)}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}_{\text{glutathiona oxidada}}$$

Além do sistema antioxidante enzimático, a proteção antioxidante pode ser não enzimática e inclui, principalmente, as vitaminas E, C e A, glutathiona reduzida (GHS), ubiquinona, ácido úrico, L-cisteína, fenilalanina e glicose.

Trabalhos apontam que fígado e baço, órgãos constituintes do sistema monocítico fagocitário (SMF), desempenham importante papel na propagação das lesões decorrentes da IRI em órgãos distantes; tanto a inibição das células de Kupffer por meio da administração de cloreto de gadolínio (Tullis, Brown e Gewertz, 1996) e esplenectomia (Savas et.al., 2003) reduziram significativamente os níveis de citocinas, o recrutamento de PMNs e a formação de espécies reativas, amenizando a lesão pulmonar aguda decorrente da IRI experimental.

Durante a IRI, a ativação das células de Kupffer pelo contato com o reperfusato intestinal no fígado, resulta na superprodução de citocinas que contribuem para a propagação dos efeitos deletérios iniciados no intestino, como a SRIS. Macrófagos/monócitos esplênicos são outra parte importante do SMF que também é ativada, produzindo resposta semelhante. Dentre as citocinas produzidas pelo SMF, o fator de necrose tumoral (TNF) é considerado o disparador primário da produção de eicosanóides, espécies reativas, moléculas de adesão e fator de ativação de plaquetas. Interleucina-6 (IL6) também contribui para o desenvolvimento da SRIS, principalmente via ativação de PMNs e aumento na expressão de moléculas de adesão (Grotz et al., 1999; Towfigh et al., 2000).

Uma vez que tanto a hipóxia quanto a reperusão intestinal podem ocasionar dano oxidativo, é necessário conhecer a contribuição de cada uma dessas situações na ativação do SMF no baço sob condições de IRI. Tal investigação é importante quando consideramos que muitas manobras cirúrgicas também induzem a isquemia com posterior reperusão, então o tempo de exposição a cada fenômeno é fator relevante que merece atenção. Assim, o estudo da transcrição gênica de enzimas induzidas por macrófagos ativados no baço, como iNOS e COX-2, tanto durante a isquemia quanto durante a reperusão constituem importantes marcadores para avaliar a importância de cada fenômeno na amplificação dos efeitos deletérios iniciados no intestino.

2.2 Objetivos

O objetivo do trabalho foi estudar a influência da IRI sobre o estresse oxidativo e os mecanismos de defesa autoregulatórios no SNC, avaliando, após duas horas de reperfusão, diversos componentes que participam deste fenômeno, tais como as vias L-arginina-NO e ciclooxigenases, assim como marcadores de estresse oxidativo (lipoperoxidação, nitração de proteínas em resíduos de tirosina), enzimas envolvidas em mecanismos de controle redox (superóxido dismutases) e recrutamento de leucócitos (mieloperoxidase).

O período de 45 min de isquemia mesentérica seguido de 2 horas de reperfusão foi escolhido, pois produz uma resposta inflamatória sistêmica associada com grave lesão pulmonar, alterações histológicas transitórias no intestino e baixa mortalidade em ratos.

A contribuição de cada fenômeno isolado (isquemia ou reperfusão) para a ativação do SMF do baço foi também estudada, por meio da expressão gênica das isoformas de COX e NOS neste órgão, uma vez que o baço constitui importante amplificador dos danos oxidativos iniciados no intestino para sítios distantes.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (250 - 300 g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo claro-escuro de 12 horas, seguindo as regras adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP.

2.3.2 Indução da isquemia e reperfusão Intestinal

O modelo de IRI empregado segue o procedimento desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima (Depto. De Farmacologia, ICB/USP); (Coelho et al., 2007).

Os animais foram anestesiados por via intra-peritoneal (i.p) com uma mistura de cetamina:xilazina (80:16 mg/Kg; König, Avellaneda, Argentina) e submetidos à laparotomia mediana, em condições assépticas. A artéria mesentérica superior foi então dissecada suavemente e a seguir a isquemia intestinal foi induzida pela oclusão da mesma por 45 min com a ajuda de uma pinça (“clamp”) microvascular (Vascu-statt nº 1001-531, Scalan International, Minn. 55107, EUA). Neste período o abdômen foi apenas fechado sem sutura, mas coberto com um filme plástico, com o intuito de evitar perda de calor e de fluidos. Após este período, o “clamp” foi retirado e o abdômen suturado, seguindo-se a reperfusão intestinal por 2 horas (grupo IRI). O grupo controle consistiu de animais submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sendo que a artéria foi apenas dissecada, sem sofrer qualquer oclusão (grupo Sham ou SH). Os animais foram mortos por decapitação e amostras de baço e de algumas estruturas do tecido encefálico (córtex, hipotálamo, hipocampo e cerebelo) foram coletadas e imediatamente congeladas a -80°C para posteriores análises bioquímicas (descritas a seguir).

Amostras de baço foram também retiradas de alguns animais logo após o período de isquemia de 45 minutos (grupo I), para verificar a reação do SMF deste órgão, nos dois períodos (isquemia e isquemia seguida de reperfusão).

2.3.3 Medida da atividade de óxido nítrico sintase (NOS)

No final do protocolo de isquemia e reperfusão, a atividade de NOS presente nas diversas estruturas encefálicas (córtex frontal, hipotálamo, hipocampo e cerebelo) foi estimada pelo método de conversão da [^3H]L-arg para [^3H]L-cit (Hiki et al., 1992).

De forma resumida, os tecidos foram pesados e homogeneizados a 1:5 (cerebelo) e 1:10 (demais estruturas) no tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 e contendo 1 mM de PMSF, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, inibidor de tripsina 10 $\mu\text{g/ml}$ e 1 mM de L-cit) e passados em resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8) para eliminação da L-arg endógena. Para avaliação da atividade enzimática total (tubo AT), um primeiro tubo recebeu uma alíquota do eluato (50 μl) que foi incubado a 37 graus durante 10 minutos na presença de CaCl_2 10mM, e dos cofatores (FAD 100 μM , NADPH 100 μM , BH_4 100 μM , CaM 3 U/ml) e 1 μM L-arg contendo o marcador [2,3,4,5- ^3H] L-arginina mono hidrocloreto (Arg^*), que corresponde à 100000 cpm (Amersham Biosciences, EUA), juntamente com tampão, num volume final de 100 μl . O segundo tubo (tubo EGTA) recebeu outra alíquota de amostra no qual foi acrescentado, juntamente com os cofatores, tampão e a arginina marcada, o EGTA 1 mM, porém neste tubo foi suprimido o CaCl_2 (para avaliação da atividade enzimática independente de Ca^{2+}). Um terceiro tubo (tubo LN) recebeu os mesmos reagentes do primeiro tubo, acrescido de L-NAME 1 mM (inibidor não seletivo de NOS), e sua atividade corresponde à produção de citrulina via “não NOS”. Assim, a atividade total da NOS corrigida corresponde à atividade do primeiro tubo (AT) subtraído do valor da atividade do terceiro tubo (LN). Um quarto tubo (tubo EGTA+LN) recebeu os mesmos reagentes do segundo tubo, acrescido também de L-NAME. Assim, a atividade de NOS independente de Ca^{2+} corresponde ao valor obtido do segundo tubo subtraído do valor encontrado no quarto tubo. O valor da atividade de NOS dependente de Ca^{2+} corresponde ao valor subtraído do valor da atividade total pelo valor da NOS independente de Ca^{2+} (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição da seqüência de tubos utilizados para determinação da atividade de NOS

<i>Tubo</i>	<i>Pipetar:</i>							
	(Ca ²⁺)	(EGTA)	(TRIS)	(LNAME)	FAD	(NADPH, CaM, BH ₄)	(Arg*)	Amostra (Eluato)
AT	10 µl		10 µl		10 µl	10 µl	10 µl	50 µl
EGTA		10 µl	10 µl		10 µl	10 µl	10 µl	50 µl
LN	10 µl			10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	50 µl
EGTA+LN			10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	50 µl
CT	10 µl		10 µl		10 µl	10 µl	10 µl ^{##}	50 µl
<i>Branco</i>		10 µl	10 µl		10 µl	10 µl	10 µl	50 µl [#]

[#]Para os tubos brancos, o homogenato é pipetado após a adição do tampão que interrompe a reação.

^{##}Para os tubos de contas totais (CT), a Arg* é pipetada diretamente no frasco de cintilação.

Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de tampão HEPES pH 5,4 contendo EGTA e EDTA. Os homogenatos foram aplicados novamente em colunas contendo resina Dowex AG 50X-8, lavados em 1 mL de tampão aplicado sobre a resina e recolhidos em frascos de cintilação. Após a adição de 10 mL do líquido de cintilação, a radioatividade foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as leituras corrigidas (em contagens por minuto, cpm) são relacionadas à leitura da [2,3,4,5-³H]L-arg mono hidrocloreto adicionada diretamente no frasco de cintilação (sem passagem através da coluna de troca iônica) e correspondem a:

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times (\text{cpm}_{\text{amostra}} - \text{cpm}_{\text{Branco}}) / \text{cpm}_{\text{CT}} / 10$$

onde 1000 representa a quantidade de L-arg adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 10 foi o tempo de incubação (em min).

O conteúdo de proteínas foi determinado por colorimetria, empregando-se o reagente Coomassie brilliant blue (Bradford, 1976) e a atividade da NOS foi expressa como pmols de L-cit produzidos por minuto e por mg de proteína.

2.3.4 Avaliação da expressão protéica por *Western Blot*

No final do protocolo de IRI, a expressão protéica das isoformas de NOS (neuronal e endotelial) e de SOD (SOD1 e SOD2) juntamente com o conteúdo das

proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT), foi avaliada pela técnica de *Western blot*.

Os tecidos foram pesados, homogeneizados em 10 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF, leupeptina 10 µg/ml, inibidor de tripsina 10 µg/ml e 1 mM de L-cit) e centrifugados durante 5 minutos a 1000 *g* a 4 °C. A concentração de proteínas nos sobrenadantes foi determinada pelo método de Bradford a fim de ajustar todas as amostras para a mesma concentração protéica, diluindo os sobrenadantes com Tris-HCl 50mM. Finalmente, 130 µl dos sobrenadantes foram diluídos com 30 µL de tampão de Laemmli (0,0625M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol). Após centrifugação a 10000 *g* (1 min), as proteínas das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (ver Tabela 2) contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (SDS – PAGE) conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). A composição do tampão usado na corrida eletroforética é a seguinte: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS pH 8,3. Para a separação eletroforética das proteínas, foi aplicada uma intensidade de corrente constante (35 mA), resultando em valores de voltagem que variaram entre 100 a 180 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente por meio de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (150 mA, ~ 40 V) durante 2 horas. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética de proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com o corante Commassie blue (solução a 0,1% de Commassie brilliant blue em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25% de etanol) e as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético a 5%). Após lavagem rápida das membranas para retirada do excesso de corante com o tampão TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20), os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,2% de caseína em tampão TBS-t, sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15-18 horas, a 18 °C com anticorpos primários específicos (Tabela 2) diluídos em tampão TBS-t.

