



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SAYONARA RANGEL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E FATORES DE  
RISCO CARDIOVASCULAR EM PACIENTES COM  
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

---

Londrina  
2012

SAYONARA RANGEL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E FATORES DE  
RISCO CARDIOVASCULAR EM PACIENTES COM  
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

Orientador(a): Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Co-orientador(a): Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

O48a Oliveira, Sayonara Rangel.  
Avaliação do estresse oxidativo e fatores de risco cardiovascular em pacientes com esclerose múltipla / Sayonara Rangel Oliveira. – Londrina, 2012.  
78 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.  
Dissertação (Mestrado Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Citocinas – Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616-004

SAYONARA RANGEL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E FATORES DE RISCO  
CARDIOVASCULAR EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa Dra. Edna Maria Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra Doralina Guimaraes Brum Souza  
Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

---

Prof. Dr. Isaías Dichi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 abril de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, à Deus pela força, coragem e inspiração para realização deste trabalho.

À minha família, principalmente aos meus pais, que acreditaram no meu potencial e não mediram esforços para que eu continuasse a estudar, apoiando minhas escolhas profissionais. Agradeço meu companheiro Anderson Cazarin pela paciência, compreensão e incentivo à carreira docente.

De maneira muito especial, à minha orientadora Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche pela disponibilidade e constante dedicação em me orientar, e acima de tudo, pela amizade construída ao longo desses anos.

À Professora Dra. Andréa Name Colado Simão pela confiança desde o início de realização deste trabalho e pela ativa colaboração neste projeto.

Ao Professor Dr. Damácio Ramon Kaimen-Maciel pelo incentivo e apoio ao desenvolvimento das pesquisas, atuando como facilitador direto de conclusão deste trabalho.

À todos os demais participantes da nossa equipe de trabalho: Ana Paula Kallaur, Professora Elaine Regina Delicato de Almeida e Professora Helena Kaminami Morimoto, Josiane Lopes e Larissa Muliterno que contribuíram para a realização deste trabalho.

Oliveira, Sayonara Rangel. **Avaliação do estresse oxidativo e fatores de risco cardiovascular em pacientes com esclerose múltipla**. 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

Esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante, imuno-mediada, caracterizada por processo inflamatório crônico que afeta o sistema nervoso central e o estresse oxidativo têm sido implicado na patogênese da doença. Além disso, alterações metabólicas foram observadas em pacientes com EM como dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina (RI), considerados importantes fatores de risco cardiovascular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo, fatores de risco cardiovascular e mediadores inflamatórios em pacientes com EM e verificar a correlação entre estes marcadores e a progressão da doença. Foram avaliados 134 pacientes com EM atendidos no Ambulatório de Neurologia do Hospital de Clínicas, Londrina, Paraná, Região Sul do Brasil. A gravidade da EM foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS). O grupo controle foi composto por 196 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. Em todos os indivíduos, os parâmetros idade, gênero, etnia, tabagismo e índice de massa corporal (IMC) foram controlados. O estresse oxidativo foi avaliado pela formação de hidroperóxidos lipídicos iniciada por t-butil, dosagem de proteínas carbonílicas, determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), dosagem do grupamento sulfidrila de proteínas e capacidade antioxidante total do plasma (TRAP). Os marcadores bioquímicos avaliados foram os níveis séricos de ácido úrico, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, níveis plasmáticos de glicose e insulina. A RI foi avaliada pelo índice *homeostasis model assessment* (HOMA), sendo detectada quando HOMA-IR  $\geq 2,5$ . Níveis séricos das citocinas inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) foram determinados por ensaio imunoenzimático. Pacientes com EM apresentaram níveis plasmáticos aumentados de hidroperóxidos lipídicos ( $p < 0,0001$ ), proteínas carbonílicas ( $p = 0,0217$ ) e diminuídos de NOx ( $p < 0,0001$ ), grupamento sulfidrila de proteínas ( $p = 0,0004$ ) e TRAP ( $p = 0,0001$ ) quando comparados com o grupo controle. Uma correlação positiva foi obtida entre os níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos e os valores de EDSS ( $r = 0,212$ ,  $P = 0,014$ ) e entre proteínas carbonílicas e EDSS ( $r = 0,221$ ,  $p = 0,035$ ). Os níveis séricos de ácido úrico não diferiram entre os grupos ( $p = 0,115$ ). Pacientes com EM mostraram níveis séricos elevados de colesterol total ( $p = 0,005$ ), LDL-colesterol ( $p = 0,003$ ), triglicerídeos ( $p = 0,003$ ) e diminuídos de HDL-colesterol ( $p = 0,038$ ) comparados ao grupo controle. Níveis plasmáticos de glicose não diferiram entre os indivíduos ( $p = 0,426$ ); entretanto, pacientes com EM apresentaram níveis mais elevados de insulina ( $p < 0,0001$ ), HOMA-IR ( $p < 0,0001$ ) do que os controles, além de uma frequência de RI de 2,8 vezes maior nos pacientes com EM que no grupo controle (*odds ratio*: 2,781; intervalo de confiança de 95%: 1,723-4,801,  $p < 0,0001$ ). Pacientes com EM também apresentaram aumento da pressão arterial diastólica ( $p = 0,005$ ) e dos níveis séricos das citocinas IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$  ( $p = 0,0009$ ,  $p = 0,0377$ ,  $p = 0,0379$ , respectivamente) em relação aos controles. Os resultados

sugerem o envolvimento do processo inflamatório crônico mediado pelas citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo na fisiopatologia de progressão da EM. Estas alterações imunológicas e metabólicas, podem explicar, em parte, a maior prevalência de RI e aumento do risco cardiovascular nestes pacientes. Futuras pesquisas são necessárias para confirmar o envolvimento do estresse oxidativo na doença e considerar este componente fisiopatológico como possível alvo terapêutico no tratamento de pacientes com EM. As alterações metabólicas observadas reforçam a importância da monitorização destes marcadores metabólicos em pacientes com EM, para prevenir e/ou tratar futuras comorbidades cardiovasculares que podem estar relacionadas à progressão da doença. Além disto, aponta para a necessidade de desenvolvimento de pesquisas para identificação de novos biomarcadores que se correlacionem com a atividade e progressão da doença.

**Palavras-chave:** Esclerose múltipla. Estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio. Resistência à insulina. Inflamação. Citocinas.

Oliveira, Sayonara Rangel. **Evaluation of oxidative stress and cardiovascular risk factors in multiple sclerosis patients**. 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating, immune-mediated disease, characterized by chronic inflammatory process of the central nervous system. Studies indicate that oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of MS and reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) have been implicated as mediators of demyelination. Biochemical changes were also observed in MS patients such as dyslipidemia, hypertension, and insulin resistance (IR), considered important cardiovascular risk factors. The aim this study was to evaluate oxidative stress, biochemical biomarkers and inflammatory mediators in MS patients and to verify the correlation between these biomarkers with the progression of disease. The study enrolled 134 MS patients from the Neurology Outpatient of the Outpatient Clinical Hospital, Londrina, Paraná, Southern Brazil. The severity of MS was evaluated by the Expanded Disability Status Scale (EDSS). The control group was composed by 196 healthy individuals, blood donors from Regional Blood Bank of Londrina. The individuals were age, gender, ethnicity, smoking, and body mass index (BMI) controlled. The oxidative stress biomarkers evaluated were t-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, carbonyl protein content, measurement of nitric oxide metabolites (NOx), sulfhydryl groups of protein, and plasma total antioxidant capacity (TRAP). Biochemical serum biomarkers evaluated were uric acid, total cholesterol, low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL), triglycerides, plasma levels of glucose, and insulin. IR was evaluated by *homeostasis model assessment* (HOMA) and was detected when HOMA-IR  $\geq 2.5$ . The inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 17 (IL-17), and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) were assayed by enzyme-linked immunoassay. MS patients had higher plasma levels of lipid hydroperoxide ( $p < 0.0001$ ), carbonyl protein ( $p = 0.0217$ ), and lower plasma levels of NOx ( $p < 0.0001$ ), TRAP ( $p = 0.0001$ ), and sulfhydryl group of proteins ( $p = 0.0004$ ) than controls. There was a positive correlation between plasma levels of hydroperoxide lipid and EDSS values ( $r = 0.212$ ,  $p = 0.014$ ) and between carbonyl protein and EDSS ( $r = 0.221$ ,  $p = 0.035$ ). Serum uric acid levels did not differ among the individuals ( $p = 0.115$ ). In relation to biochemical biomarkers, MS patients showed higher serum levels of total cholesterol ( $p = 0.005$ ), LDL-cholesterol ( $p = 0.003$ ), triglycerides ( $p = 0.003$ ), and lower HDL-cholesterol ( $p = 0.038$ ) than controls. Plasma levels of glucose did not differ among the individuals ( $p = 0.426$ ); however, MS patients showed higher values of insulin ( $p < 0.0001$ ) and HOMA-IR ( $p < 0.0001$ ) than controls, and had 2.78 times more chances for developing IR than control group (*odds ratio*: 2.781, 95% confidence interval 1.723-4.801,  $p < 0.0001$ ). In addition, MS patients showed higher diastolic blood pressure than controls ( $p = 0.005$ ), and higher serum levels of IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$  than controls ( $p = 0.0009$ ,  $p = 0.0377$ ,  $p = 0.0379$ , respectively). These results suggest that inflammatory processes and oxidative stress play an important role in the pathophysiology and progression of MS and could explain, in part, the high IR prevalence and cardiovascular risk factor in these patients. Further researchs are needed to underscore the involvement of oxidative stress in disease and consider this

