

Ana Margarida Santos Barros de Areia Losa

# O Papel do Óxido Nítrico, Stress Oxidativo e Excitotoxicidade na Esclerose Múltipla

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Margarida Santos Barros de Areia Losa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2007026849, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 24 de Outubro de 2014.

---

**A aluna**

---

Ana Margarida Santos Barros de Areia Losa

**O tutor**

---

Professor Doutor Rui Manuel Barbosa

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Doutor Rui Manuel Barbosa, pelo apoio e compreensão na elaboração desta monografia.

Agradeço também à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, especialmente à D. Madalena Batista.

## Abreviaturas

APCs - Moléculas apresentadoras de antígenos

Bcl-2 - Cascata inflamatória Bcl-2

EAE - Modelos experimentais autoimunes

EDSS - Escala expandida do nível de incapacidade

EM - Esclerose Múltipla

eNOS - Sintase de óxido nítrico endotelial

Epo - Eritropoietina

GSH - Glutathiona

HLA - Antígenos humanos leucocitários

IL-1  $\beta$  - Interleucina-1-Beta

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-23 - Interleucina 23

INF- $\beta$  - Interferão beta

INF- $\gamma$  - Interferão gama

iNOS - Sintase de óxido nítrico indutível

MAPK - Cascata inflamatória MAPK

MBP - Peptídeo derivado das proteínas básicas de mielina

MPP - Metaloproteinases

MHC - Complexo Major de Histocompatibilidade

mtNOS - Sintase de óxido nítrico mitocondrial

nNOS - Sintase de óxido nítrico neuronal

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

NOS - Sintase de óxido nítrico

NO<sub>x</sub> - Produtos da oxidação do óxido nítrico

Nrf2 - Factor nuclear de transcrição E2

NT - Nitrotirosina

PI3-K/Akt - Cascata inflamatória PI3-K/Akt

RNS - Espécies Reativas de Nitrogénio

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

VCAM - Moléculas celulares de adesão vascular

VLA-4 - Integrina do tipo A 4

## **Resumo**

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa autoimune que provoca a longo prazo disfunção e incapacidade progressiva devido à ocorrência de um processo inflamatório, o qual causa infiltração linfocitária e dano neuronal, em particular nos axónios e mielina.

A doença é desencadeada por uma série de factores, entre os quais: susceptibilidade genética, infeções virais, défice de vitamina D, assim como factores ambientais.

O óxido nítrico (NO) formado pela sintase do óxido indutível (iNOS) é frequentemente detetado nos locais onde decorrem processos inflamatórios, quer por métodos diretos quer através dos produtos resultantes da sua oxidação.

O objetivo desta monografia visa dar ênfase ao papel do NO e seus derivados, designadamente ao peroxinitrito, no processo patológico subjacente à esclerose múltipla. Tal pode ser devido a fenómenos subjacentes a este, tais como o stress oxidativo e a excitotoxicidade. O estudo destes processos, assim como dos seus intervenientes permitirá o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta doença neurodegenerativa.

## **Abstract**

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disorder that causes progressive disability. It is caused by inflammation, which causes lymphocytic infiltration that eventually leads to damage of axons and myelin. It is triggered by a number of environmental factors, genetic susceptibility, viral infection and lack of vitamin D.

Nitric Oxide (NO) is mainly produced by the inducible form nitrite oxide synthase (iNOS), found in tissues where inflammation is occurring. It can be measured directly or indirectly through its oxidation products (NO<sub>x</sub>).

The purpose of this review is to emphasize the role of NO and its oxidation products such as peroxynitrite in the pathological process underlying MS. The study of this process in addition to the oxidative stress and excitotoxicity allow the development of new therapeutic strategies for this neurodegenerative disorder.

## Índice

Abreviaturas.....	4
Resumo .....	6
Abstract .....	7
Índice.....	8
1. Introdução.....	9
2. Etiologia e factores de risco .....	10
2.1. Suscetibilidade Genética .....	11
3. Patogénese e Mecanismos Patofisiológicos .....	12
3.1. Mecanismos Imunológicos.....	13
3.2. Processo Inflamatório associado.....	15
4. O Papel do Óxido Nítrico .....	16
4.1. Stress Oxidativo .....	20
4.2. Excitotoxicidade .....	20
5. Terapêutica.....	21
6. Conclusão .....	25
7. Bibliografia.....	27

## **I. Introdução**

A esclerose múltipla (EM) é considerada uma doença neurodegenerativa crónica progressivamente causadora de incapacidade, que apresenta elevados padrões de heterogeneidade entre os doentes. É uma doença inflamatória auto-imune, caracterizada pela reativação de células específicas antigénicas, ativação da microglia e ainda produção de mediadores citotóxicos, provocando desta forma dano a nível dos neurónios (R. E. Gonsette, 2008).

A sua designação advém da presença de múltiplas lesões inflamatórias causadoras de perda de mielina. Tais lesões apresentam maioritariamente linfócitos-T, em particular os linfócitos T CD8+. Nestas também se encontram linfócitos B assim como plasmócitos, ainda que em menor percentagem (Hans Lassmann, 2013).

A EM é mais frequente entre os jovens adultos, com maior incidência por volta dos 30 anos, afetando de forma mais severa as mulheres na razão de 1.5/1 (Charlette E. Teunissen *et al.*, 2005).

Os factores epidemiológicos causadores de EM têm sido intensamente estudados e exemplos destes podem ser certas características genéticas específicas que, em conjunto com certos factores ambientais podem proporcionar o estímulo desencadeador de EM (Ruth Ann Marrie, 2004).

A prevalência da EM varia geograficamente, sendo elevada no norte da Europa, norte dos Estados Unidos e Canadá, sul da Austrália e Nova Zelândia (>30 por cada 100 000 habitantes), média no sul da Europa, sul dos EUA e norte da Austrália (5-30 por cada 100 00 habitantes) e reduzida na Ásia e na América do Sul (<5 por cada 100 000 habitantes) (Ruth Ann Marrie, 2004).