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas (segundo detalhado na Tabela 2) durante 2 horas. As membranas foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com TBS-t, e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugados aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. Para peroxidase (HRP) foi utilizado kit Super Signal (Pierce, EUA) e para a fosfatase alcalina (AP), foi utilizado o kit Lummiphos (Pierce, EUA).

As imagens foram detectadas e digitalizadas em sistema Chemilmager 5500 (Alpha Innotech, EUA) e as intensidades das bandas imunoreativas foram comparadas por análise densitométrica pelo software do mesmo sistema e expressas em unidades arbitrárias, utilizando como fator normalizador a análise densitométrica das bandas protéicas reveladas pelo corante de Ponceau.

O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa de 17 a 205 kDa; Bio Rad ,EUA).

A Tabela 2 indica a quantidade de proteína presente na amostra que foi administrada, porcentagem de acrilamida presente no gel, assim como, especificações dos anticorpos utilizados para cada proteína estudada.

Tabela 2 - Características dos componentes para *Western Blot*

Proteína	Gel	Proteína (µg/lane)	Anticorpo primário	Anticorpo secundário + conjugado
3-NT	10%	25 µg	Anti-NT (monoclonal de camundongo, Upstade, EUA) 1:2000 (500 ng/ml)	Policlonal de cabra anti-camundongo+AP (1:3000)
nNOs	7%	25 µg	Anti-nNOS (policlonal de coelho, BD Transduction Laboratories, EUA) 1:500 (500 ng/ml)	Policlonal de cabra anti-coelho+AP (1:3000)
eNOS	7%	50 µg	Anti-eNOS (monoclonal de camundongo, BD Transduction Laboratories, EUA) 1:500 (500 ng/ml)	Policlonal de cabra anti-camundongo+AP (1:3000)
SOD1	15%	10 µg	Anti-SOD1 (policlonal de ovelha, Calbiochem, Alemanha) 1:2000	Policlonal de coelho anti-Ovelha+HRP (1:3000)
SOD2	15%	30 µg	Anti-SOD2 (policlonal de ovelha, Calbiochem, Alemanha) 1:500	Policlonal de coelho anti-Ovelha+HRP (1:3000)

2.3.5 Expressão gênica de PIN e isoformas de NOS e de COX

A expressão de mRNA foi estimada pelo método semi-quantitativo da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). Amostras de córtex, hipotálamo, hipocampo e cerebelo foram removidas dos animais ao final do protocolo de isquemia e reperfusão e imediatamente congeladas em gelo seco e mantidas a -80 °C até o processamento para expressão gênica.

2.3.5.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído usando o reagente Brazol (10 mL/g de amostra, LABTRADE do Brasil) durante a homogeneização das amostras. Após 5 min de repouso, foi adicionado 1 mL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (1 parte de álcool isoamílico em 24 partes de clorofórmio) para cada 5 mL de Brazol, com agitação vigorosa para a extração dos lipídios. Os tubos foram deixados em repouso novamente (10 min) e posteriormente centrifugados em Centrífuga Eppendorf modelo 5810 (Eppendorf, Califórnia, EUA) a 12.000 g, 15 min a 4 °C. A fase aquosa sobrenadante (600 µL) foi separada e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol. Após 10 min a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12.000 g, 10 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e o pellet de RNA foi lavado com 500 µL de etanol 95%. Após centrifugação (7.000 g, 5 min a 4 °C), os sobrenadantes foram desprezados e os pellets foram lavados novamente com etanol 75%, centrifugados (7.000 g, 5 min a 4 °C), sendo os tubos invertidos e apoiados sobre papel de filtro a fim de eliminar os restos de etanol.

Posteriormente, o RNA foi dissolvido em 50-100 µL de água tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato). Alíquotas desta solução foram diluídas 1:500 e as absorbâncias foram medidas a 260 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience, Inglaterra) e as concentrações de RNA total foram calculadas em µg/µL.

A integridade do RNA isolado foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1% em TAE contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, GIBCO BRL, EUA) e as bandas foram reveladas sob luz ultravioleta.

2.3.5.2 Transcrição do cDNA

Cuidadosamente, 23 µl de H₂O (tratada com DEPC), 5 µl de oligo dT (Invitrogen do Brasil) e 5 µg de RNA (amostra) foram misturados. A mistura foi aquecida a 70 °C durante 10 min e deixada posteriormente à temperatura ambiente durante 10 min.

Na seguinte ordem, foram adicionados: 10 µl de tampão de reação (5 X *first strand buffer*, Invitrogen do Brasil), 2,5 µl de dNTP (Invitrogen do Brasil), 5 µl de DTT (0,1 M, Invitrogen do Brasil) e 1 µl de inibidor de RNases (Invitrogen do Brasil). A mistura foi aquecida a 42 °C durante 2 min, posteriormente adicionou-se 1 µl da enzima RT (transcriptase reversa, 200 U – Invitrogen do Brasil) e novamente aquecida a 42 °C por 1 h.

Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 70 °C durante 15 min e a 37°C por 2 min e mantidas a -20 °C até serem submetidas ao PCR.

2.3.5.3 PCR

Os primers utilizados (Invitrogen do Brasil) foram diluídos a uma concentração de 500 pmoles/µl (solução estoque) com H₂O Milli-Q autoclavada.

As seqüências de nucleotídeos dos primers de nNOS (Swain et al., 1997), proteína inibitória neuronal (PIN; Jaffrey e Snyder, 1996), e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), COX-1, COX-2, eNOS e iNOS (Ferraz et al., 1997) e o número de pares de bases (bp) estão descritos na tabela 3:

Tabela 3 - Características dos primers utilizados

Primer	Seqüências (5' → 3')	Produto (bp)
nNOS	3': CCCCGTCCTTTGAATACCAG 5': CCGAGAGCCGAGGCCGAACA	560
iNOS	3': ACAACAGGAACCTACCAGCTCA 5': GATGTTGTAGCGCTGTGTGTCA	651
eNOS	3': GGAGAAGATGCCAAGGCTGCTG 5': CTTCCAGTGTCCAGACGCACCA	904
COX-1	3': CCT TCT CCA ACG TGA GCT ACT A 5': TCC TTC TCT CCT GTG AAC TCC T	1036
COX-2	3': AGA CAG ATC ATA AGC GAG GAC C 5': CAC TTG CAT TGA TGG TGG CTG T	1158
PIN	3': GTA ACC ATG TGC GAC CGG AA 5': AGG AGA ATG GCC ACC TGA CC	254
GAPDH	3': CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT 5': AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	400

A reação da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25 µl e continha 2,5 µl de cDNA (amostra), 2,5 µl de tampão para PCR (10X), 0,75 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µl de dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfatos, 0,2 mM), 1,5 µl de primer 3' (0,3 µM), 1,5 de primer 5' (0,3 µM), 1,5 µl do primer de GAPDH 5' (0,3 µM), 1,5 µl do primer de GAPDH 3' (0,3 µM), 0,25µl de Taq polimerase (1,25 U, Fermentas, Brasil) e H₂O Milli-Q autoclavada para completar o volume. Após uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguiu-se o ciclo de amplificação, cujas características (número de ciclos, temperatura e tempo das etapas de desnaturação, anelamento e extensão) para cada produto de PCR (RNAm) estudado para estrutura encefálica analisada estão descritas na tabela 4. Após a última etapa de extensão do ciclo de amplificação, seguiu-se um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min e a 4 °C por 15 min.

2.3.5.4 Separação dos produtos de PCR

Alíquotas de 10 µl dos produtos da reação de PCR das amostras foram submetidas a um gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Os géis foram visualizados sob luz UV e as imagens foram capturadas pelo sistema Chemilmager 5500. As intensidades das bandas marcadas com brometo de etídio foram determinadas por densitometria e relativizadas à intensidade do controle interno (expressão gênica de GAPDH) de cada amostra. O nível da expressão foi expresso como % dos valores obtidos nas amostras do grupo SHAM (considerado como 100%).

Tabela 4 - Características dos ciclos de amplificação

RNA_m	Etapas da amplificação	Número de ciclos
nNOS	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 67 °C/45 seg Extensão: 72 °C/90 seg	Baço: 40
		Córtex: 30
		Hipotálamo: 33
		Hipocampo: 35
		Cerebelo: 30
eNOS	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 67 °C/45 seg Extensão: 72 °C/90 seg	Baço: 33
		Córtex: 40
		Hipotálamo: 35
		Hipocampo: 38
		Cerebelo: 38
iNOS	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 67 °C/45 seg Extensão: 72 °C/90 seg	Baço: 40
		Córtex: 40
		Hipotálamo: 40
		Hipocampo: 40
		Cerebelo: 40
COX-1	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 65 °C/30 seg Extensão: 72 °C/60 seg	Baço: 33
		Córtex: 40
		Hipotálamo: 40
		Hipocampo: 38
		Cerebelo: 40
COX-2	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 65 °C/30 seg Extensão: 72 °C/60 seg	Baço: 40
		Córtex: 33
		Hipotálamo: 38
		Hipocampo: 40
		Cerebelo: 40
PIN	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 63 °C/30 seg Extensão: 72 °C/30 seg	Baço: 22
		Córtex: 22
		Hipotálamo: 22
		Hipocampo: 22
		Cerebelo: 22
GAPDH	Desnaturação: 94 °C/60 seg Anelamento: 65 °C/30 seg Extensão: 72 °C/60 seg	Baço: 23
		Córtex: 23
		Hipotálamo: 23
		Hipocampo: 23
		Cerebelo: 23

2.3.6 Medida da atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO)

O conteúdo de neutrófilos no cérebro foi determinado pela quantificação da atividade de MPO tecidual. A medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de H_2O_2 e evidenciada pela mudança de absorbância medida a 460 nm (Bradley et al., 1982). Amostras de cada estrutura encefálica foram pesadas e homogeneizadas em 20 volumes (p/v) de solução de fosfato de potássio pH 6,0 contendo 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Chem. Co, EUA). Os homogenatos obtidos foram sonicados por 20 segundos, aquecidos durante duas horas a 60 °C para inativação da catalase endógena (Ohta, Kongo e Kishikawa, 2003) e centrifugados a 10.000 g por 2 minutos. A 10 µL dos sobrenadantes foram acrescentados 200 µL de solução de fosfato de potássio (5 mM, pH 6) contendo 16,7 mg/mL de o-dianisidina (Sigma Chem. Co., EUA) e 0,0005% de H_2O_2 em microplaca. A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando o aumento da absorbância da mistura a 460 nm (leituras coletadas em intervalos de 10 segundos durante 10 minutos). A atividade de MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo e o resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade de enzima capaz de degradar 1 µmol de H_2O_2 por minuto.