component as a possible pathophysiological therapeutic target in the treatment of MS patients. The metabolic changes observed in MS patients underscore the importance of monitoring these biochemical biomarkers in these patients to prevent and/or to treat further cardiovascular comorbidities that may be related with disease progression. Moreover, the study shows that new researches should be developed to identify new biomarkers that correlate with the activity and progression of the disease.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Oxidative stress. Reactive oxygen species. Insulin resistance. Inflammation. Cytokines.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHC	Ambulatório do Hospital das Clínicas
BHE	Barreira hematoencefálica
CIS	Síndrome Clinicamente Isolada
CL-LOOH	<i>T-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i>
DTNB	Ácido 2,2 ditiobisnitrobenzóico
EAE	Experimental Allergic Encephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Scale Score</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Esclerose Múltipla
EM-PP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EM-PR	Esclerose Múltipla Progressiva Recidivante
EM-RR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
EM-SP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i>
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IFN- $\beta$	Interferon beta
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MBP	Proteína básica da mielina
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MOG	Glicoproteína de oligodendrócitos associados à mielina
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
QL	Quimioluminescência
RI	Resistência à insulina

SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TRAP	<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares
VLA4	<i>Very late antigens 4</i> (Antígenos muito tardios)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
3.1	DELINEAMENTO.....	23
3.2	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA .....	23
3.3	AMOSTRA .....	23
3.3.1	Critérios de Seleção dos Pacientes com EM.....	24
3.3.2	Critérios de Seleção dos Controles .....	24
3.4	MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	24
3.4.1	Capacidade Antioxidante Total do Plasma ( <i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i> , TRAP) .....	25
3.4.2	Grupamento Sulfidril de Proteínas.....	25
3.4.3	Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por t-butil (CL-LOOH) .....	25
3.4.4	Determinação de Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx).....	26
3.4.5	Determinação de Proteínas Carbonílicas .....	26
3.5	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	26
3.6	CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	27
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	ARTIGO 1: OXIDATIVE STRESS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS IN CLINICAL REMISSION: ASSOCIATION WITH THE EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE .....	29
4.2	ARTIGO 2: INSULIN RESISTANCE AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS ARE ASSOCIATED WITH DISABILITY IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS .....	47

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UEL. ....	74
	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes com Esclerose Múltipla .....	75
	ANEXO C - Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo .....	77
	ANEXO D - Confirmação da submissão do artigo 1 .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

Esclerose Múltipla (EM) é uma doença imuno-mediada, inflamatória crônica e desmielinizante que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) de maneira progressiva (MILO; KAHANA, 2010). Na maioria dos casos, as manifestações iniciais da EM ocorrem entre os 20 e 40 anos de idade, sendo 2 a 3 vezes mais frequente em mulheres e em indivíduos caucasianos (CONFAVREUX et al., 2000). Estima-se que 2,5 milhões de pessoas vivam com EM em todo o mundo (MILO; KAHANA, 2010). No Brasil, sua taxa de prevalência é de, aproximadamente, 15 casos por cada 100.000 habitantes (CALLEGARO et al., 2001; FRAGOSO; PERES, 2007). A etiologia da EM é pouco conhecida, mas sabe-se que é uma doença multifatorial desencadeada pela associação de fatores genéticos e ambientais (MILO; KAHANA, 2010).

As manifestações clínicas da doença são atribuídas ao aparecimento das lesões desmielinizantes e os locais mais comuns para as lesões agudas são o nervo óptico, a medula espinhal, o tronco cerebral e a substância branca periventricular (MILO; KAHANA, 2010). Deste modo, os sintomas mais frequentes da EM são fraqueza de um ou mais membros, distúrbios visuais, distúrbios sensoriais, vertigem ou desmaios, distúrbios vesicais ou intestinais e desordens cognitivas (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008). Para o diagnóstico de EM utilizam-se os critérios definidores descritos inicialmente por Poser (1991), posteriormente, por McDonald et al. (2001) e revisados por Polman et al. (2005).

EM é uma doença heterogênea do ponto de vista clínico e, atualmente, não existem marcadores biológicos ou de imagem que permitam caracterizar, com rigor, a forma clínica de evolução dos pacientes (LUCCHINETTI et al., 2000). A gravidade da doença é avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Scale Status*, EDSS) que é parcialmente baseada em medições de oito áreas do SNC conhecidas como sistemas funcionais, nos quais são avaliados as funções piramidais, tronco cerebral, cerebelar, sensoriais, intestinais, vesicais, cerebrais e visuais (KURTZKE, 1983).

De acordo com a sociedade norte-americana de EM, há quatro formas principais de evolução clínica da doença: remitente-recorrente (EM-RR), secundariamente progressiva (EM-SP), primariamente progressiva (EM-PP) e progressiva recidivante (EM-PR). A forma mais comum é a EM-RR que representa

80% de todos os casos no início da doença. Esta forma clínica é caracterizada por episódios de surtos bem definidos no tempo, com alteração de uma ou mais funções neurológicas, com posterior recuperação que pode ser completa ou deixar sequelas (KOCH et al., 2007; CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008). A forma EM-SP é uma evolução natural da forma EM-RR em 30 a 40% dos casos após 10 anos do diagnóstico. Caracteriza-se pela progressão após um período de evolução por surtos. Constata-se uma deterioração contínua das funções neurológicas e constitui cerca de 15 a 20% de todas as formas de EM num dado momento (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008). EM-PP é a forma mais grave da doença e também a menos frequente entre os portadores de EM, responsável por cerca de 10 a 15% dos casos. Nesta forma, observa-se uma progressão desde o início da doença e a velocidade de progressão pode ser variável. A EM-PP é a forma que mais se distingue das outras pelos critérios clássicos de disseminação no tempo não estarem presentes, o que dificulta seu diagnóstico (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008). EM-PR é caracterizada pelo início progressivo surgindo posteriormente surtos bem identificados, mantendo um padrão de progressão entre os surtos. Esta forma constitui apenas cerca de 5% dos casos (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008).

Conceitualmente, pode-se considerar duas fases distintas na fisiopatologia da EM: uma fase inicial predominantemente inflamatória e uma fase tardia degenerativa (STEINMAN, 2001). A EM possui componentes fisiopatológicos importantes: a inflamação, a desmielinização, a perda de oligodendrócitos e o comprometimento dos axônios. Há evidências de que diferentes processos fisiopatológicos estejam envolvidos no desencadeamento e progressão da EM e a elucidação completa destes mecanismos ainda não estão totalmente compreendidos (MILLER et al., 2011).

As lesões ativas na EM podem ser classificadas em 4 padrões distintos de desmielinização: Padrão tipo I é o mais comum e está associado à presença principalmente de linfócitos T e macrófagos no infiltrado inflamatório, observa-se remielinização parcial e preservação dos oligodendrócitos, células responsáveis pela síntese da mielina (IRANI, 2005; KANTARCI et al., 2005). O padrão tipo II é menos frequente quando comparado ao padrão tipo I, caracteriza-se pela deposição de imunoglobulinas e ativação do complemento nos locais das lesões e de maneira semelhante ao tipo I não há comprometimento dos oligodendrócitos (IRANI, 2005). Por outro lado, nos padrões tipos III e IV quase não

se observa a remielinização devido ao comprometimento dos oligodendrócitos, sendo estes padrões caracterizados pelo processo de degeneração (KANTARCI et al., 2005; BIRNBAUM; ANTEL, 2008).

Células do sistema imunológico como linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B, monócitos, macrófagos e micróglia ativada atuam de maneira complexa e estão envolvidas na fisiopatologia da EM. Além disso, moléculas de adesão, quimiocinas, interleucinas (IL) e seus receptores têm sido implicadas na patogênese da doença (MAHAD; TRAPP; RANSOHOFF, 2008).

Indivíduos geneticamente susceptíveis, após entrarem em contato com um fator ambiental, como infecções virais, podem desencadear reações imune-cruzadas que reconhecem os componentes da mielina como alvos antigênicos, mecanismo conhecido como mimetismo molecular (FONTOURA, 2010). O primeiro contato com o antígeno, o qual compartilha epítomos semelhantes aos da mielina, ocorre no tecido periférico. Células apresentadoras de antígeno, principalmente macrófagos, apresentam este antígeno por meio da molécula MHC classe II para linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naives* que se tornam ativados e podem se diferenciar em basicamente 4 células funcionalmente distintas: Th1, Th2, Th17 e T reguladores (T reg) (IRANI, 2005).