## 2. Etiologia e factores de risco

A EM pode ser categorizada em três subtipos, de acordo com o decurso da doença: i) EM recidivo-remitente (RR) que apresenta uma prevalência de 45%; ii) EM secundária progressiva (SP) com uma prevalência de 35% e, iii) por fim a EM primária progressiva (PP) com uma prevalência de 20% (Charlette E. Teunissen *et al.*, 2005). Relativamente à fase RR, esta é entendida como uma forma de EM muito recente, em que ainda não houve conversão para uma fase secundária progressiva. Já relativamente à secundária progressiva é tida como uma fase em que já decorreram alguns anos de doença, por outro lado, a PP é entendida como uma forma de EM que não sofreu o normal decurso da doença, uma vez que estes doentes não apresentaram as características usualmente identificadas na fase RR, tendo sido eliminada esta fase. (Alastair Compston *et al.*, 2008).

Há uma série de factores que podem contribuir para o desenvolvimento de EM, aumentando assim o risco desta doença. Por exemplo, infeções por certos vírus, imunizações, stress emocional e físico, clima, dieta e ainda exposição a metais pesados. (Ruth Ann Marrie, 2004).

Vários estudos revelaram um aumento de anticorpos contra antigénios virais nos fluídos cérebro-espinhais de doentes com EM, permitindo a associação entre uma infeção viral e o maior risco de desenvolver esta doença, em particular em infeções decorridas ainda numa fase jovem. Exemplos destes agentes infecciosos são: o sarampo, a rubéola e ainda a família dos vírus do herpes (vírus Epstein Barr, vírus Herpes Simplex 1 e 2, vírus Varicella Zoster e HHV6). De enfatizar ainda relativamente ao vírus Epstein Barr, um vírus ubíquo que apresenta distribuição a nível mundial, que anticorpos contra as suas partículas virais têm sido reportados nos doentes com EM, sendo este um forte fator de risco devido à latência verificada nos linfócitos B. Vários estudos mostraram em doentes com EM a ocorrência de pelo menos uma destas infeções virais numa fase precoce das suas vidas. (Ruth Ann Marrie, 2004; Stephen L. Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). As vacinas também são apontadas como possíveis contribuidoras para o desencadear do estímulo desta doença. Tal é enfatizado num estudo que mostra fenómenos de desmielinização após uma imunização contra a Hepatite B (Ruth Ann Marrie, 2004).

Um outro fator a ter em conta é o da influência da exposição solar, particularmente o papel da vitamina D. Um estudo reportou que indivíduos sujeitos a exposição solar numa fase precoce da vida (6-15 anos) aparentavam um menor risco de desenvolvimento de EM.

Tal é devido ao possível aumento de produção de vitamina D, uma vez que foram já reportadas as vantagens desta em modelos experimentais autoimunes (EAE) (Ruth Ann Marrie, 2004). O estudo *Munger and colleagues* estima que indivíduos com níveis superiores de vitamina D sejam menos suscetíveis ao desenvolvimento de EM. Estes resultados poderão ajudar a compreender as diferenças geográficas no que concerne à prevalência de EM. Em países com elevadas latitudes, os raios UV-B incidem obliquamente, havendo uma maior filtração conduzindo desta forma a uma menor geração de vitamina D o que pode justificar que os países localizados mais a norte tenham uma maior prevalência de EM (Ruth Ann Marrie, 2004; Intersalt, 1998).

Foi também reportado em vários estudos, que doentes com EM tinham sofrido vários episódios adversos nas suas vidas causadores de stress entre 6 meses a 2 anos antes do pico abrupto da doença (Ruth Ann Marrie, 2004). Estes factores anteriormente referidos quando associados a susceptibilidade genética podem atuar como desencadeadores desta doença.

## 2.1. Susceptibilidade Genética

A influência dos fatores genéticos no risco de desenvolvimento desta doença tem sido amplamente estudada, sendo bem conhecido que a carga genética pode também condicionar a severidade da doença (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). A maior evidência da determinação genética na EM vem do papel do gene HLA-DRB1 localizado no cromossoma 6p21. *Oksenberg and Barcellos*, (2005) comprovaram a associação entre risco de EM e a presença do alelo específico DRB1\*1501 (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). Estudos mais recentes afirmam que serão as interações deste complexo HLA-DRB1 que determinarão susceptibilidade ou resistência à EM. Especificamente, o genótipo DRB1\*15/08 eleva o risco de EM, por outro lado a forma DRB1\*15/14 é tida como protetora (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

Segundo o estudo de *Haines et al.*, (1998) o grupo genético HLA é tido como responsável por cerca de 17% - 60% da susceptibilidade genética encontrada na EM (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). O papel desta família de genes HLA sobre o risco de EM relaciona-se com o facto de estes possuírem a capacidade de estímulo de respostas imunes. O alelo específico HLA- DRB1\*1501 apresenta baixa prevalência em África mas, por outro lado surge evidenciado na população Europeia. Acredita-se que nos Europeus ocorreu uma seleção positiva para este alelo e que o mesmo não terá ocorrido para os Africanos, e

que esta apesar de não totalmente esclarecida, se tenha devido a alguma infecção patogénica (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

### 3. Patogénese e Mecanismos Patofisiológicos

A patogénese da EM é devida a um processo inflamatório com conseqüente infiltração linfocitária no SNC que tem como conseqüência os seguintes fenómenos: hiperplasia, desmielinização, perda axonal e ainda dano ao nível dos astrócitos (Gianvito Martino *et al.*, 2002). O início deste processo é então marcado por infiltração linfocitária através da barreira hemato-encefálica. Posteriormente são lançados estímulos que causam uma alteração ao que seria uma resposta fisiológica para uma resposta patológica com envolvimento de citocinas inflamatórias. Este tipo de desregulação celular irá provocar uma resposta imune cerebral. Nos indivíduos portadores de EM verifica-se a ocorrência de filtrados inflamatórios onde há predominância de linfócitos T CD8+ que causam as características placas escleróticas desta doença que apresentam a seguinte distribuição: em redor do corpo caloso e dos ventrículos cerebrais, cortex cerebral, substância branca, nervos ópticos, tronco cerebral e ainda ao longo da espinal medula (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