2.3.7 Determinação do conteúdo tecidual de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs)

A determinação dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) envolve a quantificação dos aldeídos formados durante a peroxidação lipídica, resultantes da degradação de hidroperóxidos, incluindo o malondialdeído (MDA).

As amostras de córtex, hipotálamo, hipocampo e cerebelo foram pesadas e homogeneizadas em 10 volumes de solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) contendo butil hidroxitolueno (BHT, 12,6 mM). A seguir, alíquotas de 200 µL do homogenato (em duplicata) foram incubadas a 90 °C durante 45 minutos com 400 µL de solução contendo TBA a 0,37 %, em meio fortemente ácido (ácido tricloroacético a 15% e ácido clorídrico 0,25 N). No final da incubação, e após centrifugação durante 5 minutos a 10000 g, 300 µL dos sobrenadantes foram submetidos à extração do produto de reação com 300 µL de n-butanol e 30 µL de solução saturada de cloreto de sódio, seguida pela agitação em vórtex por 30

segundos e centrifugação durante 2 minutos a 10000 *g*. Duzentos µL dos sobrenadantes (fase orgânica) foram pipetados em microplaca para leitura dos valores de absorbância a 535 nm (corrigidos pelos valores de absorbância a 572 nm). Os resultados foram expressos como nmol de aldeído formado por mg de proteína (Bose, Sutherland e Pinsky, 1989) utilizando-se para o cálculo um coeficiente de extinção molar de $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.8 Medida da atividade de arginase

Os tecidos foram pesados, homogeneizados em 10 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF, leupeptina 10 µg/ml, inibidor de tripsina 10 µg/ml e 1 mM de L-cit) e centrifugados durante 5 minutos a 1000 *g* e 4 °C. Cento e vinte microlitros dos sobrenadantes foram colocados em tubos de 1,5 mL e incubados a 55 °C por 10 minutos com igual volume de uma solução 10 mM de MnCl₂ (Sigma Chem. Co, EUA) preparada em Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Após o término da incubação, as amostras foram colocadas no banho de gelo e foi acrescentado em cada tubo 240 µL de uma solução de L-arg 0,5 M (Sigma Chem. Co, EUA) preparada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9,7. Em seguida, as amostras de cada tubo foram aliquotadas em quadruplicata (4X100µL) em tubos previamente cobertos com fita adesiva, sendo que a metade foi mantida no banho de gelo (servindo como branco de amostra) e a outra metade foi incubada durante 1 hora a 37°C. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 600 µL de uma solução ácida que continha H₂SO₄, H₃PO₄ e H₂O em uma proporção de 1:3:7. Os tubos foram levados para uma capela (para proteção da luz) e só então foram adicionados 25 µL do reagente ISPF (α-isonitrosopropiofenona) a 9% (Sigma Chem. Co, EUA) dissolvido em etanol absoluto. Em seguida, os tubos foram vedados com fita teflon e fita adesiva com a finalidade de evitar a evaporação antes de serem submetidos a uma nova incubação à 100°C durante 45 minutos em banho de água fervente. Após esse período, 200 µL da mistura de reação foram pipetados em microplacas de Elisa e os valores de absorbância a 540 nm foram registrados (Espectra max plus 384, EUA). A atividade de arginase foi expressa em nanomoles de uréia produzidos por minuto por miligrama de proteína, utilizando-se uma curva de calibração de uréia com concentrações entre 0,13 e 8,33 mM.

2.3.9 Ensaio do NF- κ B

2.3.9.1 Extração de proteínas nucleares

O ensaio de ativação do NF- κ B foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Cristóforo Scavone (Depto. De Farmacologia, ICB/USP) e foi baseado no método descrito por Rong e Baudry (1996). As amostras foram descongeladas e homogeneizadas (aproximadamente 100 mg tecido/mL) em homogeneizadores Teflon[®]-vidro com tampão PBS (NaCl 137mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,27 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases (PMSF 0,5 M; DTT 0,5 M; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL) e EDTA 0,1 mM. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 30 segundos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 400 μ L de tampão de lise (HEPES pH 7,9 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL) e incubado em gelo durante 10 minutos. Após a incubação adicionou-se aos tubos 10 μ L de NP-40 10% com agitação vigorosa por 30 segundos e em seguida os tubos foram centrifugados a 12.000g por 30 segundos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 100 μ L de tampão de extração (HEPES pH 7,9 20mM; glicerol 25%; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL) e incubado em gelo durante 20 minutos, centrifugando-se a suspensão 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -80 °C e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford.

2.3.9.2 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (“gel shift”)

O oligonucleotídeo de DNA contendo a seqüência (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') foi marcado pela adição de γ -³²P-ATP numa solução contendo tampão T₄ quinase, T₄ quinase e água, nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T₄ quinase, 1 μ L de γ -³²P-ATP (3000mCi/mmol), 1 μ L de tampão T₄ quinase (10X) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação a 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ -³²P-ATP foi retirado, passando a mistura através da coluna recheada com resina Sephadex G-25 (Microspin G-25, Amersham). No dia do ensaio, 1 μ L da solução contendo a sonda marcada foi adicionado a um

recipiente contendo líquido de cintilação para determinação da atividade obtida em um contador para emissão β . Feito isto, ajustou-se a atividade para aproximadamente 25.000 cpm/ μ L de solução contendo a sonda.

Para o ensaio de ligação ao DNA foram adicionados ao tubo de microcentrífuga: 4 μ L de tampão de ligação 5 vezes concentrado ($MgCl_2$ EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; TRIS-HCl 50 mM pH7,5; Poly dIdC 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%); extrato nuclear em quantidade suficiente para 10 μ g de proteína e H₂O em quantidade suficiente para 20 μ L de volume final. Os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μ L). Os tubos foram novamente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μ L de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% (acrilamida/bisacrilamida = 37,5/1). Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida 0,5 x TBE (1 x TBE = TRIS 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1mM). Após 2 h de eletroforese, 150-160 V, o gel foi secado e em seguida exposto ao filme (Kodak, X-OMAT) em cassete a -20 °C por volta de 3 a 5 dias.

A revelação do filme foi realizada em sala escura, onde o filme foi mergulhado em solução reveladora (Kodak, GBX) por 1 minuto. Em seguida, o filme foi mergulhado em solução de ácido acético 2 % por 30 segundos. Por fim, o filme foi mergulhado em solução fixadora (Kodak, GBX) por 1 minuto e 30 segundos e lavado abundantemente em água corrente.

O filme foi fotografado com o detector de imagens Chemilmager 5500 e a intensidade dos principais dímeros formados foram determinadas por densitometria usando software específico. Como não foram utilizados anticorpos para especificar os dímeros formados, estes foram denominados de **bandas a e b**, sendo que o complexo não específico foi denominado **banda c**.

2.3.10 Análise estatística

Todos os resultados experimentais foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student para amostras não-pareadas, utilizando o Software GraphPad Prism (versão 4.0). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.4 Resultados

2.4.1 Expressão gênica de PIN e isoformas de NOS e COX no baço

O aumento de RNAm para COX-2 (Figura 2) foi encontrado no baço de animais submetidos a isquemia mesentérica após 2 h de reperfusão, em relação ao grupo Sham (1118 ± 362 vs $100 \pm 20\%$). Este aumento não foi observado após o período de 45 min de isquemia (87 ± 4 vs $100 \pm 7\%$). Também, após a reperfusão pode-se notar um discreto aumento (porém, não significativo) de COX-1 no grupo IRI (209 ± 30 vs $100 \pm 35\%$; $P=0,0762$). Não foram encontradas diferenças na expressão de COX-1 entre os grupos I e Sham após a isquemia (106 ± 12 vs $100 \pm 48\%$). Embora a expressão de iNOS não tenha sido detectada em todas as amostras analisadas, uma maior expressão deste gene ocorreu nos animais I e IRI (Figura 6). Não foram encontradas diferenças na expressão de PIN (Figura 3), tanto após o período de isquemia (90 ± 13 vs $100 \pm 24\%$) e de reperfusão (112 ± 7 vs $100 \pm 5\%$). O mesmo ocorreu para a expressão de nNOS (Figura 4), não havendo diferenças entre os grupos, durante a isquemia (232 ± 103 vs $100 \pm 5\%$) ou após a reperfusão (71 ± 41 vs $100 \pm 12\%$). Também não foram encontradas diferenças significativas na expressão de eNOS (Figura 5), durante a isquemia (95 ± 16 vs $100 \pm 34\%$) ou após a reperfusão (112 ± 15 vs $100 \pm 12\%$).

Figura 1 - Efeito da IRI na expressão gênica da COX-1 no baço.

Discreto aumento de RNAm para COX-1, após a reperfusion de 2h, foi observado no baço dos animais IRI, não sendo contudo, estatisticamente significativo ($P=0,0762$, teste t de Student para dados não pareados). Não foram observadas diferenças entre os grupos durante o período de isquemia. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM ($n=3-4$). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 2 - Efeito da IRI na expressão gênica da COX-2 no baço.

Aumento de RNAm para COX-2 foi encontrado no baço de animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH); este aumento não ocorreu no grupo I. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 3 - Efeito da IRI na expressão gênica da PIN no baço.

Não foram encontradas diferenças na expressão de RNAm para PIN no baço dos animais I e IRI, comparados com os respectivos grupos Sham (SH). As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 4 - Efeito da IRI na expressão gênica da nNOS no baço.

Não foram encontradas diferenças na expressão de RNAm para nNOS no baço de animais I e IRI, comparados com os respectivos grupos Sham (SH). As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 5 - Efeito da IRI na expressão gênica da eNOS no baço.

Não foram encontradas diferenças na expressão de RNAm para eNOS no baço de animais I e IRI, comparados com os respectivos grupos Sham (SH). As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 6 - Efeito da IRI na expressão gênica da iNOS no baço.

Na figura são mostradas fotografias dos géis de eletroforese obtidos após a análise de RNAm para iNOS em amostras de baço. As flechas verticais assinalam as amostras onde RNAm para iNOS foi detectado. A - Amostras colhidas após o período de isquemia de 45 min (I). B - Amostras colhidas após a reperusão de 2h (IRI). SH: Sham.