As células Th1 produzem um perfil de citocinas pró-inflamatórias como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-2 e parecem predominar nas lesões desmielinizantes. A principal função destas citocinas é estimular as células fagocíticas na destruição da bainha de mielina, ou seja, são mediadores do processo inflamatório intenso coordenado contra os componentes da mielina (KANTARCI et al., 2005).

As células Th2 também podem ser encontradas em alguns pacientes com EM e há evidências de que o componente humoral exerce papel importante nestes pacientes. Caracterizam-se pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimulam a produção de imunoglobulinas e, por ação da IL-10, inibem as células Th1. Observa-se deposição de anticorpos dirigidos contra os componentes da mielina, principalmente contra a glicoproteína dos oligodendrócitos associadas à mielina (anti-MOG) e a proteína básica associada à mielina (anti-MBP), além da ativação das proteínas do sistema complemento (KANTARCI et al., 2005; IRANI, 2005).

A necessidade de compreender os mecanismos imunológicos

responsáveis pela lesão tecidual nas doenças inflamatórias crônicas levou a caracterização do fenótipo celular Th17. Estudos recentes têm demonstrado que a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-17, mais que as células Th1, tem um papel central na patogênese de modelos experimentais de doenças autoimunes (SOUZA et al., 2010). O perfil Th17 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-17, IL-21 e IL-22 e esse fenótipo tem sido intimamente associada à patogênese da EM. Há evidências de que o interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), medicamento imunomodulador utilizado no tratamento da EM, parece inibir a diferenciação dos LT CD4<sup>+</sup> para Th17 via inibição de IL-23, podendo ser considerado um dos mecanismos de ação deste fármaco (KRAKAUER et al., 2008).

Além disso, as células LT CD4<sup>+</sup> podem ser estimuladas a se diferenciar em células Tregs, cuja principal função é de imunossupressão, diminuindo a atividade de células T pró-inflamatórias e conseqüentemente o processo inflamatório. As citocinas liberadas por este subgrupo de linfócitos T são fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-10 e IL-35 e parecem regular negativamente o perfil Th17, de maneira semelhante ao que acontece com os perfis Th1 e Th2 (SOUZA et al., 2010). Há evidências de que indivíduos com diminuição de células Treg apresentam maior predisposição para desenvolver doenças autoimunes pela perda da tolerância imunológica (IRANI, 2005). Um estudo reportou que pacientes com EM apresentaram significativa redução do número e da função das células Treg examinadas no sangue periférico em relação a indivíduos controles (VIGLIETTA et al., 2004).

Após a diferenciação dos linfócitos T nos tecidos periféricos, ocorre a migração destas células através da barreira hematoencefálica (BHE) para o SNC. O processo de migração transendotelial é regulado por um conjunto de sinais moleculares bem caracterizados, incluindo moléculas de adesão celular e quimiocinas (FONTOURA, 2010). As moléculas de adesão expressas nos linfócitos T são membros das famílias da integrina e selectina, exercem importantes funções na migração das células T para o sítio inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Do extenso conjunto de moléculas de adesão celular, destacam-se a integrina  $\alpha 4\beta 1$  também conhecida como VLA4 (*very late antigens* 4) que se liga a molécula de adesão das células vasculares (VCAM-1), que é expressa nas células endoteliais ativadas pelas citocinas e a integrina  $\beta 2$ , comumente chamada de LFA-1 (antígeno associado à função do leucócito) que se liga as moléculas de adesão

intercelular (ICAM-1 e ICAM-2) expressas no endotélio (ABBAS; LICHTMAN;PILLAI, 2008). Estas moléculas parecem ser os principais fatores responsáveis pela aderência dos linfócitos ao endotélio vascular no SNC e constituem alvo específico de uma das terapêuticas atualmente aprovadas para o tratamento da EM, o anticorpo monoclonal natalizumab (FONTOURA, 2010).

Outras moléculas que contribuem para o ingresso das células T dentro do SNC são as quimiocinas, cujas funções principais são recrutar linfócitos T e monócitos para os locais da inflamação e aumentar a afinidade das integrinas nos leucócitos para seus ligantes no endotélio (ABBAS; LICHTMAN;PILLAI, 2008). Algumas quimiocinas e seus receptores têm sido associados com as lesões desmielinizantes na EM e no modelo experimental EAE. Entre os principais grupos de quimiocinas destacam-se CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 que são expressas nas lesões da EM, bem como seus receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 e CXCR3 (MAHAD; TRAPP; RANSOHOFF; 2008). Polimorfismos nos genes de quimiocinas e seus receptores foram associados com a EM em populações mundiais (KAIMEN-MACIEL et al., 2007; KALLAUR et al., 2011). Um estudo demonstrou que a expressão de CCL3 correlacionou-se com a gravidade da doença (KENNEDY et al., 1998) bem como a expressão do receptor CCR5 foi associada com a atividade da doença na EM (SIMPSON et al., 2000; BAGAEVA et al., 2003).

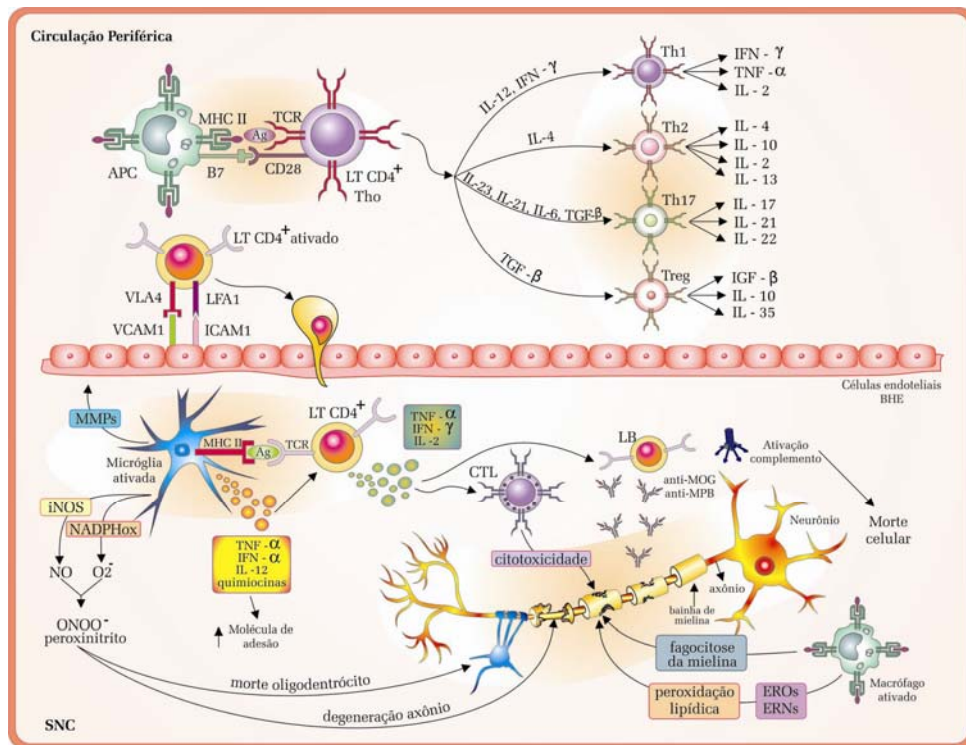
A penetração das células inflamatórias no SNC também é auxiliada pelas metaloproteinases (MMPs), enzimas que contribuem para a destruição da BHE. As células T ativadas que penetraram no SNC sofrem uma reativação e entram novamente em contato com o antígeno que lhe são apresentadas por macrófagos ou micróglia por meio do MHC classe II (IRANI, 2005). Este fenômeno de reativação implica na produção de vários mediadores pró-inflamatórios pela micróglia ativada e macrófagos perivasculares como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-23, entre outras), quimiocinas CCL2, CCL3, metaloproteinase 9 (MMP-9), aumento da expressão das moléculas de adesão, além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) que parecem contribuir para o dano à mielina (RAIVICH; BANATI, 2004).

Há evidências de que diferentes células inflamatórias participam do processo de desmielinização na EM: linfócitos T CD4<sup>+</sup> que ao produzirem citocinas podem estimular linfócitos T CD8<sup>+</sup> a se transformarem em linfócitos T citotóxicos (CTL), causando dano direto a mielina; linfócitos B que são estimulados a

produzirem imunoglobulinas e ativam o complemento, formando imunocomplexos que se depositam no local da lesão; além dos macrófagos ativados que fagocitam e participam do processo de digestão dos componentes da mielina (IRANI, 2005).

A fase tardia da EM caracteriza-se pelo processo degenerativo, quando se observa acúmulo de lesões cicatriciais, incapacidade neurológica progressiva, danos ao axônios e dificuldade de remielinização devido ao comprometimento dos oligodendrócitos (FOUNTOURA, 2010). A interação de todos esses componentes imunológicos e da inflamação faz da EM uma doença complexa na sua patogênese, fisiopatologia e imunologia (figura 1).