Após tais eventos levados a cabo pelos linfócitos T e B e ainda por macrófagos, ocorre um estímulo proveniente de citocinas pró-inflamatórias que conduzem a ativação das células da microglia com conseqüente exacerbação do processo imune em decurso. Seguidamente, a microglia ativada provocará indiretamente dano na camada de mielina, uma vez que as unidades mielina-oligodendrócitos serão alvo de opsonização (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). Através do TNF- $\alpha$  é lançada nas superfícies celulares uma sinalização letal através da ligação desta citocina inflamatória. Como conseqüência surgem lesões caracterizadas por perda de mielina e ainda severos danos a nível dos neurónios (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). À medida que se evolui para uma fase progressiva da doença denota-se a presença de tais danos referidos anteriormente com conseqüente aumento lento e radial de tais lesões (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

Os indivíduos portadores de EM apresentam diferentes tipos de lesões. Lesões localizadas na substância branca que podem ser caracterizadas em: lesões clássicas ativas,

lesões de expansão lenta, lesões inativas e ainda zonas denominadas “placas nuvem” onde se detetam fenómenos de re-mielinização. Consoante os danos verificados na mielina podemos aferir se se trata de uma lesão recente, tardia ou inativa. As lesões clássicas ativas são características dos doentes numa fase aguda da doença. Existem ainda lesões corticais que afetam a substância cinzenta e que podem ser sub-caraterizadas em: cortico-subcorticais, pequenas intra-corticais e ainda subpiais, sendo estas muito frequentes numa fase progressiva da doença (Hans Lassmann, 2013). Numa fase inicial da doença são predominantes lesões focais na substância branca e danos reduzidos a nível cerebral e ainda a nível da espinal medula. No entanto, à medida que se avança para um estado progressivo, estes danos tornam-se consistentes devido a uma elevada perda axonal ao nível das lesões desmielinizantes. Tais danos evidenciados a nível focal e difuso nas lesões dos indivíduos portadores de EM terão como consequência final uma demarcada atrofia tanto na substância branca como na cinzenta. Estudos reportaram uma diminuição da espessura do córtex cerebral destes doentes de cerca de 10% (Hans Lassmann, 2013).

*Luchinetti et al.*, (2000) realizou uma série de estudos com indivíduos portadores de EM, que possibilitou agrupar as lesões verificadas nesta doença consoante a sua natureza inflamatória: Padrão I e II que apresentam elevada contagem de macrófagos e linfócitos (em particular os B) e algum nível de re-mielinização, no entanto, no Padrão II é detetada ativação do sistema de complemento, assim como deposição de imunoglobulinas (Ig). Por outro lado, o Padrão III e IV refletem infiltração de linfócitos T, macrófagos contudo, não se verifica ativação do sistema de complemento e não são detetados, neste tipo de lesões sinais de re-mielinização. Nestes últimos padrões apresenta-se muito evidenciada a perda da base da mielina, os oligodendrócitos (David N. Irani, 2005).

### **3.1. Mecanismos Imunológicos**

A EM é uma doença auto-imune caracterizada pelo envolvimento tanto da imunidade celular como da humoral. A imunidade inata é também detetada em todas as fases da doença. Uma resposta mediada pela imunidade celular é no entanto a mais evidente. Estas são desencadeadas devido a estímulos inflamatórios, deixando, desta forma, de haver tolerância imune e observando-se uma resposta extremamente reativa contra os elementos do SNC.

O papel da imunidade celular, especificamente o papel dos linfócitos T foi verificado através da observação de que estes em modelos experimentais autoimunes (EAE) reagem eficazmente contra alguns constituintes da mielina, em particular contra as proteínas básicas da mielina (MBP). Tais linfócitos reativos contra as MBP foram detetados em indivíduos portadores de EM, comprovando-se assim o seu negativo efeito nesta doença. Tal facto foi ainda demonstrado através de um estudo em que se promovia a reação entre um peptídeo derivado das MBP e estes linfócitos T em questão, reportando mais uma vez os efeitos deletérios que estes possuem sobre a mielina (David N. Irani, 2005). Uma hipótese estudada para a ativação destas células T que especificamente reagem com as MBP, é a de que esta seja devida a estímulos provenientes de partículas virais decorrentes de uma infeção viral, uma vez que foi demonstrado *em vitro* que uma série de peptídeos virais possuem regiões “sobreponíveis” de vários locais das MBP, conduzindo, desta forma à ativação destes linfócitos T específicos causadores de dano na mielina (David N. Irani, 2005).

Mais uma vez, através de extrapolação de EAE foi possível aferir, mediante várias conclusões que se relacionam com o facto de serem mais numerosas ou específicas contra certas células alvos de dano na EM, que as principais células responsáveis por este tipo de imunidade celular são os linfócitos T CD8+. De referir ainda que os modelos experimentais autoimunes, assim definidos em 1930 por *Rivers and others* são utilizados como forma de estudo da EM, uma vez que estes apresentam uma série de semelhanças a nível clínico, histológico, imunológico e ainda a nível genético. Estes EAE podem ser estimulados através da imunização com proteínas da mielina ou com os seus derivados peptídeos. Segundo *Steinman e Zamvit*, (2006), estes podem ser caracterizados como um importante modelo a ter em conta aquando do estudo de doenças autoimunes (Stephen L. Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006; David N. Irani, 2005).

Relativamente à imunidade humoral, apesar de menos demarcada, verifica-se que para a plena ocorrência do processo de desmielinização é necessária a atuação desta, com envolvimento dos seguintes grupos celulares, os linfócitos B e ainda os anticorpos. No entanto, o papel desta não se encontra ainda totalmente estabelecido. Ainda assim, foi comprovada, segundo os estudos *Genain et al.*, 1999; *o Connor et al.*, 2005, a existência de anticorpos específicos contra a mielina nas lesões decorrentes da doença em alguns indivíduos portadores de EM. Segundo vários estudos, tais anticorpos poderão causar dano a nível dos axónios e da mielina através dos seguintes mecanismos: opsonização, fixação do

complemento e ainda pela estimulação de células *natural killer* (NK) (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006; David N. Irani, 2005).