2.4.2 Atividade da NOS no tecido encefálico

Os animais expostos a IRI, quando comparados ao grupo Sham, apresentaram uma diminuição significativa na atividade da NOS dependente de Ca^{2+} (Figura 7), no córtex ($4,0 \pm 0,9$ vs $11,8 \pm 2,4$ pmol/min/mg prot), hipotálamo ($13,5 \pm 3,5$ vs $37,7 \pm 8,8$ pmol/min/mg prot) e hipocampo ($7,3 \pm 1,0$ vs $14,7 \pm 1,8$ pmol/min/mg prot). Não foram detectadas diferenças entre os grupos na atividade de NOS dependente de Ca^{2+} medidas no cerebelo ($189,9 \pm 6,3$ vs $207,1 \pm 14,6$ pmol/min/mg prot).

Figura 7 - Efeito da IRI sobre a atividade da NOS no tecido encefálico.

As barras representam os resultados expressos como média ± EPM (4-7 ratos/grupo). Colunas brancas: grupo Sham (SH); colunas pretas: grupo IRI. * P < 0,05, versus o respectivo grupo SH (teste t de Student para dados não pareados). Abaixo de cada gráfico estão também expressos os valores percentuais (média ± EPM) da atividade de NOS dependente de Ca²⁺ para os grupos SH e IRI.

2.4.3 Expressão gênica de PIN e isoformas de NOS e COX no tecido encefálico

Padrões distintos para a expressão gênica de NOS e COX-2 foram observados em resposta à IRI. O aumento de COX-2 ocorreu no hipotálamo dos animais submetidos à IRI (582 ± 159 vs $100 \pm 44\%$, Figura 9), não havendo diferenças significativas, quando comparado ao grupo Sham, no córtex pré-frontal (122 ± 14 vs $100 \pm 8\%$), hipocampo (80 ± 25 vs $100 \pm 14\%$) e cerebelo (146 ± 87 vs $100 \pm 72\%$). O grupo IRI apresentou aumento na expressão de nNOS no córtex (278 ± 37 vs $100 \pm 16\%$; Figura 11), não apresentando alterações significativas no hipotálamo (88 ± 18 vs $100 \pm 8\%$), hipocampo (103 ± 24 vs $100 \pm 14\%$) e cerebelo (97 ± 18 vs $100 \pm 7\%$). Os animais IRI também apresentaram discreto aumento de eNOS no hipocampo (222 ± 50 vs $100 \pm 14\%$; Figura 12), que no entanto, não foi estatisticamente significativo ($P=0,0567$). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle, na expressão de eNOS no córtex (130 ± 36 vs $100 \pm 32\%$), hipotálamo (97 ± 8 vs $100 \pm 12\%$) e cerebelo (65 ± 15 vs $100 \pm 32\%$). A presença de iNOS foi evidenciada no córtex de alguns animais do grupo IRI, não detectando-se a expressão desta isoforma nas demais estruturas encefálicas (Figura 13). Apesar da diminuição na atividade da NOS dependente de Ca^{+} no córtex, hipotálamo e hipocampo dos animais IRI (Figura 7), a expressão gênica da PIN não foi diferente entre os grupos IRI e Sham, em todas as estruturas analisadas (córtex: 93 ± 8 vs $100 \pm 3\%$; hipotálamo: 106 ± 9 vs $100 \pm 4\%$; hipocampo: 98 ± 13 vs $100 \pm 1\%$; cerebelo: 94 ± 9 vs $100 \pm 12\%$; Figura 10).

Diferenças na expressão gênica de COX-1 também não foram encontradas entre os animais IRI e Sham (Figura 8), no córtex (146 ± 29 vs $100 \pm 10\%$), hipotálamo (133 ± 29 vs $100 \pm 27\%$), hipocampo (170 ± 39 vs 100 ± 34) e cerebelo (48 ± 9 vs 100 ± 46).

Figura 8 - Efeito da IRI na expressão gênica da COX-1 no tecido encefálico.

Não foram encontradas diferenças na expressão de RNAm para COX-1 nas estruturas encefálicas (córtex, hipotálamo, hipocampo e cérebro) dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 9 - Efeito da IRI na expressão gênica da COX-2 no tecido encefálico.

Aumento de RNAm para COX-2 foi encontrado no hipotálamo de animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). Não foram encontradas diferenças significativas no córtex, hipocampo e cerebelo. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). * $P < 0,05$, versus o respectivo grupo SH (teste t de Student para dados não pareados). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 10 - Efeito da IRI na expressão gênica da PIN no tecido encefálico.

Não foram encontradas diferenças na expressão de RNAm para PIN nas estruturas encefálicas (córtex, hipotálamo, hipocampo e cérebro) dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 11 - Efeito da IRI na expressão gênica da nNOS no tecido encefálico.

Aumento de RNAm para nNOS foi encontrado no córtex de animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). Não foram encontradas diferenças significativas no hipotálamo, hipocampo e cerebello. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 12 - Efeito da IRI na expressão gênica da eNOS no tecido encefálico.

Discreto aumento de RNAm para eNOS foi encontrado no hipocampo de animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH), não sendo contudo, estatisticamente significativo ($P=0,0567$, teste t de Student para dados não pareados). Também não foram encontradas diferenças significativas nas demais estruturas (córtex, hipotálamo e cerebelo). As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM ($n=3-4$). Logo abaixo do gráfico é apresentada eletroforese representativa em gel de agarose a 1,5%.

Figura 13 - Efeito da IRI na expressão gênica da iNOS no córtex.

Foi encontrado discreto aumento de RNAm para iNOS em algumas amostras do córtex de animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). A expressão de iNOS não foi detectada nas demais estruturas, para ambos os grupos. A figura representa a eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

2.4.4 Atividade de arginase no tecido encefálico

A Figura 14 mostra que o aumento na atividade de arginase ocorreu no córtex ($2,8 \pm 0,3$ vs $1,1 \pm 0,4$ nmol uréia/min/mg prot), hipotálamo ($5,7 \pm 0,7$ vs $3,0 \pm 0,7$ nmol uréia/min/mg prot) e hipocampo ($3,4 \pm 0,7$ vs $1,1 \pm 0,4$ nmol uréia/min/mg prot) em decorrência da IRI. Este aumento, contudo, não ocorreu no cerebelo ($4,2 \pm 0,6$ vs $3,9 \pm 0,6$ nmol uréia/min/mg prot).

Figura 14 - Efeito da IRI sobre a atividade de arginase no tecido encefálico.

As barras representam os resultados expressos como média ± EPM (n=6/grupo). Colunas brancas: grupo Sham (SH); colunas pretas: grupo IRI. Resultados foram expressos em nanomoles de uréia formada/minuto/miligrama de proteína. *P<0,05; **P<0,01, versus o respectivo grupo SH (teste t de Student para dados não pareados). Abaixo de cada gráfico estão também expressos os valores percentuais (média ± EPM) da atividade de arginase para os grupos SH e IRI, com os respectivos níveis de significância.

2.4.5 Conteúdo de TBARs no tecido encefálico

A Figura 15 mostra que diminuição no conteúdo de TBARs em relação ao grupo Sham foi observado no córtex ($0,80 \pm 0,01$ vs $0,94 \pm 0,05$ nmols aldeído/mg prot) e hipotálamo ($0,98 \pm 0,02$ vs $1,13 \pm 0,02$ nmols aldeído/mg prot) dos animais do grupo IRI. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto ao conteúdo de TBARs medido nas amostras de hipocampo ($0,68 \pm 0,02$ vs $0,71 \pm 0,02$ nmols aldeído/mg prot) e cerebelo ($0,81 \pm 0,01$ vs $0,81 \pm 0,03$ nmols aldeído/mg prot).

Figura 15 - Efeito da IRI sobre o conteúdo de TBARs no tecido encefálico.

As barras representam os resultados expressos como média $\pm$ EPM (n=4-6 ratos/grupo). Colunas brancas: grupo Sham; colunas pretas: grupo IRI. Resultados expressos em nanomoles de aldeído formado por mg de proteína. *P<0,05; **P<0,01; versus o respectivo grupo Sham (teste t de Student para dados não pareados).

2.4.6 Atividade de MPO no tecido encefálico

Conforme mostrado na Figura 16, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos IRI e Sham quanto à atividade de MPO medida no córtex ($0,005 \pm 0,003$ vs $0,006 \pm 0,003$ U/mg tecido), hipotálamo ($0,013 \pm 0,007$ vs $0,009 \pm 0,004$ U/mg tecido), hipocampo ($0,008 \pm 0,003$ vs $0,006 \pm 0,003$ U/mg tecido) e cerebelo ($0,019 \pm 0,004$ vs $0,010 \pm 0,002$ U/mg tecido).

Figura 16 - Efeito da IRI sobre o a atividade de mieloperoxidase no tecido encefálico.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos IRI e Sham na atividade de MPO medida nas estruturas encefálicas analisadas (córtex, hipotálamo, hipocampo e cérebro). As barras representam os resultados expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-7$ ratos/grupo). Colunas brancas: grupo Sham; colunas pretas: grupo IRI.

2.4.7 Nitração de resíduos protéicos de tirosina no tecido encefálico

Não se evidenciou diferença significativa na nitração total de proteínas contendo resíduos de tirosina (Figura 17) entre os animais IRI e o grupo Sham, no córtex (108 ± 14 vs $100 \pm 12\%$), hipotálamo (111 ± 8 vs $100 \pm 6\%$), hipocampo (108 ± 3 vs $100 \pm 7\%$) e cerebelo (120 ± 25 vs $100 \pm 11\%$). O mesmo foi observado quando as intensidades das principais bandas protéicas nitradas, em cada estrutura, foram comparadas entre os grupos (Figuras 18-21).

Figura 17 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos protéicos de tirosina no tecido encefálico.

Não houve diferenças significativas entre os grupos IRI e Sham (SH) quanto à presença de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina nas estruturas analisadas. As imagens A-D representam blots representativos obtidos de amostras de córtex, hipotálamo, hipocampo e cerebelo, respectivamente. C+: controle positivo (nitro-albumina); M: marcador de peso molecular (21 a 118 kDa). O gráfico representa a análise densitométrica das bandas reveladas com anticorpo anti-3-NT. As barras representam os resultados expressos como média $\pm$ EPM (n=4/grupo). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI.

Figura 18 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do córtex frontal.

Não houve diferenças significativas no padrão de nitração de proteínas contendo resíduos de tirosina no córtex dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). As barras representam os resultados expressos como média $\pm$ EPM ($n=4$ ratos/grupo). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. Abaixo de cada gráfico estão também expressos os valores percentuais (média $\pm$ EPM) de cada banda protéica nitrada para os grupos SH e IRI.

Figura 19 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do hipotálamo.

Não houve diferenças significativas no padrão de nitração de proteínas contendo resíduos de tirosina no hipotálamo dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). As barras representam os resultados expressos como média $\pm$ EPM ($n=4$ ratos/grupo). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. Abaixo de cada gráfico estão também expressos os valores percentuais (média $\pm$ EPM) de cada banda protéica nitrada para os grupos SH e IRI.