**Figura 1** - Mecanismos imunopatogênicos e estresse oxidativo envolvidos na esclerose múltipla (EM).



Macrófagos da circulação periférica apresentam antígenos que compartilham epítopos semelhantes aos da mielina aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïves* (Th0). Estas células tornam-se ativadas e podem se diferenciar em 4 fenótipos celulares: Th1, Th2, Th17 e Treg. Os linfócitos T ativados ligam-se as células endoteliais por meio das moléculas de adesão, VLA4 liga-se na VCAM e LFA1 liga-se na ICAM-1, facilitando a entrada destas células no sistema nervoso central (SNC) através da barreira hematoencefálica (BHE). No parênquima nervoso ocorre um novo contato do linfócito T CD4<sup>+</sup> com a microglia (macrófagos residentes no SNC). Nesta fase de reativação, a microglia torna-se ativada e produz grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IL-12, metaloproteinases (MMPs) e quimiocinas, que por sua vez, aumentam a expressão das moléculas de adesão e atuam no linfócito T CD4<sup>+</sup>. Há, também, aumento da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a NADPHoxidase na microglia ativada,

responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que, juntos, formam peroxinitrito, importante oxidante que parece estar envolvido com o dano aos axônios e oligodendrócitos na EM. Os linfócitos T  $CD4^+$  ativados produzem citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  que estimulam os linfócitos B (LB) a produzirem anticorpos, principalmente anti-MOG e anti-MBP, com posterior ativação do sistema complemento, levando à morte celular. Estas citocinas também estimulam os linfócitos T citotóxicos (CTL) a produzirem citotoxinas e agem diretamente na lesão desmielinizante. Os macrófagos perivascularmente ativados produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que ao reagirem com os lipídios poliinsaturados da mielina provocam peroxidação lipídica e contribuem para a fagocitose da mielina. Todos estes mecanismos associados contribuem para a desmielinização na EM.

Além dos mecanismos imunológicos envolvidos na fisiopatologia da doença, estudos têm sugerido que o estresse oxidativo pode exercer importante papel na patogênese da EM. EROs e ERNs, geradas em excesso pela micróglia ativada, têm sido implicadas como mediadores da desmielinização e parecem atuar como fator agravante para a doença, contribuindo para a formação e persistência das lesões características da EM (VAN HORSSSEN et al., 2008; GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004).

O SNC é particularmente susceptível ao estresse oxidativo devido ao elevado consumo de oxigênio e alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, biomacromoléculas mais vulneráveis ao ataque oxidativo (FRIEDMAN, 2011).

Estudos evidenciaram aumento dos produtos de peroxidação lipídica (GRECO; MINGHETTI; LEVI, 2000; FERRETI et al., 2005; MILLER et al., 2011) e proteica (MILLER et al., 2012) nos fluidos biológicos de pacientes com EM. Entretanto, há poucos dados na literatura sobre correlação entre os marcadores do estresse oxidativo e progressão da doença avaliada pela escala EDSS. Apenas um estudo avaliou a relação entre os níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos e a progressão da incapacidade em pacientes com EM; no entanto, os autores não encontraram correlação (KOCH et al., 2007).

Macrófagos cerebrais e micróglia ativada mostraram aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na EM e no modelo experimental, encefalomielite aguda experimental (EAE) (DE GROOT, et al., 1997; VAM DAM, et al., 1995). No entanto, estudos sobre o papel do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia da EM têm mostrado resultados discordantes. Enquanto alguns estudos encontraram níveis elevados de metabólitos do óxido nítrico (NOx) no plasma e LCR de pacientes com EM (YUCEYAR; TASKIRAN; SAGDUYU, 2001;

DANILOV et al., 2003), outro estudo demonstrou diminuição de NOx nos fluídos biológicos (DE BUSTOS et al., 1999). Os diferentes resultados encontrados na literatura podem ser explicados, principalmente, devido a seleção de pacientes em diferentes fases da doença (surto ou remissão) e ao uso de terapia imunomoduladora. Mais estudos são necessários para se determinar qual o envolvimento do NO na patogênese da EM.

EROs e ERNs são fisiologicamente neutralizadas por várias moléculas antioxidantes que podem ser de origem enzimática como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, ou não enzimática como ácido úrico, glutathione, vitamina C, vitamina E, entre outras (AMORINI et al., 2009). Estudos demonstraram redução da capacidade antioxidante total do plasma (TRAP) em pacientes com EM (BESLER; COMOGLU, 2003); também foi demonstrada reduzida atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, nos eritrócitos destes pacientes (ZAGORSKI et al., 1991).

Estudos relataram que indivíduos com EM apresentaram diminuição nos níveis de antioxidantes não enzimáticos como ácido úrico, glutathione e vitamina E (VAN MEETEREN et al., 2005; RENTZOS et al., 2006). Ácido úrico é considerado um importante antioxidante endógeno e tem sido extensivamente estudado em pacientes com EM, entretanto os dados na literatura têm sido contraditórios. Alguns estudos encontraram diminuição dos níveis séricos de ácido úrico em pacientes com EM (RENTZOS et al., 2006; TONCEV et al., 2002), no entanto, outros encontraram níveis elevados deste marcador bioquímico nesta população (AMORINI et al., 2009). Diante de resultados discordantes, torna-se necessário mais estudos que avaliem qual o papel do ácido úrico na EM.

Baseando-se na hipótese de que o estresse oxidativo é um componente importante dos processos fisiopatológicos da EM, teoricamente, a introdução da terapia antioxidante associada à terapia convencional poderia ser uma estratégia complementar para o tratamento dos pacientes com EM, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida destes indivíduos. Até o presente momento, não há registros de estudos que tenham avaliado marcadores do estresse oxidativo em pacientes com EM da população brasileira, correlacionando-os com a progressão da doença.

Vários biomarcadores bioquímicos como colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), entre outros, também têm sido associados com EM e

estudos demonstraram aumento de comorbidades cardiovasculares nesta população (MARRIE et al., 2010; D'HAESELEER et al., 2011). A presença de fatores de risco cardiovascular como diminuição de atividade física, dislipidemia e resistência à insulina (RI), pode contribuir para o aumento de mortalidade de pacientes com EM.

Uma associação entre níveis séricos elevados de colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos foi observada com a progressão e atividade da EM, evidenciada pelo aumento do valor na escala de EDSS e do número de lesões observadas no exame de imagem de ressonância magnética nuclear, respectivamente (WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2011).

Há poucos relatos na literatura sobre a frequência de RI em pacientes com EM. No entanto, sabe-se que a insulina contribui para o funcionamento normal do cérebro e que anormalidades periféricas como RI aumentam o risco de perda de memória e desordens neurodegenerativas como doença de Alzheimer e EM (WATSON; CRAFT, 2006). Considerando que a RI é um fator de risco cardiovascular e que a insulina desempenha um papel importante na função cerebral, justifica-se o aumento do interesse em se monitorar o perfil glicêmico em pacientes com EM.

Estudos têm mostrado que estados inflamatórios crônicos estão intimamente associados com o desenvolvimento de RI (OLEFSKY; GLASS, 2010). Mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 liberados em grande quantidade por macrófagos ativados, como na EM, parecem induzir a RI por meio de mudanças na cascata de sinalização deste hormônio. Há evidências de que agentes com ação anti-inflamatória podem ter efeito benéfico no aumento de sensibilidade à insulina (OLEFSKY; GLASS, 2010). Além disso, estudos observaram que o bloqueio da atividade do TNF- $\alpha$  melhorou a sensibilidade à insulina em ratos obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1993). No entanto, mais estudos são necessários para compreensão do papel da inflamação na patogênese da RI.

A grande maioria das terapias atualmente aprovadas para o tratamento da EM têm como alvo o componente inflamatório da doença; no entanto, está se tornando claro que, semelhante ao tratamento de pacientes com câncer, a estratégia terapêutica de sucesso na EM deve envolver a combinação de diferentes alvos terapêuticos que predominam nos diferentes processos fisiopatológicos da EM. No entanto, o desenvolvimento de terapias específicas a estes processos lesivos será muito difícil sem o uso de biomarcadores que refletem os processos alvo.

Diante de uma doença neurológica tão complexa e heterogênea como a EM, tornam-se necessário estudos que avaliem as principais alterações metabólicas e do estresse oxidativo nestes pacientes, na tentativa de identificar biomarcadores viáveis que contribuam para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de pacientes com EM.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estresse oxidativo e os fatores de risco cardiovascular em pacientes com EM

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estresse oxidativo por meio de metodologias diferentes, analisando marcadores de peroxidação lipídica (hidroperóxido lipídico), oxidação proteica (proteínas carbonílicas), metabólitos do óxido nítrico (NOx), além das defesas antioxidantes (ácido úrico, grupo sulfidril associado à proteínas e TRAP) em pacientes com EM e indivíduos saudáveis;
- Avaliar os níveis séricos de ácido úrico, perfil lipídico (colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos), perfil glicêmico (glicose e insulina) em indivíduos com e sem EM;
- Avaliar os níveis séricos de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$  em pacientes com EM e em indivíduos saudáveis;
- Determinar a prevalência de RI em pacientes com e sem EM;
- Relacionar a progressão da EM por meio da escala EDSS com os marcadores do estresse oxidativo e fatores de risco cardiovascular.

### 3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo observacional do tipo caso-controle realizado no período de agosto de 2010 a janeiro de 2012.