Por fim, é importante ainda referir o envolvimento da imunidade inata no processo patogénico da EM, onde os macrófagos desempenham o papel principal, sendo até utilizados como marcadores biológicos de desmielinização, uma vez que se encontram presentes na maioria das lesões decorrentes desta doença. Apesar de não ser claro o mecanismo de ação destes na EM, é apontado através de estudos realizados com EAE, que a sua eliminação sistémica é capaz de travar tal doença. Sabe-se, no entanto, que estes são causadores dos seguintes efeitos, permitindo o conhecimento destes a extrapolação dos seus efeitos deletórios na EM: provocam danos a nível dos oligodendrócitos, possuem capacidade de opsonização de complexos mielina-anticorpo, produzem substâncias causadoras de dano neuronal, libertam mediadores que impedem a comunicação axonal e por fim, como agentes presentes nas doenças causadoras de perda de mielina, co-atuam com os linfócitos, acelerando o seu influxo cerebral (David N. Irani, 2005).

### **3.2. Processo Inflamatório associado**

O processo inflamatório não deve ser entendido apenas como desvantajoso, uma vez que através dele são lançados sinais e estímulos que permitem, entre outras funções, angiogénese e neuroprotecção. Esta sinalização é levada a cabo pelas células do sistema imunitário (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006). Como referido anteriormente o processo patogénico tem o seu início quando os linfócitos ativados se dirigem ao SNC através de ligação a células endoteliais, atravessando posteriormente a barreira hemato-encefálica. Estes, então ativados, especificamente os linfócitos T, que como referido se englobam no principal tipo de imunidade decorrente na EM, apresentam a capacidade de expressão de integrinas, as quais são responsáveis pela ligação destes às células endoteliais ao nível da barreira hemato-encefálica. Em particular, a integrina VLA-4 estabelece ligação com moléculas celulares de adesão vascular (VCAM) que se encontram expressas ao nível do endotélio, com posterior exacerbação do processo inflamatório, uma vez que seguidamente será induzida a produção de citocinas inflamatórias, nomeadamente TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

À medida que os linfócitos T atravessam a barreira hemato-encefálica, tendo como alvo o SNC, revelam a capacidade de expressão de gelatinases, em particular

metaloproteinases (MPP), sendo estas moléculas responsáveis pela lise da lâmina basal ao nível da camada densa do endotélio. Tal advento é importante, na medida em que foi possível a deteção destas moléculas no fluido cérebro-espinal de doentes portadores de EM. Estas MPP, além de tal mecanismo ainda contribuirão para a exacerbação do processo inflamatório em decurso, uma vez que estimularão o TNF-  $\alpha$  (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

Após atravessarem a barreira hemato-encefálica, estes linfócitos T patogénicos são reativados por fragmentos de mielina que atuam como antígenos. O mecanismo através do qual tal ocorre, baseado no estudo *Platten and Steinman, (2005)* é o seguinte: os linfócitos T CD4+ são ativados e marcados como alvo de células apresentadoras de antígenos (APCs), especificamente as CD11c. Tal decorre no espaço perivascular, já os seguintes eventos terão lugar no parênquima celular. Esta reativação irá estimular a libertação de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, irão estimular o grupo molecular CD11b presente na microglia, com conseqüente indução de quimiotaxia e exacerbação do estado de inflamação, detetável ao nível da infiltração de anticorpos, assim como outras proteínas plasmáticas ao nível do SNC. Ambas as moléculas referidas CD11c e CD11b são integrinas e são expressas nos seguintes grupos celulares: neutrófilos, monócitos, células NK e ainda linfócitos B e T. De referir ainda, que especificamente o grupo CD11b+ possui capacidade inflamatória, uma vez que apresenta a capacidade de indução dos seguintes contribuidores inflamatórios: IL-12, IL-23, óxido nítrico (NO) e ainda espécies reativas de oxigénio (Stephen L.Hausser and Jorge R. Oksenberg, 2006).

#### 4. O Papel do Óxido Nítrico

Além da inflamação, processos como o stress oxidativo e a excitotoxicidade podem também funcionar como estímulos de EM. Nesta secção pretende-se demonstrar o efeito destes processos, em particular do (NO) como desencadeadores desta doença, especificamente os produtos resultantes da sua oxidação, denominados NO<sub>x</sub>.

Desde o final dos anos 80 que é reconhecido o papel do NO nas doenças neurodegenerativas, em particular na EM. Em condições fisiológicas em que o NO desempenha uma função vasodilatadora e facilitadora da transmissão sináptica, este é produzido em muito baixa concentração na ordem de nanomolar pelas sintases do NO

(NOS): a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS). Este processo é dependente do cálcio por ligação à calmodulina, que entra no terminal pós-sináptico através dos recetores NMDA. No entanto, em condições patológicas, em particular no processo inflamatório, o NO é produzido em grande concentração na ordem de micromolar pela sintase indutível do NO (iNOS), sendo este um processo independente do cálcio. Sabe-se também que existe uma forma de NOS mitocondrial (mtNOS), contudo informação detalhada acerca desta ainda não se encontra totalmente estabelecida (Guy C. Brown and Vilmante Borutaite, 2002; Kenneth J. Smith and Hans Lassmann, 2002; Rui M. Barbosa *et al.*, 2008).

Têm sido particularmente difícil o estudo do NO tanto *in vitro* como *in vivo* pelo facto de ser produzido em baixas concentrações, por apresentar um tempo de vida curto na ordem dos segundos e ainda devido à sua reatividade com outras moléculas, tais como o radical superóxido, o grupo tiol e ainda proteínas do grupo heme como a hemoglobina (Rui M. Barbosa *et al.*, 2008).

Os métodos eletroquímicos associados a microelctrodos de fibra de carbono modificados permitem a deteção desta molécula com elevada sensibilidade e seletividade e ainda com elevada resolução espacial e temporal (Kenneth J. Smith and Hans Lassmann, 2002; Rui M. Barbosa *et al.*, 2008).

O NO também apresenta um papel indireto sobre o processo patológico desta doença através de outras espécies reativas de nitrogénio (RNS), sendo exemplo destas: o ião nitroso ( $\text{NO}^-$ ), o ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), o dióxido de nitrogénio ( $\text{NO}_2$ ), e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que resulta da reacção do NO com o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) com um papel importante na EM (Guy C. Brown and Vilmante Borutaite, 2002; Kenneth J. Smith and Hans Lassmann, 2002).