Figura 20 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do hipocampo.

Não houve diferenças significativas no padrão de nitração de proteínas contendo resíduos de tirosina no hipocampo dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). As barras representam os resultados expressos como média $\pm$ EPM ($n=4$ ratos/grupo). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. Abaixo de cada gráfico estão também expressos os valores percentuais (média $\pm$ EPM) de cada banda protéica nitrada para os grupos SH e IRI.

Figura 21 - Efeito da IRI sobre a nitração de resíduos de tirosina em algumas proteínas do cerebello.

Não houve diferenças significativas no padrão de nitração de proteínas contendo resíduos de tirosina no cerebello dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). As barras representam os resultados expressos como média ± EPM (n=4 ratos/grupo). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. Abaixo de cada gráfico estão também expressos os valores percentuais (média ± EPM) de cada banda protéica nitrada para os grupos SH e IRI.

2.4.8 Expressão protéica de nNOS, eNOS, SOD1 e SOD2 no tecido encefálico

O grupo IRI não apresentou diferenças significativas na expressão protéica de nNOS (Figura 22) quando comparado com o grupo Sham, no córtex (95 ± 5 vs $100 \pm 4\%$), hipotálamo (93 ± 7 vs $100 \pm 4\%$), hipocampo (115 ± 12 vs $100 \pm 6\%$) e cerebelo (105 ± 8 vs $100 \pm 9\%$). Também não foram observadas diferenças significativas na expressão protéica de SOD2 (Figura 25) no córtex (95 ± 15 vs $100 \pm 1\%$), hipotálamo (91 ± 5 vs $100 \pm 5\%$), hipocampo (97 ± 7 vs $100 \pm 6\%$) e cerebelo (107 ± 6 vs $100 \pm 4\%$). No entanto, a expressão protéica da eNOS (Figura 23) esteve aumentada no hipocampo do grupo IRI em relação ao controle (110 ± 3 vs $100 \pm 3\%$), sem apresentar contudo diferenças significativas no córtex (91 ± 9 vs $100 \pm 5\%$), hipotálamo (91 ± 2 vs $100 \pm 4\%$) e cerebelo (107 ± 7 vs $100 \pm 3\%$). O grupo IRI também apresentou diminuição na expressão protéica de SOD1 (Figura 24) que foi observada no hipotálamo (83 ± 2 vs $100 \pm 4\%$) e hipocampo (84 ± 6 vs $100 \pm 4\%$), mas não no córtex (96 ± 4 vs $100 \pm 2\%$) e cerebelo (94 ± 3 vs $100 \pm 3\%$).

Figura 22 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de nNOS no tecido encefálico.

Não houve diferenças significativas entre os grupos IRI e Sham (SH) quanto à expressão protéica de nNOS nas estruturas analisadas. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM ($n=3-4$). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. Logo abaixo do gráfico existe figura demonstrativa das membranas reveladas com anti-nNOS.

Figura 23 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de eNOS no tecido encefálico.

Aumento significativo na expressão protéica de eNOS foi encontrado no hipocampo dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). Não foram encontradas diferenças significativas no córtex, hipotálamo e cerebelo. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM ($n=3-4$). * $P<0,05$; versus o respectivo grupo SH (teste t de Student para dados não pareados). Logo abaixo do gráfico existe figura demonstrativa das membranas reveladas com anti-nNOS.

Figura 24 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de SOD1 no tecido encefálico.

Diminuição significativa na expressão protéica de SOD1 foi encontrada no hipotálamo e hipocampo dos animais IRI, comparados com o grupo Sham (SH). Não foram encontradas diferenças significativas no córtex e cerebelo. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. *P<0,05; **P<0,01; versus o respectivo grupo SH (teste t de Student para dados não pareados). Logo abaixo do gráfico existe figura demonstrativa das membranas reveladas com anti-SOD1.

Figura 25 - Efeito da IRI sobre a expressão protéica de SOD2 no tecido encefálico.

Não houve diferenças significativas entre os grupos IRI e Sham (SH) quanto à expressão protéica de SOD2 nas estruturas analisadas. As barras representam os resultados da análise densitométrica das bandas, expressos como média $\pm$ EPM ($n=3-4$). Colunas brancas: grupo SH; colunas pretas: grupo IRI. Logo abaixo do gráfico existe figura demonstrativa das membranas reveladas com anti-SOD2.

2.4.9 Ativação do fator de transcrição NF- κ B no tecido encefálico

Conforme os resultados mostrados na Figura 26, a IRI não foi capaz de alterar a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, em relação ao grupo Sham, no córtex (1885 ± 159 vs 1574 ± 105 U.A.), hipotálamo (5202 ± 805 vs 5030 ± 476 U.A.), hipocampo (banda a: 3960 ± 625 vs 3204 ± 633 U.A; banda b: 2679 ± 619 vs 2164 ± 233 U.A.) e cerebelo (banda a: 8338 ± 393 vs 8017 ± 1167 U.A.; banda b: 5625 ± 264 vs 6366 ± 837 U.A.).

Figura 26 - Efeito da IRI na ativação do NF-κB no tecido encefálico.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos IRI e Sham (SH) nas estruturas analisadas. As barras representam os resultados da análise densitométrica dos complexos (bandas a, b) de NF-κB (em unidades arbitrárias), expressos como média $\pm$ EPM ($n=3$ /grupo). Colunas brancas representam o grupo SH; colunas pretas representam o grupo IRI. Logo abaixo do gráfico são apresentadas as figuras das auto-radiografias provenientes do ensaio de gel de retardo. Os principais dímeros (bandas a e b) e o complexo não específico (banda c) estão sinalizados nas figuras.

2.5 Discussão

Neste estudo investigamos os efeitos da IRI sobre o SNC em termos de ocorrência de mediadores e marcadores de estresse oxidativo e mecanismos de defesa autoregulatórios centrais, dando notoriedade principal à via da arginina-NO. Utilizando rato como modelo experimental, induzimos a oclusão da artéria mesentérica superior por 45 min e 2 horas de reperfusão, elegendo-se o córtex pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e cerebelo para análise dos efeitos causados pela IRI. Os principais resultados indicam que, quando comparados com o grupo Sham, os animais IRI apresentaram aumento na expressão gênica de nNOS no córtex e COX-2 no hipotálamo. IRI causou também uma redução significativa na atividade de NOS dependente de Ca^{2+} no córtex, hipotálamo e hipocampo e aumento da atividade da arginase nessas mesmas estruturas. O conteúdo de TBARs diminuiu no córtex e no hipotálamo, contudo a atividade de MPO e o conteúdo de proteínas contendo resíduos de 3-NT não foram estatisticamente diferentes entre os grupos Sham e IRI. Esses achados são discutidos a seguir, separadamente.

Primeiramente, propusemos estudar a expressão gênica de NOS e COX-2 em baço desses animais na situação de isquemia e reperfusão mesentérica, com o intuito de verificar a importância de cada evento na ativação do SMF neste órgão. O aumento de RNAm de COX-2 (Figura 2) e iNOS (Figura 6) confirmam a ativação deste órgão e sua contribuição para a amplificação dos efeitos da IRI, principalmente durante a reperfusão.

Dando prosseguimento ao nosso trabalho, e considerando que os efeitos do estresse oxidativo secundários à IRI sobre o SNC são pouco documentados, avaliamos, após duas horas de reperfusão, diversos componentes que participam deste fenômeno.

Dentro do SNC, o sistema límbico constitui a região responsável pela homeostasia do organismo, sendo o hipotálamo importante membro desse sistema sinalizador dos sinais provenientes do ambiente interno e externo. O sistema límbico tem também um papel central na emocionalidade, que é um sistema não verbal que facilita a sobrevivência e lida com a esquivas, interação social e aprendizagem. O CRF hipotalâmico desempenha importante papel dentro desse contexto. Por exemplo, Por exemplo, o CRF aumenta a motilidade intestinal e exerce efeitos ansiogênicos (via receptores CRF1) e a sua hipersecreção no cérebro deve ter

relevância clínica na comorbidade de ansiedade/depressão e SII (Patacchioli et al., 2001; Tache et al., 1999, 2001). A hipersecreção de CRF hipotalâmico pode ocorrer em resposta a várias citocinas pró-inflamatórias e parece ser mediada pelos produtos das ciclooxigenases (Navarra et al., 1990). No hipotálamo dos animais IRI encontramos aumento na expressão gênica de COX-2 (Figura 9). Considerando a importância desta estrutura como componente chave na comunicação entre o trato gastrointestinal e o SNC, e principalmente, para a homeostasia interna do organismo, este aumento indica uma reação do hipotálamo aos efeitos sistêmicos ocasionados pela IRI, e poderia contribuir para a resposta de elevação da temperatura corporal (febre), liberação de CRF hipotalâmico e consequentemente de glicocorticóides, além de alterações comportamentais nestes animais. No entanto, não foi detectado aumento na ativação do NF- κ B neste mesmo período que justificasse a ativação da transcrição gênica da COX-2 no hipotálamo por este fator de transcrição (Figura 26), sugerindo outra via de ativação nuclear.

O efeito do NO depende do estágio do processo isquêmico durante o qual é produzido, assim como da fonte celular e enzimática (Iadecola, 1997). O NO produzido pela nNOS e iNOS parece estar envolvido na morte celular e inflamação após isquemia cerebral (Samdani, Dawson e Dawson, 1997). Aumentos na expressão gênica e protéica destas isoformas no SNC têm sido observados na isquemia cerebral, demonstrando que a iNOS e a isoforma constitutivamente expressa (nNOS) podem ser induzidas em uma variedade de células no SNC (Iadecola et al., 1996; Zhang et al., 1994). A neurotoxicidade do NO pode ser devida à sua reação com o $O_2^{\bullet-}$, o que resultaria na formação de $ONOO^-$ responsável pela morte celular (Beckman e Koppenol, 1996). Por exemplo, Eliasson et al. (1999) demonstraram que embora a isquemia cerebral tenha levado a um substancial aumento na atividade da nNOS (medida indiretamente pela formação de citrulina) tanto no tecido infartado como nas áreas periféricas, a formação de 3-NT (que na ausência de neutrófilos pode refletir produção de $ONOO^-$) ocorreu somente no tecido infartado, isto é, onde ocorreu morte celular.