#### 3.2 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no STATCALC do Programa Epi Info versão 6.04d, tendo como referência dados de um estudo desenvolvido por Naidoo e Knapp (1992). De acordo com os cálculos, a estimativa do tamanho da amostra para o presente estudo seria de 70 indivíduos em cada grupo.

#### 3.3 AMOSTRA

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (ANEXO A). Todos os indivíduos foram convidados a participarem voluntariamente da pesquisa, informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B). Os pacientes com EM foram selecionados no Ambulatório de Neurologia do Ambulatório do Hospital de Clínicas (AHC) da Universidade Estadual de Londrina.

A amostra foi obtida por conveniência de tempo e local. Foram avaliados 134 pacientes com EM, diagnosticados segundo os critérios de McDonald revisados (POLMAN et al., 2005) e classificados como EM-RR, EM-SP e EM-PP. A gravidade da doença foi avaliada por meio da *Expanded Disability Scale Status* (EDSS), com escores que variam de 0,0 a 10,0 (KURTZKE, 1983). Informações sobre fatores que influenciam no estilo de vida e história médica foram obtidas na avaliação clínica. Os hábitos nutricionais dos pacientes foram similares aos do grupo controle e nenhum dos indivíduos estava recebendo algum tipo de dieta específica.

O grupo controle foi composto de 196 indivíduos saudáveis selecionados consecutivamente entre os doadores de sangue fidelizados do

Hemocentro Regional de Londrina. Para obtenção de grupos homogêneos, parâmetros como idade, gênero, etnia, tabagismo e índice de massa corporal (IMC) foram controlados.

Os dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo foram coletados pelo grupo de pesquisa por meio de um questionário (ANEXO C) e pela consulta aos prontuários do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

### 3.3.1 Critérios de Seleção dos Pacientes com EM

- Indivíduos diagnosticados segundo os critérios McDonald revisados (Polman et al., 2005) e que não estavam no período de surto da doença.
- Pacientes com síndrome clinicamente isolada (CIS) e neuromielite óptica foram excluídos do estudo.
- Pacientes que utilizavam suplemento antioxidante como vitaminas ou tinham diabetes tipo II foram excluídos do estudo.

### 3.3.2 Critérios de Seleção dos Controles

- Indivíduos saudáveis que não apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimune, renal, cardíaca ou hepática e reportaram não fazerem uso de medicamentos anti-inflamatórios e suplementos antioxidantes.
- Todos os indivíduos envolvidos neste estudo relataram não fazerem uso de bebidas alcoólicas e não praticavam exercício físico regularmente.

## 3.4 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliar o estresse oxidativo, amostras de sangue periférico foram coletadas utilizando ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas do plasma foram armazenadas no *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

#### 3.4.1 Capacidade Antioxidante Total do Plasma (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP*)

Determinou-se a capacidade antioxidante total do plasma por meio da técnica do TRAP. Nesta análise, avalia-se a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no meio que resulta em um parâmetro integrado capaz de revelar alterações no delicado equilíbrio redox existente *in vivo* (VASCONCELOS et al., 2007). Esta técnica quantifica antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma, por meio de quimioluminescência (QL), como descrito previamente por Repetto e colaboradores (1996). Baseia-se no princípio da adição de um azoiniciador ao plasma, substância capaz de gerar radicais livres, que por sua vez, são neutralizados pelos antioxidantes presentes no plasma, período no qual a oxidação é inibida e comparada ao do Trolox (New Jersey, EUA). O Trolox é um análogo hidrossolúvel da vitamina E, usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado à capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de TRAP foram expressos em  $\mu\text{M}$  Trolox® (VASCONCELOS et al., 2007).

#### 3.4.2 Grupamento Sulfidril de Proteínas

Grupamento sulfidril de proteínas foi avaliado no plasma pelo método de espectrofotometria descrito previamente por Hu (1994). Esta técnica baseia-se na reação do ácido 2,2 ditiobisnitrobenzóico (DTNB) com o grupo tiol (P-SH) das proteínas. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### 3.4.3 Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por t-butil (CL-LOOH)

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzales-Flecha e colaboradores (1991). A QL estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no plasma. O teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E, com formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento da

emissão de fótons. Foi utilizado um contador  $\beta$  marca Beckman<sup>®</sup> modelo LS 6000 (Fullerton, California, EUA) que possui um modelo de contagem não coincidente por 30 segundos, com uma faixa de resposta entre 300 e 620 nM. As análises foram efetuadas em frascos de plástico para cintilação e protegidas da luz. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (c.p.m.) (SIMÃO, et al., 2010).

#### 3.4.4 Determinação de Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)

Os NOx foram determinados no plasma por espectrofotometria de acordo com a reação de Griess, com algumas modificações, descrita previamente por Panis e colaboradores (2011). Esta técnica utiliza o grânulo de cádmio para reduzir nitrato a nitrito, o qual é quantificado ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### 3.4.5 Determinação de Proteínas Carbonílicas

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). O método utilizado para sua quantificação no plasma foi espectrofotométrico, baseado na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila, formando a 2,4dinitrofenilhidrazona, de acordo com a técnica descrita por Reznick et al. (1994). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteínas totais.

### 3.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Para análise dos marcadores bioquímicos, a coleta de sangue periférico, com e sem anticoagulantes, foi realizada após um período de 12 horas de jejum. O material coletado foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas de plasma e soro foram armazenadas no *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

As dosagens séricas de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos e ácido úrico e a dosagem plasmática de glicose foram realizadas em um autoanalisador bioquímico (Dimension<sup>TM</sup> Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). A determinação dos níveis plasmáticos de insulina foi realizada

por QL em imunoensaio com micropartículas como fase sólida, utilizando-se o equipamento ARCHITECT™ (Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

O método *Homeostatic Model Assessment* (HOMA) foi utilizado para avaliação da RI e a função das células beta do pâncreas (HAFFNER; MIETTINEN; STERN, 1997) O índice HOMA foi calculado de acordo com a fórmula a seguir. A RI foi considerada quando  $HOMA \geq 2,5$ .

$$HOMA-IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum (mU/L)} / 22,5.$$

### 3.6 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Os níveis séricos das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$  foram determinados pelo método de enzimaímunoensaio (ELISA) do tipo sanduiche, com microplacas sensibilizadas com anticorpos de captura específicos contra as citocinas avaliadas (ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience, San Diego, CA, EUA). O procedimento técnico e os valores de referência foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística das variáveis categóricas como gênero, etnia e tabagismo, o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado. Para as variáveis quantitativas e contínuas utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos, pois os dados não apresentaram distribuição gaussiana. A análise estatística foi realizada no programa *Graph Pad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Os dados foram expressos como mediana e interquartil (25%-75%). Correlações de variáveis foram realizadas utilizando-se o coeficiente de Spearman.

Para determinar quais fatores estavam associados com EM, foi realizada uma análise multivariada de regressão logística, utilizando-se o programa *GraphPad InStat* versão 3.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Todos os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos descritos a seguir. O primeiro artigo descreve os resultados dos marcadores do estresse oxidativo correlacionando-os com a progressão da doença, por meio da escala de EDSS. O segundo artigo discute a associação entre RI e fatores de risco cardiovascular e a incapacidade nos pacientes com EM.

4.1 ARTIGO 1: OXIDATIVE STRESS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS IN CLINICAL REMISSION: ASSOCIATION WITH THE EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE

**Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale**

Sayonara Rangel Oliveira<sup>1</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>1</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2\*</sup>, Helena Kaminami Morimoto<sup>2</sup>, Josiane Lopes<sup>1</sup>, Carolina Panis<sup>3</sup>, Diego Lima Petenucci<sup>4</sup>, Eloisa da Silva<sup>4</sup>, Rubens Cecchini<sup>3</sup>, Damácio Ramon Kaimen-Maciel<sup>55</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>

**Abstract**

Increased levels of oxidative stress markers and/or decreased levels of antioxidant molecules are described in patients with multiple sclerosis (MS) and this imbalance has been implicated in demyelination and axonal damage. The aim of this study was to evaluate oxidative stress in MS patients and to verify its correlation with disability assessed by the Expanded Disability Status Scale (EDSS). This study included 134 MS patients and 196 healthy individuals controlled by age, gender, ethnicity, smoking, and body mass index. The oxidative stress was evaluated by plasma levels of lipid hydroperoxide, carbonyl protein, nitric oxide metabolites (NOx), sulfhydryl groups of proteins, serum uric acid levels, and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). MS patients had higher plasma levels of lipid hydroperoxide ( $p < 0.0001$ ), carbonyl protein ( $p = 0.0217$ ), and lower plasma levels of NOx ( $p < 0.0001$ ), sulfhydryl groups ( $p = 0.0004$ ), and TRAP ( $p = 0.0001$ ), than controls. Uric acid levels did not differ among the individuals ( $p = 0.115$ ). Positive correlation was observed between hydroperoxide lipid and EDSS ( $r = 0.212$ ,  $p = 0.014$ ) and carbonyl protein and EDSS ( $r = 0.221$ ,  $p = 0.035$ ). Multivariate analysis showed that TRAP and sulfhydryl groups are associated with EDSS ( $p = 0.0344$  and  $p = 0.0318$ , respectively). These results underscore that oxidative stress plays an important role in the physiopathology of the MS progression.