O NO é uma molécula sinalizadora ubíqua e atua também como imunomodulador sendo induzido por macrófagos e ainda pela microglia. Pelo facto de apresentar efeitos benéficos e deletérios têm sido difícil a sua utilização terapêutica (Kenneth J. Smith and Hans Lassmann, 2002).

A reacção do NO e dos seus derivados com outras espécies químicas conduz a vários tipos de danos, entre os quais dano a nível da barreira hemato-encefálica, desmielinização e ainda degenerescência dos axónios com consequente impacto na neurotransmissão (Guy C. Brown and Vilmante Borutaite, 2002; Kenneth J. Smith and Hans Lassmann, 2002).

A presença do NO nas lesões características de EM, assim como a sua deteção no fluído cérebro-espinal, sangue e urina de indivíduos portadores de EM foi já demonstrada através de EAE utilizando como método a ressonância paramagnética de electrão (Kenneth J. Smith and Hans Lassmann, 2002).

A sua produção na inflamação é devida ao estímulo provocado pelos macrófagos ativados que são capazes de induzir uma série de citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 $\beta$  e INF- $\beta$ , sendo que estas apresentam a capacidade de estimular a iNOS com consequente produção de NO. Sabe-se que esta produção é exacerbada através da estimulação de outras citocinas inflamatórias características do processo inflamatório, tais como: TNF- $\alpha$ , linfotoxina e ainda IL-10. É então esta evidência de que a produção do NO por macrófagos e células da microglia resulta do envolvimento de citocinas inflamatórias também envolvidas na EM que permite estabelecer a sua conexão com o mecanismo patológico da EM (Alexandre I. Danilov *et al* 2003; David O. Willenborg *et al.*, 2007; M. P. Sherman *et al.*, 1992).

Num estudo onde se pretendia detetar a presença dos metabolitos do NO, especificamente o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, no soro de indivíduos portadores de EM, comparando os valores obtidos destes com os de um grupo controlo, avaliaram 23 doentes com idades compreendidas entre os 20 e 68 anos (m= 37), apresentando uma proporção mulher/homem de 17/6 e uma escala EDSS (0.0- 7.0) de 1.28 (B. Nazliel *et al.*, 2002). Foram obtidos os seguintes resultados: 43  $\mu$ M para os portadores da doença e 23  $\mu$ M para o grupo controlo, o que demonstra um claro aumento dos metabolitos do NO nos indivíduos portadores de EM. Não foi contudo possível estabelecer uma relação entre estes e a escala expandida do nível de incapacidade (EDSS), a duração da doença e ainda detetar temporalmente as recidivas observadas nestes doentes. Estes resultados não foram, no entanto concordantes com os obtidos no estudo *Bustos et al.*, apontando-se tais diferenças à dieta dos doentes em estudo e à terapêutica (B. Nazliel *et al.*, 2002).

Num outro estudo avaliou-se também a presença dos produtos de oxidação do NO, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no fluído cérebro-espinal e plasma de indivíduos portadores de EM comparando os resultados obtidos aos de um grupo controlo (Alexandre I. Danilov *et al.*, 2003). No entanto, neste estudo houve categorização dos 61 doentes em três grupos ilustrativos das fases de EM: grupo exacerbativo ou agudo, grupo remitivo e ainda o grupo secundário progressivo. Os resultados detetáveis através do fluído cérebro-espinal demonstraram o seguinte: qualquer um dos três grupos revelou valores elevados de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e

$\text{NO}_3^-$  quando em comparação aos valores obtidos através do grupo controlo e não foi detetável uma diferença explícita entre os valores dos grupos remitivo (15.2  $\mu\text{M}$ ) e secundário progressivo (14.9  $\mu\text{M}$ ). No entanto, uma diferença consistente foi analisada no grupo exacerbativo (17.3  $\mu\text{M}$ ), comprovando-se desta forma que nesta fase ocorre uma inflamação mais demarcada com conseqüente produção de tais intervenientes. Quanto aos resultados detetáveis através da análise do plasma, estes revelaram valores normais. Neste estudo também não foi possível obter uma relação entre a duração da doença, a escala EDSS, a idade e o género (Alexandre I. Danilov *et al.*, 2003).

É importante ainda referir o papel do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), produto resultante da reação entre o NO e o  $\text{O}_2^-$ , num processo potenciador da toxicidade do NO, uma vez que a subsequente protonação do peroxinitrito permitirá a formação de (HOONO), composto com elevado poder oxidante. A formação do peroxinitrito ocorre em locais onde está presente inflamação, sendo os intervenientes o superóxido induzido por macrófagos característicos das lesões de EM e ainda o NO através da iNOS que, como referido anteriormente, também é expressa em locais onde domina inflamação, como se verifica nas lesões de EM. Tal produção de peroxinitrito terá como consequência o dano celular. Uma vez que este apresenta um tempo de vida de tal forma reduzido que torna praticamente impossível a sua quantificação, recorre-se à identificação da nitrotirosina (NT), resultante do facto de o peroxinitrito nitrar resíduos de tirosina (R. E. Gonsette, 2008; Anne H. Cross *et al.*, 1998). Foi evidenciada segundo Ding *et al.*, (1997), a formação de peroxinitrito através da microglia e dos astrócitos em casos de inflamação, com a atuação do estímulo proveniente de citocinas inflamatórias, nomeadamente IL-1  $\beta$  e INF- $\gamma$ .

Com base no estudo realizado por A.H. Cross *et al.*, (1998) foi possível verificar a ação do peroxinitrito através da quantificação de dois dos seus derivados: a nitrotirosina e o nitrato (este resultante da decomposição do peroxinitrito protonado). No primeiro teste utilizou-se um método imunohistoquímico para determinar a NT, usando partes do SNC obtidas de autópsias de 9 doentes, comparando-se os resultados obtidos a um grupo controlo contendo cinco elementos. Foi detetada NT em 6 das 9 amostras. Já o segundo teste tinha então como objectivo a deteção de  $\text{NO}_3^-$  no fluído cérebro-espinal de 30 indivíduos portadores de EM em comparação com um grupo controlo que englobava 48 indivíduos. Demonstrou-se um consistente aumento do nitrato nos portadores de EM. Através deste estudo foi então possível evidenciar a associação do peroxinitrito a estados inflamatórios, concretamente na EM.