No SNC, a nNOS aparece ligada à membrana dos neurônios por meio da PSD95, um componente de PSD (densidade pós-sináptica) que se associa aos receptores NMDA nas sinapses. A ativação do receptor de NMDA por glutamato promove influxo de Ca^{2+} e ativação da nNOS. Além disso, a ativação do receptor metabotrópico de glutamato desencadeia o mecanismo de transdução de sinal

levando a ativação de proteína-quinase C que por sua vez fosforila o receptor de NMDA aumentando sua ativação (Okada, 1992). A nNOS tem sua expressão aumentada a partir de 15 min, com pico em 1h após o início da isquemia cerebral focal permanente (Zhang et al., 1994) e seu aumento está ligado ao dano neuronal. Determinamos então, a expressão gênica de nNOS no tecido nervoso em resposta à IRI, uma vez que este parâmetro poderia constituir um indício de susceptibilidade aumentada do SNC aos efeitos prejudiciais da lesão mesentérica. Os resultados mostram que o córtex frontal responde ao estímulo da IRI, com aumento da produção de RNAm para nNOS, após duas horas de reperfusão (Figura 11).

A expressão de eNOS aumenta no cérebro de ratos após administração intraperitoneal de LPS, porém em menor proporção do o observado com a iNOS (Modolell, Eichmann e Soler, 1997). Co-expressão de eNOS e nNOS, mas não de iNOS, ocorre nas primeiras horas de isquemia cerebral, situação na qual acredita-se que o aumento de eNOS ajude a contrabalançar a neurotoxicidade da nNOS, na tentativa de preservar o fluxo sanguíneo cerebral comprometido. Nós observamos aumento na expressão gênica (Figura 12) e protéica (Figura 23) dessa isoforma no hipocampo dos animais submetidos à IRI, o que poderia sugerir uma estratégia de proteção central contra a IRI.

Expressão de iNOS normalmente não é detectável no cérebro de ratos sob condições fisiológicas (Koprowski et al., 1993). Usando a técnica de RT-PCR, também não detectamos esta isoforma nos animais controle (SH), nas estruturas do SNC analisadas. Entretanto, observamos discreto aumento em algumas amostras do córtex de animais submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica (Figura 13), sem encontrar esse achado, nas demais estruturas.

A nNOS ativada catalisa a formação de NO a partir da L-arg (Marletta, 1994), o qual é um importante mensageiro que pode estar ligado a sinalização celular, mas também ao prejuízo neuronal, pela formação de ONOO^- quando o $\text{O}_2^{\bullet-}$ está presente, como ocorre na reperfusão após isquemia cerebral (Beckman e Koppenol 1996; Eliasson et al., 1999). Determinamos se o aumento do RNAm para nNOS estaria conduzindo ao aumento do produto final (NO) no tecido cerebral em resposta à IRI, por meio da determinação da atividade catalítica da NOS.

Os resultados mostram que a NOS neuronal dependente de Ca^{2+} é diferentemente regulada no SNC, com diminuição da atividade enzimática no córtex, hipotálamo e hipocampo, mas não no cerebelo (Figura 7). Esta diminuição poderia

sugerir um mecanismo de proteção do SNC pela inibição da produção aumentada de NO (e consequentemente da formação de ONOO⁻). Aumento na expressão gênica de nNOS e diminuição na atividade catalítica ocorrem em outras situações, como no hipocampo de animais submetidos à IRC (Osuka et al., 2002) e no hipotálamo de ratos colestáticos (Swain et al., 1997).

Como encontramos uma diminuição na atividade catalítica da NOS neuronal, tivemos interesse em verificar se esta inibição estaria relacionada a aumento da expressão gênica da PIN, uma vez que esta proteína interage na porção N-terminal da nNOS, inibindo a dimerização necessária para a atividade catalítica (Jaffrey e Snyder, 1996). No entanto, em nenhuma região estudada, observamos qualquer diferença no conteúdo de RNAm para PIN (Figura 10) que justificasse os resultados encontrados de inibição da atividade catalítica da NOS. Podemos sugerir que o SNC apresenta outros recursos de defesa para evitar o excesso de produção de NO. Tal inibição também foi recentemente encontrada no hipocampo, mas não no córtex, em resposta à IRC, sendo mediada por fosforilação da NOS pela enzima CaM-K II α (quinases II α dependentes de cálcio/calmodulina) e constituindo um mecanismo interno de defesa à susceptibilidade aumentada aos danos isquêmicos nos neurônios hipocámpais (Osuka et al., 2002). Como os padrões de expressão gênica e protéica estão relacionados à duração e gravidade da lesão, seria mais provável encontrarmos em nosso modelo de IRI uma maior proteção do SNC quando comparado à IRC, onde os efeitos deletérios sobre o SNC são notórios e procuram sobrepujar as estratégias de proteção. Neste sentido, parece justificável termos encontrado no córtex (e também no hipotálamo e hipocampo) uma diminuição da atividade catalítica da NOS neuronal, fenômeno que ocorreu somente no hipocampo em resposta à IRC (Osuka et al., 2002). Esta diminuição inclusive pode significar um sinal precoce de defesa do sistema límbico (do qual fazem parte o córtex, hipotálamo e hipocampo) frente a situações ou agentes agressores provindos do meio ambiente (interno ou externo).

A arginase constitui outra via que pode controlar a produção de NO, uma vez que utiliza a L-arg como substrato para a produção de ornitina e uréia. A definição dos efeitos da arginase sobre a NOS no SNC é importante já que a superprodução de NO tem sido implicada em doenças neurodegenerativas. Ao contrário do observado com a atividade da NOS dependente de Ca⁺⁺, a atividade enzimática da arginase mostrou-se aumentada no córtex, hipotálamo e hipocampo (Figura 14).

Este aumento poderia significar uma estratégia de proteção contra a formação de ONOO^- , uma vez que poderia contribuir para a diminuição na atividade catalítica da NOS neuronal por meio da limitação da quantidade de substrato (L-arg). Entretanto, isto somente é uma hipótese, já que existem muitos elementos pós-transcricionais que podem contribuir para a regulação da nNOS.

No presente estudo utilizamos a medida de TBARs, que é um marcador de peroxidação lipídica, para avaliação do estresse oxidativo. Não observamos dano oxidativo nas estruturas analisadas, pelo contrário, o cérebro parece reagir contra os efeitos da IRI, com diminuição da peroxidação lipídica no córtex e hipotálamo (Figura 15). Provavelmente a diminuição da atividade catalítica da nNOS tenha contribuído para tal efeito.

Olanders et al. (2002) encontraram aumento na expressão de ICAM-1 após 1 e 3 horas de reperusão no cérebro de ratos submetidos à 40 min de isquemia mesentérica, porém não avaliaram se este aumento resultava em maior recrutamento de células PMN. Assim, determinamos a migração de PMN para o SNC por meio da medida da atividade tecidual de MPO. Sob as nossas condições experimentais, não observamos aumento da atividade de MPO nas estruturas encefálicas analisadas (Figura 16).

Embora o NO seja um radical livre, ele próprio não é o suficientemente reativo para provocar morte neuronal. É mais provável que seja a combinação com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, levando à formação de ONOO^- , que conduza à morte celular (Beckman e Koppenol, 1996; Eliasson et al., 1999). ONOO^- não somente nitrosila grupos sulfidrilas, mas também nitra resíduos de tirosina nas proteínas para formar o produto final, a nitrotirosina. A 3-NT constitui um marcador confiável de estresse oxidativo, pois é bastante estável e não é produzida *ex-vivo*, se cuidados são tomados para evitar a formação de NO (que ocorre a partir de nitrito em meio ácido). Desta forma esta espécie tem sido amplamente usada como marcador da geração de ONOO^- na presença de ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Beckman, 1996), embora existam outras fontes de nitração de tirosina em sistemas biológicos, tais como, as peroxidases. Nossos resultados não evidenciaram aumento na nitração de proteínas em resíduos de tirosina nas estruturas encefálicas analisadas (Figuras 17-21), duas horas após indução de isquemia mesentérica.

A SOD constitui um sistema enzimático de defesa antioxidante, uma vez que contribui para reduzir o ânion $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o para H_2O_2 e O_2 . Entretanto, esta defesa ocorre somente quando acompanhada de outros sistemas antioxidantes, como a catalase ou glutathione peroxidase, que degradam o H_2O_2 formado. Por exemplo, quando a relação SOD/catalase aumenta, o H_2O_2 gerado pode reagir com o ferro livre e produzir o radical $OH^{\bullet}$, contribuindo para o dano oxidativo. Isto pode ser exemplificado no trabalho de Barichello et al. (2006), os quais verificaram, após 6 h da indução de sepse, que os ratos apresentavam diversos sinais de encefalopatia associada a alterações no estado oxidativo de várias estruturas encefálicas, sendo que uma maior atividade da SOD/catalase foi a responsável, pelo menos em parte, pelo aumento de TBARs observado naquelas estruturas. O balanço SOD/catalase foi restabelecido nas 12-96 h seguintes à indução da sepse, juntamente com a normalização da peroxidação lipídica. Embora no nosso estudo não avaliamos a atividade catalítica da SOD, encontramos uma diminuição na expressão protéica da SOD1 no hipotálamo e hipocampo (Figura 24), que poderia a princípio, significar um sinal de menor proteção antioxidante nessas regiões. Entretanto, nossos resultados encontrados para 3-NT, MPO e TBARs nessas estruturas não evidenciaram sinais de dano neuronal. Novamente, a interpretação de que uma menor produção de SOD1 reflita em dano oxidativo só deve ser dada frente à análise de outros sistemas de defesa antioxidante, que agem em conjunto com a SOD para o controle dos efeitos deletérios.

Concluimos que embora o aumento de expressão gênica de nNOS no córtex e de COX-2 no hipotálamo, bem como a diminuição da expressão protéica de SOD1 no hipotálamo e hipocampo, sugiram distinto padrão de susceptibilidade aos efeitos deletérios da IRI experimental, o SNC parece apresentar mecanismos eficientes de defesa a curto prazo contra o dano oxidativo, uma vez que nas primeiras 2 horas de reperfusão foi observada diminuição da atividade catalítica da nNOS no sistema límbico, e nenhuma evidência de aumento na nitração de proteínas em resíduos de NT, migração de PMN ou aumento da peroxidação lipídica. O distinto padrão de resposta nas estruturas analisadas pode refletir sua participação diferencial nos mecanismos de controle da homeostasia frente a agentes agressores do meio-ambiente (interno ou externo), uma vez que COX-2 e NO desempenham funções fisiológicas centrais. Entretanto, a possibilidade de que essas alterações não reflitam somente um mecanismo de defesa, mas um estado de transição entre

homeostase e patogenia também poderia ser uma questão a ser colocada sob reflexão, principalmente em tempos subseqüentes de reperfusão. Por exemplo, desde que o NO está envolvido na cognição, aprendizagem e memória, variações na via da arginina-NO decorrentes da IRI poderiam refletir em alterações cognitivas e no *status* mental de pacientes, representando significação clínica naqueles com risco de dano neurológico.