**Keywords:** Oxidative stress. Multiple sclerosis. Lipid peroxidation. EDSS. Carbonyl protein. Sulfhydryl groups.

1 Postgraduation Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina

2 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, State University of Londrina

3 Free Radical Physiopathology Laboratory

4 Pharmacy Graduation, Health Sciences Center, State University of Londrina

5 Department of Clinical Medicine, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Corresponding author: Andrea Name Colado Simão, PhD. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina. Robert Koch Avenue # 60, Bairro Cervejaria, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440; phone: (55) 43 3371 2321, e-mail: deianame@yahoo.com.br

## 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory immune-mediated disease of the central nervous system (CNS), characterized by a T-cell-dependent process associated with macrophage-mediated demyelination driven by myelin-specific autoantigens [1]. Accumulating data indicate that oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of MS. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) might play a key role in the disease development by contributing to myelin and oligodendroglia degeneration, the pathological hallmarks of MS [2].

There is increasing evidence that relapsing-remitting and progressive clinical phases of MS are caused by two distinct mechanisms. Focal inflammation is believed to be caused by relapses, whereas diffuse axonal degeneration appears to be the main contributor to disease progression. Oxidative stress in MS is believed to contribute to both processes [3,4].

The CNS is particularly vulnerable to oxidative insult on account of the high rate of O<sub>2</sub> utilization, the relatively poor concentration of classical antioxidants and related enzymes, and the high content of polyunsaturated lipids, the most of biomacromolecules susceptible to oxidation. In addition, there is regionally high concentration of redox-active transition metals such as iron, capable of the catalytic generation of ROS [5].

Increased levels of oxidative stress markers and/or decreased levels of antioxidant enzymes and small molecule antioxidants are described in blood, serum, and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS [6]. Studies reported that MS patients showed increase lipid peroxidation products in biological fluids [7,8]. However, only one study evaluated the relationship of plasma lipid peroxidation with the progression of the disability in MS, but this correlation was not demonstrated [9]. Previous study showed that MS patients had higher plasma levels of carbonyl protein than healthy subjects [10]; however, at present moment, the association between disability and this protein oxidation marker was not described.

Additionally, results about the evidences of the role of nitric oxide (NO) in the physiopathology of MS have been contradictory. One study reported that metabolites of nitric oxide (NO<sub>x</sub>) were significantly increased in plasma and CSF of MS patients [11] and other demonstrated that NO<sub>x</sub> are decreased in the MS patients

[12]. Regard to antioxidant status, there were evidences of antioxidant deficiency in MS patients [6]. Decreased levels of antioxidant intracellular enzymes and low plasma total antioxidant capacity were demonstrated in MS patients [13,14]. Serum levels of non-enzymatic antioxidants such as uric acid were also decreased in MS patients [15,16]. In addition, studies reported inverse correlation between serum uric acid levels and disease activity [15,17] and with disability in MS patients [18].

Contradictory results are showed regard to the oxidative stress markers in MS patients and the relevance of oxidative stress in the clinical course and progression of disease in MS is unclear. The most of the studies have evaluated the oxidative stress in MS patients when they are in relapse phase of the disease or with high disability status. Moreover, these studies have evaluated some pro-oxidants and antioxidant parameters, individually, fact that limits a consistent evaluation of the redox imbalance that may occur in MS.

The present study was carried out to evaluate the oxidative stress in patients with MS during the remission clinical phase and to verify a possible association with the disability of them.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Subjects**

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of State University of Londrina. All invited individuals were informed in detail about the research and a voluntary written consent form was obtained from 134 MS patients and 196 healthy volunteers enrolled consecutively. The 134 MS patients were from the Neurology Outpatient of Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Londrina, Southern Brazil, diagnosed with MS according to the McDonald criteria [19]. The patients were classified into relapsing remitting MS (RR-MS), secondary progressive MS (SP-MS), and primary progressive MS (PP-MS). Patients with clinically isolated syndrome (CIS) and neuromyelitis optica were not included. MS patients were clinically evaluated using the Extended Disability Status Scale (EDSS) [20] and they were separated into two groups according to EDSS cutoff value of 3.5, and patients with  $EDSS \leq 3.5$  were considered with low disability [21]. Information on lifestyle factors and medical history were obtained at clinical

evaluation. Nutritional status of patients did not differ from the control group and none of the subjects were receiving a specific diet. MS patients that were using antioxidant supplements such as vitamins were also excluded.

The control group was composed by 196 healthy individuals from the same geographic area and they did not present either clinical or laboratory characteristics of autoimmune, renal, heart, or liver disease, and reported were not using anti-inflammatory drugs or antioxidant supplements. All individuals enrolled in the study reported that neither drink alcohol nor practice physical activity regularly. The parameters such as age, gender, ethnicity, smoking and body mass index (BMI) were controlled.

## 2.2. Oxidative Stress Markers

For oxidative stress evaluation, peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant. All samples were immediately centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and plasma and serum aliquots were stored at freezer -80°C until use. The samples were identified, consecutively, by number in order to guarantee the confidentiality. Oxidative stress was evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH), as described previously [22] and the results were expressed in counts per minute (cpm). Carbonyl protein content was measured as an estimate of protein oxidative injury, as described elsewhere [23]. The NOx plasma levels were assessed by nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentration according to Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [24] and the results were expressed in  $\mu\text{M}$ . Sulfhydryl groups of proteins were evaluated in plasma samples by a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), as reported previously [25] and the results were expressed in  $\mu\text{M}$ .

Serum uric acid levels were evaluated by biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). The method was performed according to the manufacturer's instructions and the results were expressed in mg/dL. Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported previously [26]. Briefly, this method detects hydrosoluble and/or lyposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by

2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with vitamin E analog Trolox and TRAP values were expressed in equivalent of  $\mu\text{M}$  Trolox.

### 2.3. Statistical analysis

The data were evaluated by the statistical analysis program Graph Pad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and Graph Pad InStat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) for the multivariate analysis. Distribution of gender, ethnicity, and smoking was analyzed by chi-square test. Comparisons between control subjects and MS patients were done using the Mann-Whitney test and data were expressed as the median and interquartile range (25%-75%). Correlation was evaluated by Spearman's rank correlation. To determinate which factors were independently associated with EDSS, the variables that presented  $p < 0.10$  in the univariate analyses and those values with supposed clinical relevance. An independent variables was considered when  $r^2 < 0.75$ . All the results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

Demographic and anthropometric characteristics of MS patients and controls are shown in table 1. As expected, there was no difference between the individuals regard to age ( $p=0.089$ ), gender ( $p=0.267$ ), ethnicity ( $p=0.736$ ), smoking ( $p=0.157$ ), and BMI ( $p=0.261$ ). Some clinical characteristics of MS patients are shown in table 2. Among them, 119 (88.8%) were RR-MS, the EDSS scores ranged from 0.0 to 8.0 (median 2.25) and the duration of disease showed a median of 6 years (with interquartile range 2 -10 years). Concerning to therapy for MS, 97 (72.0%) patients were using interferon beta (IFN- $\beta$ ) 1a or 1b.

The results of oxidative stress markers evaluated are shown in table 3. MS patients presented significant increase of oxidative stress assessed by CL-LOOH ( $p < 0.0001$ ) compared with healthy controls (figure 1). In addition, they presented higher carbonyl protein content and lower serum levels of NOx than healthy controls ( $p=0.0217$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Regard the antioxidant status, MS patients showed lower sulfhydryl group of proteins and TRAP values than control subjects ( $p=0.004$  and  $p=0.0001$ , respectively). Although MS patients have

presented lower serum uric acid levels than control subjects, the difference was not significant ( $p=0.115$ ), as showed in table 3. A positive correlation, although fair, was observed between CL-LOOH ( $r=0.212$ ,  $p=0.014$ ) and carbonyl protein ( $r=0.221$ ,  $p=0.035$ ) with disability of the MS patients evaluated by EDSS. However, correlation between EDSS and other oxidative markers evaluated in this study, such as NOx ( $p=0.270$ ), sulfhydryl group of protein ( $p=0.528$ ), uric acid ( $p=0.580$ ), and TRAP ( $p=0.663$ ) was not observed (table 4).

The multivariate analysis between oxidative stress parameters and disability of disease demonstrated that sulfhydryl groups and TRAP are associated with the EDSS scores ( $p=0.0318$  and  $p=0.0344$ , respectively). While an association between NOx levels and EDSS was not observed ( $p=0.7106$ ), the data showed a trend between CL-LOOH and EDSS ( $p=0.0683$ ) and also between carbonyl proteins and EDSS ( $p=0.0683$  and  $p=0.0810$ ), as shown in table 5.

#### **4. Discussion**

In the present study, a redox imbalance was observed in MS patients revealed by the increased serum levels of pro-oxidants parameters and the reduced antioxidant defenses when compared with healthy individuals.