#### 4.1. Stress Oxidativo

O oxigénio é uma molécula essencial e vários dos seus metabolitos poderão permitir a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) tais como: o anião superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidróxilo (OH $\cdot$ ) e ainda o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Estas são suscetíveis de causar dano, através da sua reação com o NO, com consequente obtenção de moléculas prejudiciais detetáveis nas lesões de EM (Gerty Schreibelt, 2007). Se a velocidade de formação destas espécies ultrapassar a proteção conferida pelos mecanismos antioxidantes, então estamos perante stress oxidativo, que através dos seus mediadores é capaz de desencadear EM (Mary A. Robinson *et al.*, 2011).

De forma a tentar combater estas espécies danosas existem estratégias protetoras que englobam agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A deteção de moléculas reguladoras destes mecanismos no tecido cerebral de doentes com EM permitiu o conhecimento de que o stress oxidativo poderá ser estimulador de tal doença. Em particular, foram detetadas as seguintes moléculas: fator nuclear de transcrição E2 (Nrf2) e ainda elementos de resposta a agentes antioxidantes denominados estes de ARE. Segundo os estudos Gilgun-Sherki *et al.*, (2004); Van Meeteren *et al.*, (2005), a elevada quantidade de ROS em indivíduos portadores de EM poderá ser devida ao facto de nestes a proteção antioxidante não funcionar em pleno. Schreibelt *et al.*, (2006); Van der Goes *et al.*, (2006) referem que num estágio inicial da doença, as ROS podem ser promotoras de anomalias ao nível da barreira hemato-encefálica e consequente aumento do influxo linfocitário. Já a nível cerebral estas espécies decorrentes do metabolismo do  $O_2$  podem promover os característicos danos detetáveis na EM, ou seja, danos a nível da mielina e dos axónios. (Gerty Schreibelt, 2007).

#### 4.2. Excitotoxicidade

O glutamato é o neurotransmissor responsável pela condução da maioria dos processos excitatórios a nível cerebral. No entanto, uma sobre-exposição a este desencadeará episódios de excitotoxicidade e neurodegenerescência. Os estudos de Bliss e Colinrigridge, (1993); Dawson and Dawson, (1998); Dawson *et al.*, (1991) evidenciaram o efeito de excitotoxicidade do glutamato. Através de EAE foi possível demonstrar o efeito que a excitotoxicidade apresenta sobre a EM, na medida em que o bloqueio de recetores específicos do glutamato, nomeadamente os recetores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e AMPA/Kainate, proporcionou uma diminuição na neurodegenerescência. Além desta

evidência foi também detetado, dano nos terminais glutamérgicos em lesões decorrentes de EM. O aumento da concentração de glutamato é devido à ocorrência de uma desregulação no seu ciclo (Glutamato-Glutamina) resultante de uma série de fenómenos patológicos (Gerty Schreibelt, 2007).

## **5. Terapêutica**

O facto de a EM apresentar elevada heterogeneidade no que concerne ao seu decurso e à sua histopatologia torna a sua abordagem terapêutica bastante complexa. A opção terapêutica mais vantajosa é a que combina uma ação anti-inflamatória com uma proteção contra a neurodegenerescência (Jeffrey A. Cohen, 2009).

Existem atualmente seis opções terapêuticas aprovadas para o tratamento da EM: três preparações de INF- $\beta$  e o acetato glatirâmico utilizados em primeira linha, o natalizumab e a mitoxantrona, que devido a questões relativas à sua segurança são reservados para um tratamento de 2ª linha. É no entanto importante referir que nenhuma destas opções permite a cura desta doença, sendo que estas opções terapêuticas não são efectivas em todos os indivíduos portadores de EM. É então extremamente importante o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Jeffrey A. Cohen, 2009).

O INF- $\beta$  é um membro do tipo I da família do interferão e este traduz-se no agente terapêutico mais frequentemente utilizado na EM, sendo eficaz no controlo das exacerbações que se observam na fase recidivo-remitente. O seu mecanismo baseia-se nos seguintes fenómenos: antagonização da sobre-regulação mediada pela associação do INF- $\gamma$ -Complexo MHC nas células apresentadoras de antígenos, modificação da expressão de citocinas, modulação de mecanismos apoptóticos e ainda bloqueio da condução ao nível do endotélio, proporcionando assim uma redução das recidivas, das lesões detetáveis através de Ressonância Magnética e, por fim, permite ainda um abrandamento da incapacidade verificada a longo prazo. O INF- $\beta$  apresenta no entanto vários efeitos adversos, tais como: sintomas semelhantes aos sentidos durante uma gripe, alterações no ciclo menstrual, aumento de fenómenos de espasmos e ainda reações cutâneas (Jeffrey A. Cohen, 2009).

Relativamente ao acetato glatirâmico, este é um polímero molecular que mimetiza as proteínas básicas da mielina e é sabido que este, pelo facto de alterar a expressão de citocinas, de promover a saturação do grupo MHC e de suprimir células T, favorece a diferenciação e maturação de precursores neurais, contribuindo para uma redução da

neurodegenerescência, forte causadora de disfunção e incapacidade na EM (Jeffrey A. Cohen, 2009).

No que se refere a uma das opções utilizadas como tratamento de 2ª linha, o anticorpo monoclonal natalizumab, apesar de demonstrar uma elevada taxa de eficácia, apresenta alguns efeitos adversos graves, uma descontinuação no seu uso provoca um agravamento do processo inflamatório, assim como um aumento da desmielinização das lesões (Marcus Zulian Teixeira, 2013).