3 CONCLUSÕES GERAIS

Embora o estresse represente um sinal de alarme do organismo frente a ameaças provenientes do meio ambiente interno e/ou externo, seus efeitos sobre o sistema imunológico e SNC são dúbios e estão relacionados a inúmeros fatores, tais como tipo de estresse, sua duração e frequência e habilidade de adaptação do organismo frente a tal estímulo. Neste sentido, o estresse pode tanto agravar como suprimir o curso de diversas enfermidades humanas. Diversos modelos animais de doenças autoimunes e inflamatórias tem contribuído para a elucidação dos mecanismos envolvidos nos efeitos divergentes do estresse.

No Capítulo 1 investigou-se o efeito modulatório do ECI sobre o curso clínico da EAE em ratos Lewis. Os resultados mostraram que o ECI agravou os sinais clínicos da doença, independentemente de seu momento de exposição. Entretanto, os níveis de CORT durante o desenvolvimento dos sinais clínicos da doença pareceram depender unicamente do desafio imunológico. Posteriores investigações são necessárias para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos permissivos do estresse.

No Capítulo 2, investigou-se o efeito modulatório da IRI sobre o SNC, dando notoriedade principal à via da arginina-NO. De acordo com os resultados encontrados, as estruturas encefálicas analisadas parecem apresentar padrões distintos de susceptibilidade/defesa em curto prazo contra o prejuízo oxidativo. Entretanto, os efeitos da IRI sobre o SNC em tempos subsequentes de reperfusão necessitam ser investigados, no sentido de esclarecer se as alterações observadas representam uma resposta de defesa ou um estado de transição entre homeostase/patogenia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman KD, Stover A, Heyman R, Anderson BP, Houck PR, Frank E, Rabin BS, Baum A. Relationship between cardiovascular reactivity, stressful life events, and multiple sclerosis disease activity. *Brain Behavior Immun.* 2003;17:141-151.

Antonovsky A, Leibowitz U, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Reappraisal of possible etiologic factors in multiple sclerosis. *Am J Public Health Nations Health.* 1968;58:836-48.

Augusto O. *Radicais livres: bons, maus e naturais.* São Paulo: Oficina de Textos; 2006. 120 p.

Baretz RM, Stephenson GR. Emotional responses to multiple sclerosis. *Psychosomatics.* 1981;22:117-9.

Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2006; 34:886-9.

Barreto RL, Correia CR, Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim Nova.* 2005; 28:1046-54.

Bateman A, Singh A, Kral T, Solomon S. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev.* 1989;10:92-112. Review.

Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1996; 9:836-44.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271:1424-37.

Benacerraf B. Role of MHC gene products in immune regulation. *Science.* 1981;212:1229-1238.

Bindon C, Czerniecki M, Ruell P, Edwards A, McCarthy WH, Harris R, Hersey P. Clearance rates and systemic effects of intravenously administered interleukin-2 (IL-2) containing preparations in human subjects. *Br J Cancer.* 1983;47:123-33.

Bolton CF, Young GB, Zochodne DW. The neurological complications of sepsis. *Ann Neurol.* 1993; 33:94-100.

De acordo com: **International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references.** Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Bose R, Sutherland GR, Pinsky C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochem Res.* 1989; 14:217-220.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78:206-9.

Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C. L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Jul 5;70:231-41.

Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol.* 1995; 355:296-315.

Breder CD, Saper CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res.* 1996; 713:64-69.

Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 1991; 7:615-24.

Bukilica M, Djordjevic S, Maric I, Dimitrijevic M, Markovic BM, Jankovic BD. Stress-induced suppression of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Int J Neurosci.* 1991;59:167-75.

Buljevac D, Hop WC, Reedeker W, Janssens AC, van der Meche FG, van Doorn PA, Hintzen RQ. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis: prospective study. *BMJ* 2003; 327: 646.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8:766-75.

Calcina F, Barocelli E, Bertoni S, Furukawa O, Kaunitz J, Impicciatore M, Sternini C. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. *Neuroscience.* 2005; 134:39-49.

Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA, Scaff M. The prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand.* 2001;104:208-13.

Calogero AE, Sternberg EM, Bagdy G, Smith C, Bernardini R, Aksentijevich S, Wilder RL, Gold PW, Chrousos GP. Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats: in vivo and in vitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of corticotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 1992;55:600-8.

Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Endothelial cells of the brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin - 1 β : a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res*. 1996; 733:263-72.

Caplan MS, MacKendrick W. Necrotizing enterocolitis: a review of pathogenetic mechanisms and implications for prevention. *Pediatr Pathol*. 1993; 13:357-69.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000; 190:255-66.

Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care*. 2003; 9:127-32.

Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996; 27:1124-9.

Charcot JM. Lectures on diseases of the nervous system. London: New Sydenham Society; 1877.

Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci*. 1995; 18:58-60.

Chrousos GP. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: concurrent effects and chronic sequelae. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106:275-91.

Coelho FR, Cavriani G, Soares AL, Teixeira SA, Almeida PC, Sudo-Hayashi LS, Muscará MN, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-Lima W. Lymphatic-borne IL-1 β and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock*. 2007; 28:694-9.

Collaco-Moraes Y, Aspey B, Harrison M, de Belleruche J. Cyclo-oxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16:1366-72.

Correa SG, Rodriguez-Galan MC, Rivero VE, Riera CM. Chronic varied stress modulates experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats. *Brain Behav Immun*. 1998;12:134-48.

Cosentino F, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial function. *Eur Heart J*. 1998; 19 Suppl G: G3-8.

da Silva JA. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;876:102-17; discussion 117-8. Review.

Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:9808-12.

del Rey A, Klusman I, Besedovsky HO. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. *Am J Physiol.* 1998;275:R1146-51.

Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology.* 1997;65:360-8.

Dinkel K, MacPherson A, Sapolsky RM. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J Neurochem.* 2003; 84: 705-16.

Dowdell KC, Gienapp IE, Stuckman S, Wardrop RM, Whitacre CC. Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroimmunol.* 1999;100:243-51.

Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10:359-368.

Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci.* 1999; 19:5910-8.

Elmquist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol.* 1997; 381:119-29.

Ferraz JG, Sharkey KA, Reuter BK, Asfaha S, Tigley AW, Brown ML, McKnight W, Wallace JL. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. *Gastroenterology.* 1997; 113:195-204.

Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Anderson K, Maier SF, Watkins LR. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci.* 2000; 85:49-59.

Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986; 548:47-63.

Greenwood MT, Guo Y, Kumar U, Beausejourns S, Hussain SN. Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238:617-21.

Griffin AC, Lo WD, Wolny AC, Whitacre CC. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by restraint stress: sex differences. *J Neuroimmunol.* 1993;44:103-16.

Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg.* 1999; 229:478-86.

Haglund U, Bergqvist D. Intestinal ischemia - the basics. *Langenbecks Arch Surg.* 1999; 384:233-8.

Hall NJ, Smith VV, Harding B, Pierro A, Eaton S. Intestinal ischemia-reperfusion injury does not lead to acute central nervous system damage. *J Surg Res.* 2005; 129:288-91.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 3 ed. New York: Oxford University Press; 1999.

Hansen MB, Dresner LS, Wait RB. Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. *Physiol Res.* 1998; 47:307-27.

Hansen MK, O'Connor KA, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 β -induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 280:929-34.

Hassoun HT, Kozar RA, Kone BC, Safi HJ, Moore FA. Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress proteins during mesenteric ischemia/reperfusion. *Surgery.* 2002; 132:369-76.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 2003;24:151-80.

Hiki K, Hattori R, Kawai C, Yui Y. Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum. *J Biochem.* 1992; 111:556-558.

Holsboer F, Stalla GK, von Bardeleben U, Hammann K, Muller H, Muller OA. Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls. *Life Sci.* 1988;42:1-5.

Horie Y, Wolf R, Russell J, Shanley TP, Granger DN. Role of Kupffer cells in gut ischemia/reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. *Hepatology.* 1997; 26:1499-505.

Lundbeck Institute. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. CNS Forum [homepage on the Internet]. Denmark: The Lundbeck Institute; 2003. Available from: http://www.cnsforum.com/imagebank/item/HPA_NORM_DPN_3/default.aspx [2008 Mar 06].

Huang FS, Warner BW. Necrotizing enterocolitis: a closer look. *Gastroenterology* 2002; 121:1016-7.

Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995; 15:378-84.

Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol.* 1995; 268:286-92.

Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 1996; 27:1373-80.

Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997; 20:132-9.

Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 1294-9.

Jaffrey SR, Snyder SH. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science.* 1996; 274:774-7.

Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 2002; 73:493-9.

Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiau JA, Groot JA, Perdue MH. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol.* 1998; 1037-44.

Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA, Welch KM. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol.* 1995; 56:127-34.

Koksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergun H, Gurhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg.* 2001; 88:464-8.

Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu ZF, Hanlon C, Dietzschold B. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3024-7.

Kresse AE, Million M, Saperas E, Tache Y. Colitis induces CRF expression in hypothalamic magnocellular neurons and blunts CRF gene response to stress in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 281:1203-13.

Kuroda Y, Mori T, Hori T. Restraint stress suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Brain Res Bull*. 1994;34:15-7.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.

Lana-Peixoto MA, Frota ERC, Campos GB, Botelho CM, Aragão AL, Monteiro L. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. *Multiple Sclerosis*. 2002; 8:38.

Levine S, Strebel R, Wenk EJ, Harman PJ. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by stress. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1962;109:294-8.

Li H, Meininger CJ, Hawker JR Jr, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM Jr, Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280:75-82.

Li YJ, Peng SL, Wan CQ, Cao L, Li YP. Chronic pain impairs spatial learning and memory ability and down-regulates Bcl-2 and BDNF mRNA expression in hippocampus of neonatal rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2005;43:444-8.

Lipp MEN. O modelo quadrifásico do stress. In: Lipp MEN. *Mecanismos Neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas*. 1st ed. Campinas: Casa do Psicólogo Editora Ltda; 2003. p. 17-21.

Lorton D, Lubahn C, Bellinger DL. Potential use of drugs that target neural-immune pathways in the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003;2:1-30. Review.

Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, Ramsay G, Deutz NE. Sepsis: an arginine deficiency state? *Crit Care Med*. 2004; 32:2135-45.

MacPhee IA, Antoni FA, Mason DW. Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenalcorticosteroids. *J Exp Med*. 1989;169:431-45.

MacPherson A, Dinkel K, Sapolsky R. Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. *Exp Neurol*. 2005; 194:376-83.

Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*. 2002;8:323-34.

Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993; 13:355-8.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994; 78:927-30.

Martin R, McFarland HF. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1995;32:121-82. Review.

Mason D, MacPhee I, Antoni F. The role of the neuroendocrine system in determining genetic susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Immunology*. 1990;70:1-5.

Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*. 2000; 47:861-9.