Previous study also found increased products of lipid peroxidation in MS patients evaluated by urine isoprostanes and plasma level of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) [8]. The data obtained in the present study showed significant enhance in CL-LOOH, a robust and highly sensitive chemiluminescence method. The CL-LOOH is a method that takes into account a kinetics analysis of the ascending part of emission curve under the assumption that variation of initial velocity values depends on the level of pre-existing antioxidant defenses. It also reflects increased lipid hydroperoxides originated from phospholipids, cholesterol esters, protein, and free fat acid oxidation and decreased antioxidants levels, brought about by previous free radicals action mainly on plasma lipoprotein particles [24]. This result may be considered one of the strengths of this study. The relationship between oxidative stress and disability of MS patients has been little investigated. In one study that evaluated the correlation between lipid peroxidation marker and EDSS changes for five-year follow-up, this correlation was not observed [9]. The present data was not in agreement with this previous study. It is possible that differences in design and

markers used by different researchers may explain this disagreement, such as the measurement of plasma fluorescent total lipid peroxidation products (PFLPP) [9]. In the current study, CL-LOOH was positively correlated with EDSS. As cited previously, this method provides data about the redox balance of the individuals.

MS patients evaluated in this study showed higher plasma levels of carbonyl protein content than control subjects, in accordance with the only research that evaluated carbonyl protein in humans [10]. While lipid oxidation in neurodegenerative disorders, such as MS, has been extensively studied, protein oxidation has received little attention. In autoimmune and immune-mediated diseases, oxidatively modified proteins are responsible for additional perturbations in the self-tolerance because they represent potential targets for the immune system by breaking the B-cell tolerance [27]. Previous experimental studies have been shown that protein oxidation may also play a critical physiopathological role in the inflammatory demyelinating disease [28]. Therefore, the current study is the first investigation that demonstrated a relationship between disability evaluated by EDSS and serum levels of carbonyl proteins in MS patients.

Regard to NO, at low concentration it has been shown to play a unique role in neurotransmission and vasodilation; however, at high concentration, NO is a potent neurotoxin [29]. Consistently, NO derived in excessive amounts from activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in glial cells (microglia and astrocytes), is assumed to contribute to the oligodendrocytes degeneration in demyelinating diseases and neuronal death during MS [29]. However, the results of NO<sub>x</sub> serum levels obtained among patients with MS have been contradictory. While elevated NO<sub>x</sub> levels were obtained in CSF, urine, and serum of MS patients [30], lower plasma levels of NO<sub>x</sub> were obtained in MS patients than controls [12]. In agreement with previous study [12], the present data also showed that MS patients had lower serum NO<sub>x</sub> levels than controls. This result could be explained by some factors including that NO levels may be affected by therapies such as IFN- $\beta$  that decreases the induced-NO synthesis in a dose-dependent manner by inhibiting the iNOS. There are evidences that one of the mechanisms of therapeutic efficacy of IFN- $\beta$  in MS is on the basis of inhibition of NO production by astrocytes in MS brain plaques [31]. In the present research, 97 (72.3%) patients with MS were using IFN- $\beta$  (1a or 1b) and this fact should influence the results obtained. Moreover, is possible that the reduction in NO<sub>x</sub> levels is coherent with the increased level of oxidative

stress biomarkers evaluated. It is well known that inflammation might raise ROS levels leading oxidative stress and that increased NO consumption occurs with high inflammatory activity, resulting in a decrease of serum NOx. This statement is supported by the fact that NO is consumed when reacts with superoxide anion yielding a strong oxidant specie, peroxynitrite, which in turn, accelerates the lipid peroxidation reaction [32]. The apparent discrepancy of the results about NOx in MS patients may also be explained mainly by differences in selection criteria of patients that were in different clinical stages of the disease e the use of immunomodulatory and immunosuppressive therapies [30].

The present study showed decreased total antioxidant capacity, evaluated by TRAP, in MS patients and this result is in agreement with previous study [14]. TRAP methodology takes into account the cumulative action of all antioxidant molecules, such as uric acid, protein, ascorbate, and vitamin E. Thus, this method provides an integrated evaluation of all parameters rather than the simple sum of measurable antioxidants [33]. Uric acid is responsible for 60.0% of the scavenging activity of free radicals in human plasma and it is directly correlated with TRAP [34]. In the present study, uric acid levels were not different between the individuals. Thus, decrease in TRAP concentration in MS patients is due to change in other plasma low-weight antioxidant molecules, such as decrease of sulfhydryl groups observed in the present study. Antioxidant deficiencies may occur during the clinical course of MS as a result of chronic inflammation that is accompanied by increased oxidative stress [35]. Moreover, this is the first study that reported the association between EDSS and antioxidant defenses in MS patients.

Some weakness of this study must be discussed such as the fact that oxidative stress markers were evaluated in peripheral blood samples instead of CFS samples. However, some studies that evaluated oxidative stress both in plasma and CSF samples showed conflicting results [36]. Some reasons could explain these discrepancies such as the characteristics of control groups matched with MS patients enrolled in different researches in order to evaluate plasma and CSF parameters. Most of the studies where CFS samples were evaluated, the control group was composed by patients with other non-inflammatory neurological diseases [30] and the oxidative stress presented in these clinical conditions must not be excluded. In addition, CSF is an invasive procedure and therefore can be used only in the experimental setting for a selected patient population. It remains unclear whether

CSF markers have definite advantages over markers collected from blood [37]. Moreover, as the present study has a cross-sectional design, it is not possible to conclude whether oxidative stress observed in MS patients represents one of the primary factors for the disease or a secondary effect as a result of the inflammatory processes within the CNS.

Taken all together, MS patients showed persistent oxidative stress with increase of protein and lipid oxidation markers and decrease of antioxidant defenses even they were not in relapse of the disease. This is the first report that shows an association between oxidative stress and disability of MS patients assessed by EDSS, suggesting that oxidative stress may have an important role in the physiopathology of disease progression, even in patients with clinical remission. These data also subsidize further studies to evaluate the effects of antioxidant therapies that could be integrated with the conventional approaches for treatment of MS patients in remission phase of disease.

## **Acknowledgments**

The study was supported by grants from Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); State University of Londrina (PROPPG); and Bayer HealthCare. We thank the State University of Londrina, the University Hospital of State University of Londrina, and HUTECH for technical and administrative supports. Conflict of Interest Statement: All the authors declare that there is no conflict of interest.

## **References**

- [1] Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Mechanisms of oxidative stress damage in Multiple Sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis* 2010; 2011: 1-11.
- [2] Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, Keir G, Belli A, Giovannoni G, Di Pietro V, Polman C, D'Urso S, Vagnozzi R, Uitdehaag B, Lazarino G. Increased of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin Biochem* 2009; 42: 1001-06.

- [3] Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 2001;14: 271-8.
- [4] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 2004; 251: 261-68.
- [5] Friedman J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress. In: Gadoth N, Gobel HH, (editors). *Oxidative stress and free radical damage in neurology*, New York: Humana Press, 2011: 19-27.
- [6] Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 172-88.
- [7] Ferreti G, Bacchetti T, Principi F, Ludovico DL, Viti B, Angeleri VA, Danni M, Provinciali L. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler* 2005; 11: 677-82.
- [8] Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem Res* 2011, 36: 1012-16.
- [9] Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema D, De Keyser J. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007;14: 529-33.
- [10] Miller E, Walczak A, Saluk J, Ponczek MB, Majsterek I.. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2012; 45: 26-30.
- [11] Danilov AI, Andersson M, Bavand N, Wiklund NP, Olsson T, Brundin L. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;136:112-18.
- [12] De Bustos F, Navarro JA, De Andres C, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Ortí-Pareja M, Gasalla T, Tallón-Barranco A, Martínez-Salio A, Arenas J. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1999; 41: 44-7.
- [13] Zagórski T, Dudek I, Berkan L, Mazurek M, Kedziora J, Chmielewski H. Superoxide dismutase (SOD-1) activity in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. *Neurol Neurochir* 1991; 25: 725-30.
- [14] Besler HT, Comoglu S. Lipoprotein Oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* 2003; 6:189-96.
- [15] Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol* 2002; 9: 221-26.

- [16] Rentzos M, Nikolaou C, Anagnostouli M, Rombos A, Tsakanikas K, Economou M, Dimitrakopoulos A, Karouli M, Vassilopoulos D. Serum uric acid and multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2006;108: 527-31.
- [17] Guerrero AL, Martín-Polo J, Laherrán E, Gutiérrez F, Iglesias F, Tejero MA, Rodríguez-Gallego M, Alcázar C. Variation of serum uric acid levels in multiple sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment. *Eur J Neur* 2008; 15 : 394-97.
- [18] Guerreiro AL, Gutiérrez F, Iglesias F, Martín-Polo J, Merino S, Martín-Serradilla JI, Laherrán E, Tejero MA. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients inversely correlate with disability. *Neurol Sci* 2011; 32: 347-50.
- [19] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: Revisions to the "Mc-Donald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58: 840-6.
- [20] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444–52.
- [21] Russo C, Morabito F, Luise F, Piromalli A, Battaglia L, Vinci A, Trapani Lombardo V, de Marco V, Morabito P, Condino F, Quattrone A, Aguglia U. Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255: 64-9.
- [22] Gonzales-Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 93-100.
- [23] Reznick AZ, Paccker L. Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.
- [24] Panis C, Lemos LG, Victorino VJ, Herrera AC, Campos FC, Colado Simão AN, Pinge-Filho P, Cecchini AL, Cecchini R. Immunological effects of taxol and adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2011(in press) DOI 10.1007/s00262-011-1117-0
- [25] Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI (editors). *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 1994:380-82.
- [26] Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 107-17.
- [27] Sheikh Z, Ahmad R, Sheikh N, Ali R. Enhanced recognition of reactive oxygen species damage human serum albumin by circulating systemic lupus erythematosus autoantibodies. *Autoimmunity* 2007; 40: 512-20.