Uma outra abordagem seria a combinação terapêutica com a finalidade de obtenção de um efeito sinérgico, utilizando fármacos que possuem diferentes mecanismos de ação. Alguns estudos de combinação terapêutica na EM revelaram segurança, tolerabilidade e eficácia, sendo de referir as seguintes associações: acetato glatirâmero e INF-β, acetato glatirâmero e mitoxantrona e, por fim, INF-β e azatioprina (Jeffrey A. Cohen, 2009).

Estudos em modelos experimentais de autoimunidade (EAE) mostraram que uma estratégia efetiva seria a da utilização de porfirinas de ferro e manganésio que, resumidamente, provocam os seguintes efeitos: previnem a formação do radical carbonato, inibem o processo inflamatório e os mecanismos de morte celular, conferem proteção aos neurónios em condições de excitotoxicidade, diminuem a nitração de proteínas e a oxidação lipídica e, por fim, conferem proteção mitocondrial contra danos provenientes da ação do peroxinitrito, por diminuição dos níveis de glutathiona (GSH) (R. E. Gonsette, 2008).

Relativamente a estes fenómenos, apresentam-se na tabela seguinte os principais alvos terapêuticos para o stress oxidativo e excitotoxicidade.

<u>Principais alvos terapêuticos no stress oxidativo e excitotoxicidade</u>
➤ Stress Oxidativo
Inibidores de precursores de ONOO <sup>-</sup> : iNOS, •NO, O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> , catalisadores OH <sup>-</sup> -peróxinitrito,
Radicais livres derivados do ONOO <sup>-</sup>
Anti-oxidantes naturais: enzimáticos e não enzimáticos
➤ Excitotoxicidade
Recetores NMDA, Antagonistas AMPA/Kainate
Antagonistas do Cálcio
Bloqueadores de Sódio e Potássio

. Tabela adaptada de R.E.GONSETTE et al., 2008

Na tabela seguinte apresenta-se um resumo das opções terapêuticas atualmente em desenvolvimento que apresentaram resultados favoráveis na Fase II dos ensaios clínicos:

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Efeitos Adversos</b>
<b>Formas Parentéricas</b>		
Alumtzumab	Anticorpo Monoclonal Anti-CD-52 Elimina Células B e T	Doença de Graves, infeção
Daclizumab	Anticorpo Monoclonal Anti-CD-25 Antagonista IL-2R	Reação cutânea, infeção
Rituximab	Anticorpo Monoclonal Anti-CD-20 Elimina Células B	Reação devida à infusão do fármaco, síndrome de libertação de citocinas
MBP 8298	Peptídeo derivado das proteínas básicas da mielina. Provoca tolerância imune.	_____
<b>Formas Orais</b>		
Cladribina	Análogo das Purinas Agente Linfocitotóxico	Mielosupressão, infeção
Fingolimod	Derivado da Miriocina Agonista/Antagonista S1PR Modifica a circulação linfocitária	Edema Macular, Hepatotoxicidade
Ácido Fumárico	Imunomodulador	Hepatotoxicidade
Laquinimod	Derivado Roquinimex Imunomodulador	Hepatotoxicidade, pro-inflamação
Minociclina	Inibidor da metaloproteinase da matriz	_____

Oestriol	Imunomodulador	Efeitos a nível vascular
Sinvastatina	Inibidor da HMG-CoA Redutase Imunomodulador	Rabdomiolise, Hepatotoxicidade
Temsirolimus	Análogo da rapamicina Inibidor do ciclo celular	Úlceras nas membranas mucosas, leucopenia, trombocitopenia
Teriflunomida	Inibe a síntese de pirimidinas e a proliferação de células B e T	Hepatotoxicidade, Pancitopenia

Tabela adaptada de JEFFREY A. COHEN (2009)

Uma vez que uma das características da EM é o facto de provocar uma neurodegenerescência muito significativa, uma potencial estratégia neste campo poderá ser a utilização de eritropoietina (Epo), pelo facto de esta já ter demonstrado propriedades neuroprotetoras em algumas doenças neurodegenerativas, pois é capaz de inibir a transdução de uma série de cascatas inflamatórias, tais como: MAPK, Bcl-2 e PI3-K/Akt. De referir ainda que um ensaio realizado em doentes com a forma progressiva de EM, utilizando Epo, revelou uma melhoria nas suas capacidades motora e cognitiva (Muriel B. Sattler, Mathias Bahr, 2010).

Uma outra possível opção, no entanto ainda não sujeita a ensaio clínico, seria a da flupirtina, fármaco aprovado para administração oral no tratamento a longo prazo de doentes que apresentam dor crónica. Este revelou conferir proteção contra a degenerescência neuronal. Tal somado ao facto de apresentar reduzidos efeitos secundários torna-o numa potencial opção para o tratamento desta doença (Muriel B. Sattler, Mathias Bahr, 2010).

A maioria dos antioxidantes não possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e para serem detetáveis os seus efeitos é necessária a administração de uma elevada quantidade. No caso particular da EM, a expressão de enzimas antioxidantes é regulada pelo fator nuclear eritróide (Nrf2). Quando se deteta a presença deste, com consequente ativação de mecanismos antioxidantes, podemos afirmar que está a decorrer stress oxidativo. Poderá então ser uma potencial estratégia terapêutica a criação de

agonistas do Nrf2. Tal encontra-se de momento sob investigação (Gerty Schreibelt et al., 2007).

Uma outra importante abordagem é a que se refere ao ácido úrico. Este não atua diretamente contra o peróxinitrito mas, no entanto, possui a capacidade de inativar os seus radicais livres, especificamente o dióxido de nitrogénio e o radical carbonato. Tal permitirá que estes não atinjam os seus alvos finais, diminuirá a nitração de proteínas, a oxidação lipídica e conferirá ainda proteção ao DNA devido ao stress oxidativo. Além destas ações, há uma inibição da inflamação do SNC e da disfunção da barreira hemato-encefálica, eventos frequentes nesta doença. O ácido úrico reduz ainda a produção de peroxinitrito em consequência da excitotoxicidade provocada pelo glutamato. Estes efeitos referentes ao ácido úrico foram observados em afeções da espinal medula e em isquémia aguda cerebral e acredita-se que este possa também ser vantajoso na EM. De referir ainda que foram detetados elevados níveis de ácido úrico no soro de doentes com EM, que estavam a ser tratados com metilprednisolona, acetato glatirâmico e INF $\beta$ , apontando assim para um efeito benéfico deste. Uma vez que o ácido úrico é degradado no intestino pela uricase, a sua administração oral não é viável, podendo então ser utilizados os seus precursores, a inosina e o ácido inosínico (R.E. Gonsette, 2008).