Mayer EA, Craske M, Naliboff BD. Depression, anxiety, and the gastrointestinal system. *J Clin Psychiatry*. 2001; 62 Suppl 8:28-36; discussion 37. Review.

Mayer EA, Collins SM. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*. 2002; 122:2032-48.

Mayr J, Fasching G, Hollwarth ME. Psychosocial and psychomotoric development of very low birthweight infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl*. 1994; 396:96-100.

McEwen, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. *N England J Med*. 1998; 338: 171-9.

Mester M, Tompkins RG, Gelfand JA, Dinarello CA, Burke JF, Clark BD. Intestinal production of interleukin-1 alpha during endotoxemia in the mouse. *J Surg Res*. 1993;54: 584-91.

Meyer TA, Wang J, Tiao GM, Ogle CK, Fischer JE, Hasselgren PO. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery*. 1995; 118:336-42.

Modolell M, Eichmann K, Soler G. Oxidation of N(G)-hydroxyl-L-arginine to nitric oxide mediated by respiratory burst: an alternative pathway to NO synthesis. *FEBS Lett.* 1997;401:123-6.

Molina PE. Neurobiology of the stress response: contribution of the sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in traumatic injury. *Shock.* 2005;24:3-10. Review.

Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1993; 268:14116-24.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42

Monjan AA. Stress and immunologic competence: Studies in animals. In R Ader editor. *Psychoneuroimmunology* (185-225). New York Academic Press; 1981.

Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr.* 2004;134:2820-25.

Munck A, Naray-Fejes-Toth A. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 746: 115-133.

Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 2006; 26:3813-20.

Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T. Temporal profiles of Ca²⁺/calmodulin-dependent and -independent nitric oxide synthase activity in the rat brain microvessels following cerebral ischemia. *Acta Neurochir.* 1994;60: 285-8.

Nagafuji T, Sugiyama M, Muto A, Makino T, Miyauchi T, Nabata H. The neuroprotective effect of a potent and selective inhibitor of type I NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroreport.* 1995; 6:1541-5.

Naitoh Y, Fukata J, Tominaga T, Nakai Y, Tamai S, Mori K, Imura H. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;155:1459-63.

Navarra P, Tsagarakis S, Faria MS, Rees LH, Besser GM, Grossman AB. Interleukins-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. *Endocrinology.* 1991;128:37-44.

Neumann H, Wekerle H. Neural control of the immune response in the central nervous system: Linking brain immunity to neurodegenerative. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*. 1998;57:1-9.

Nisipeanu P, Korczyn AD. Psychological stress as a risk factor for exacerbation in multiple sclerosis. *Neurology* 1993; 43: 1311-1312.

Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*. 1997; 17:2746-55.

Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:10966-71.

Nowicki PT, Nankervis CA. The role of the circulation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*. 1994; 21:219-34.

Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. *J. Pineal Res*. 2002; 34:119-126

Okada D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem*. 1992; 59:1203-10.

Olanders K, Sun Z, Borjesson A, Dib M, Andersson E, Lasso A, Ohlsson T, Andersson R. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock*. 2002; 18:86-92.

Osuka K, Feustel PJ, Mongin AA, Tranmer BI, Kimelberg HK. Tamoxifen inhibits nitrotyrosine formation after reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem*. 2001; 76:1842-50.

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, Takayasu M, Tokuda M, Yoshida J. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22:1098-106.

Ohashi M, Shouzu Y, Arita H. Stress down-regulates experimental allergic encephalomyelitis (EAE) but permits activation and localization of autoreactive V beta 8.2+ T cells. *Int J Neurosci*. 1997;89:177-88.

Patacchioli FR, Angelucci L, Dellerba G, Monnazzi P, Leri O. Actual stress, psychopathology and salivary cortisol levels in the irritable bowel syndrome (IBS). *J Endocrinol Invest*. 2001; 24:173-7.

Postovit LM, Sullivan R, Adams MA, Graham CH. Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation. *Toxicology*. 2005;208(2):235-48.

Pozzilli C, Lenzi GL, Argentino C, Bozzao L, Rasura M, Giubilei F, Fieschi C. Peripheral white blood cell count in cerebral ischemic infarction. *Acta Neurol Scand*. 1985; 71:396-400.

Pratt RTC. An investigation of the psychiatric aspects of disseminated sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1951; 14: 326-336.

Que LG, George SE, Gotoh T, Mori M, Huang YC. Effects of arginase isoforms on NO production by nNOS. *Nitric Oxide*. 2002; 6:1-8.

Rolak LA. Multiple sclerosis. In: Samuels MA, Feske S, editores. *Office Practice of Neurology*. New York: Churchill Livingstone; 1996. P.350-3.

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-Kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem*. 1996; 67: 662-68.

Roosth J, Pollard RB, Brown SL, Meyer WJ 3rd. Cortisol stimulation by recombinant interferon-alpha 2. *J Neuroimmunol*. 1986;12:311-6.

Sadre-Chirazi-Stark M, Sandmeyer P. A herança de Ötzi. *Mente&Cérebro*. 2006; 7:6-11.

Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*. 1997; 28:1283-8.

Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolin M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology*. 1998; 114:640-8.

Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*. 1987;238:522-4.

Saunders PR, Hanssen NP, Perdue MH. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol*. 1997; 273:486-90.

Savas MC, Ozguner M, Ozguner IF, Delibas N. Splenectomy attenuates intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury. *J Pediatr Surg*. 2003;38:1465-70.

Schwartz CE, Foley FW, Rao SM, Bernardin LJ, Lee H, Genderson MW. Stress and course of disease in multiple sclerosis. *Behav Med* 1999; 25: 110-116.

Seres J, Stancikova M, Svik K, Krsova D, Jurcovicova J. Effects of chronic food restriction stress and chronic psychological stress on the development of adjuvant arthritis in male long evans rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;966:315-9.

Sharp BM, Matta SG, Peterson PK, Newton R, Chao C, Mcallen K. Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta. *Endocrinology*. 1989;124:3131-3.

Sirois J, Richards JS. Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem*. 1993; 268:21931-8.

Soderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang PC, MacQueen G, Perdue MH. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283:1257-63.

Sonntag J, Grimmer I, Scholz T, Metze B, Wit J, Obladen M. Growth and neurodevelopmental outcome of very low birthweight infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr*. 2000; 89:528-32.

Sredni-Kenigsbuch D. TH1/TH2 cytokines in the central nervous system. *Int J Neurosci*. 2002;112:665-703. Review.

Stallion A, Kou TD, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002; 105:145-52.

Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest*. 1997;100:2641-7. Review.

Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, Wilder RL. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989a;86:2374-8.

Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989b;86:4771-5.

Sternberg EM, Glowa JR, Smith MA, Calogero AE, Listwak SJ, Aksentijevich S, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res*. 1992;570:54-60.

Swain MG, Le T, Tigley AW, Beck P. Hypothalamic nitric oxide synthase is depressed in cholestatic rats. *Am J Physiol*. 1997; 272:1034-40.

Tache Y, Martinez V, Million M, Rivier J. Corticotropin-releasing factor and the brain-gut motor response to stress. *Can J Gastroenterol*. 1999; 13:18-25.

Tache Y, Martinez V, Million M, Wang L. Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280:173-7.

Teixeira SA, Castro GM, Papes F, Martins ML, Rogerio F, Langone F, Santos LM, Arruda P, de Nucci G, Muscara MN. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002; 99:17-25.

Teixeira, SA, Varriano AA, Bolonheis SM, Muscará, MN. Experimental autoimmune encephalomyelitis: A heterogeneous group of animal models to study human multiple sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2005;2:127-34.

Tobiansky R, Lui K, Roberts S, Veddovi M. Neurodevelopmental outcome in very low birthweight infants with necrotizing enterocolitis requiring surgery. *J Paediatr Child Health*. 1995; 31:233-6.

Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, Chandler C. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an in vitro model. *J Surg Res*. 2000; 88:160-4.

Triadafilopoulos G, Simms RW, Goldenberg DL. Bowel dysfunction in fibromyalgia syndrome. *Dig Dis Sci*. 1991; 36:59-64.

Tsagarakis S, Holly JM, Rees LH, Besser GM, Grossman A. Acetylcholine and norepinephrine stimulate the release of corticotropin-releasing factor-41 from the rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology*. 1988;123:1962-9.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 2002;53:865-71. Review.

Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 1996; 66:143-6.

Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med*. 2001; 7:821-6.

Vernet D, Bonavera JJ, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C. Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology*. 1998; 139:3254-61.

Villas PA, Dronsfield MJ, Blankenhorn EP. Experimental allergic encephalomyelitis and corticosterone studies in resistant and susceptible rat strains. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;61:29-40.

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*. 2003 Nov 15; 376:1-14.

Walsh MC, Kliegman RM, Hack M. Severity of necrotizing enterocolitis: influence on outcome at 2 years of age. *Pediatrics*. 1989; 84:808-14.

Wang Q, Meyer TA, Boyce ST, Wang JJ, Sun X, Tiao G, Fischer JE, Hasselgren PO. Endotoxemia in mice stimulates production of complement C3 and serum amyloid A in mucosa of small intestine. *Am J Physiol*. 1998; 275:1584-92.

Warren W, Warren KG, Cockerill R. Emotional stress and coping in multiple sclerosis (MS) exacerbations. *J Psychosomat Res* 1991; 35:3747.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl:S47-5347-53. Review.

Weldon DT, Maggio JE, Mantyh PW. New insights into the neuropathology and cell biology of Alzheimer's disease. *Geriatrics*. 1997;52:13-6.

Whitacre CC, Dowdell K, Griffin AC. Neuroendocrine influences on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:705-16.

Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001;64:365-91.

Wilckens T, De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today*. 1997;18:418-24.

Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature*. 1984;310:688-91.

Wong ML, Rettori V, al-Shekhlee A, Bongiorno PB, Canteros G, McCann SM, Gold PW, Licinio J. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med*. 1996;2:581-4.

Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res*. 2001; 99:134-41.

Yoshida T, Limmroth V, Irikura K, Moskowitz MA. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994; 14:924-9.

Zalcman S, Richter M, Anisman H. Alterations of immune functioning following exposure to stressor-related cues. *Brain Behav Immun*. 1989;3:99-109.

Zamir O, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Frederick JA, Fischer JE. Effect of sepsis or cytokine administration on release of gut peptides. *Am J Surg.* 1992; 163:181-4.

Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Forstermann U. Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1993; 24:2016-21.

Zhang ZG, Chopp M, Gautam S, Zaloga C, Zhang RL, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* 1994; 654:85-95.

Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1996; 27:317-23.

Zhang ZG, Reif D, Macdonald J, Tang WX, Kamp DK, Gentile RJ, Shakespeare WC, Murray RJ, Chopp M. ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16:599-604.