Uma última referência deve ser feita à possibilidade de transplantação de células hematopoiéticas ou do mesênquima que poderão repopular locais onde ocorreu dano tecidual, através de células de precursores neurais, as quais possuem a capacidade de diferenciação em neurónios maduros, o que permitirá a possibilidade de restauração da função neuronal (Jeffrey A. Cohen, 2009).

## 6. Conclusão

Vários estudos demonstram a presença de NO, assim como dos produtos resultantes da sua oxidação NO $_x$  no SNC de indivíduos portadores de EM, em ambas as fases da doença, recidivo-remitente, assim como na fase progressiva. Estes produtos são formados devido à presença de citocinas envolvidas no processo inflamatório decorrente da EM.

Aprofundar o conhecimento acerca de fenómenos tais como o *stress* oxidativo e a excitotoxicidade e a sua relação com o desenvolvimento de EM irá permitir um melhor

entendimento dos mecanismos patofisiológicos envolvidos, assim como poderá possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Decorrem presentemente vários estudos que têm como alvo o peroxinitrito, uma vez que este se relaciona com ambos os processos referidos anteriormente. Tais estudos englobam factores neuroprotetores, agentes antioxidantes, sendo ainda de referir a possibilidade de transplantação de células hematopoiéticas.

Uma vez que a terapêutica anti-inflamatória habitualmente utilizada nesta doença não permite que se trave a neurodegenerescência observada nestes indivíduos, pretende-se então associar a esta uma estratégia neuroprotetora, uma vez que a neurodegenerescência é uma das principais características da EM que a longo prazo provoca incapacidade grave nos indivíduos portadores desta doença.

## 7. Bibliografia

1. ALASTAIR COMPSTON, ALASTAIR COLES – Multiple Sclerosis. *Lancet* (2008) 372: 1502-17.
2. ALEXANDRE I. DANILOV, MAGNUS ANDERSSON, NASRIN BAVAND, N. PETER WIKLUND, TOMAS OLSSON, LOU BRUNDIN – Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 136 (2003) 112-118.
3. ANNE H. CROSS, PAMELA T. MANNING, RICHARD M. KEELING, ROBERT E. SCHMIDT, THOMAS P MISKO – Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 88 (1998) 45-56.
4. B. NAZLIEL, D. TSKIRAN, C. IRKEC, F. Z. KUTAY, S. POGUN – Serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. *Clinical Study. Journal of clinical neuroscience* (2002) 9 (5), 530-532.
5. CHARLETTE E TEUNISSEN, CHRISTINE DIJKSTRA, CHRIS POMAN – Biological Markers in CFS and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurology* (2005) 4:32-41.
6. DAVID N. IRANI, MD – Review. Immunological mechanisms in multiple sclerosis. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 5 (2005) 257-269.
7. DAVID O. WILLENBORG, MARIA STAYKOVA, SUE FORDHAM, NIKKI O'BRIEN, DAVID LINARES – The contribution of nitric oxide and interferon gamma to the regulation of the neuro-inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 191 (2007) 16-25.
8. GERTY SCHREIBELT, JACK VAN HORSSSEN, SASKIA VAN ROSSUM, CHRISTINE D. DIJKSTRA, BENJAMIN DRUKARCH, HELGA E. DE VRIES – Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Research Reviews* 56 (2007) 322-330.
9. GIANVITO MARTINO, LUCIANO ADORINI, PETER RIECKMANN, JAN HILLERT BORIS KALLMANN, GIANCARLO COMI AND MASSIMO FILIPPI – Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *The Lancet Neurology* Vol 1 December 2002.
10. GUY C. BROWN AND VILMANTE BORUTAITE – Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Serial Review: Nitric Oxide in Mitochondria. Free Radical Biology & Medicine*, Vol 33, No 11, pp 1440-1450, 2002.

11. HANS LASSMANN – Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 333 (2013) 1-4.
12. INTERSALT Cooperative Research Group – Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*. 297:6644 (1988) 319-28.
13. JEFFREY A. COHEN – The future of multiple sclerosis treatment. *Journal of the Neurological Sciences* 277, 51 (2009) 555-561.
14. KENNETH J SMITH AND HANS LASSMANN – The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* Vol 1 August 2002.
15. LUCCHINETTI C, BRUCK W, PARIS J SCHEITHAUERB, RODRIGUEZ M, LASSMANN H – Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47:707-17.
16. M. P. SHERMAN, J. M. GRISCAVAGE AND J. IGNARRO – Nitric oxide- mediated neuronal injury in multiple sclerosis. *Medical Hypotheses* (1992) 39, 143-146.
17. MARCUS ZULIAN TEIXEIRA – Immunomodulatory drugs (natalizumab), worsening of multiple sclerosis, rebound effect and similitude. *Homeopathy* (2013), 102, 215-224.
18. MARY A. ROBINSON, JAMES E. BAUMGARDNER, CYNTHIA M. OTTO – Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Free Radical Biology & Medicine* 51 (2011) 1952-1965.
19. MURIEL B. SATTLER, MATHIAS BAHR – Future neuroprotective strategies. *Experimental Neurology* 225 (2010) 40-47.
20. R.E.GONSETTE – Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of the Neurological Sciences* 274 (2008) 48-53.
21. RUI M. BARBOSA, CATIA F. LOURENÇO, RICARDO M. SANTOS, FRANÇOIS POMERLEAU, PETER HUETTL, GREG A. GERHARDT, AND JOAO LARANJINHA – In vivo real time measurement of nitric oxide in anesthetized rat brain. *Methods in Enzymology*, Vol 441, (2008).
22. RUTH ANN MARRIE – Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *The Lancet Neurology* Vol 3 December (2004).
23. STEPHEN L. HAUSSER AND JORGE R. OKSENBERG – The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron* 52, 61-76, Octobe 5, (2006).