- [28] Bizzozero OA, De Jesus G, Callahan K, Pastuszyn A. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2005; 81: 687-95.
- [29] Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K. Myelin basic protein-primed T cells induced nitric oxide synthase in microglial cells. Implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* 2002; 277:39327-33.
- [30] Yuceyar N, Taşkıran D, Sağduyu A. Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2001; 103: 206-11.
- [31] Guthikonda P, Baker J, Mattson DH. Interferon-beta-1-b (IFN- $\beta$ ) decreases induced nitric oxide (NO) production by a human astrocytoma cell line. *J Neuroimmunol* 1998; 82: 133-39.
- [32] Simão AN, Lozovoy MA, Simão TN, Venturini D, Barbosa DS, Dichi JB, Matsuo T, Cecchini R, Dichi I. Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 707-12.
- [33] Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biol Med* 2000; 29: 1106-14.
- [34] Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I. Influence of uric acid and  $\gamma$ -glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 2008; 24: 675-681.
- [35] Van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, Van Tol EA. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59:1347-61.
- [36] Greco A, Minghetti L, Puopolo M, Cannoni S, Romano S, Pozzilli C, Levi G. Cerebrospinal fluid isoprostanes are not related to inflammatory activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2004; 224: 23-7
- [37] Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127:1463-78.

**Table 1** - Demographic and anthropometric characteristics of patients with multiple sclerosis (MS) and healthy individuals (controls) from Southern Brazil population.

	<b>MS patients</b>	<b>Controls</b>	<b>p value</b>
	<b>n=134</b>	<b>n=196</b>	
<b>Age (years)</b>			
Median	40.0	36.5	0.089 <sup>a</sup>
Interquartile range	(29.0-49.0)	(29.0-45.0)	
<b>Gender n (%)</b>			
Female	96 (71.6%)	151 (77.0%)	0.267 <sup>b</sup>
Male	38 (28.4%)	45 (23.0%)	
<b>Ethnicity n (%)</b>			
Caucasian	106 (79.1%)	158 (80.6%)	0.736 <sup>b</sup>
No Caucasian	28 (20.9%)	38 (19.4%)	
<b>Smoking (%)</b>			
No	115 (85.8%)	178 (90.8%)	0.157 <sup>b</sup>
Yes	19 (14.2%)	18 (9.0%)	
<b>Body Mass Index</b>			
<b>(kg/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>23.7</b>	<b>24.8</b>	<b>0.261<sup>a</sup></b>
Median	(21.2-27.3)	(21.9-28.0)	
Interquartile range			

a: Mann-Whitney test; b: Chi-square test.

**Table 2** - Clinical characteristics and therapy data of 134 patients with multiple sclerosis (MS) from Southern Brazil population

	<b>MS patients</b>	<b>Frequency</b>
	<b>n=134</b>	<b>%</b>
<b>MS clinical forms</b>		
Relapsing-remitting	119	88.8
Secondary progressive	13	9.7
Primary progressive	02	1.5
<b>Therapy</b>		
Interferon $\beta$ 1a	37	27.6
Interferon $\beta$ 1b	60	44.8
Glatiramer acetate	18	13.4
Natalizumab	3	2.2
Azatioprina monotherapy	6	4.5
Other immunossuppressive drugs	10	7.5
<b>EDSS scores</b>		
$\leq 3.5$	95	70.9
$> 3.5$	39	29.1

**EDSS:** Extended Disability Status Scale (Kurtzke, 1983)

**Table 3** - Oxidative stress markers evaluated in multiple sclerosis (MS) patients and healthy individuals (controls) from Southern Brazilian population

	<b>MS patients</b>	<b>Controls</b>	<b>p value</b>
	<b>n= 134</b>	<b>n=196</b>	
<b>CL-LOOH (cpm)</b>	21,510 (17,850-27,360)	14,100 (11,090-17,780)	< 0.0001
<b>Carbonyl protein (nmol mL<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> total protein)</b>	71.82 (66.00-92.41)	71.73 (59.55-83.82)	0.0217
<b>Plasma NOx (µM)</b>	10.78 (6.14-26.00)	39.91 (27.79-56.92)	< 0.0001
<b>TRAP (µM of Trolox)</b>	640.70 (562.90-764.60)	713.20 (621.70-817.20)	0.0001
<b>Sulfhydryl group (µM )</b>	0.271 (0.203-0.365)	0.310 (0.260-0.287)	0.0004
<b>Uric acid (mg/dL)</b>	3.67 (2.93-4.63)	3.77 (3.17-4.72)	0.1150

Mann-Whitney test. Data are expressed as median (interquartile range 25%-75%). **CL-LOOH**: hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, expressed in cont per minute (cpm); **NOx**: nitric oxide metabolites; **TRAP**: total radical-trapping antioxidant parameter.

**Table 4** - Spearman's rank correlation between oxidative stress markers and the severity of multiple sclerosis evaluated by Expanded Disability Status Scale (EDSS) in multiple sclerosis patients.

Oxidative stress markers	Correlation (r)	p value <sup>a</sup>
<b>Pro-oxidant molecules</b>		
Hydroperoxide	0.212	0.014
Carbonyl protein	0.221	0.035
Nox	0.104	0.270
<b>Antioxidant defenses</b>		
Sulfhydryl group	0.050	0.528
Uric acid	0.040	0.580
TRAP	0.030	0.663

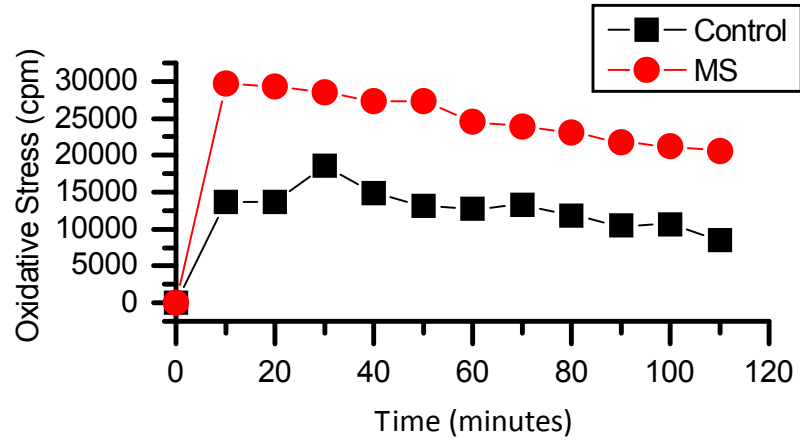
**NOx**: nitric oxide metabolites; **TRAP**:total radical-trapping antioxidant parameter  
a: Spearman's rank correlation, p<0.05.

**Table 5** - Multivariate analysis between Expanded Disability Status Scale (EDSS) and oxidative stress markers obtained in multiple sclerosis patients in clinical remission of the disease, from Southern Brazilian population .

Oxidative stress markers	r <sup>2</sup>	p value <sup>a</sup>
<b>Pro-oxidant molecules</b>		
Hydroperoxide	0.1201	0.0683
Carbonyl protein	0.0722	0.0810
Nox	0.0629	0.7106
<b>Antioxidant defenses</b>		
Sulfhydryl group	0.0812	0.0318
TRAP	0.0099	0.0344

**NOx**: nitric oxide metabolites; **TRAP**: total radical-trapping antioxidant parameter  
a: multivariate analysis, p<0.05

**Figure 1** - Oxidative stress evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) in patients with multiple sclerosis (MS). The results were expressed in counts per minute (cpm).



## 4.2 ARTIGO 2: INSULIN RESISTANCE AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS ARE ASSOCIATED WITH DISABILITY IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

### **Artigo 2: Insulin resistance and cardiovascular risk factors are associated with disability in multiple sclerosis patients**

Sayonara Rangel Oliveira<sup>1</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>1</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2\*</sup>, Damácio Ramon Kaimen-Maciel<sup>3</sup>, Helena Kaminami Morimoto<sup>2</sup>, Josiane Lopes<sup>1</sup>, Elaine Regina Delicato de Almeida<sup>2</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>

#### **Abstract**

Increased frequency of cardiovascular disease is reported in patients with multiple sclerosis (MS), and cardiovascular risk factors such as insulin resistance (IR), dyslipidemia, hypertension, and inflammation can be involved. The aim of this study was to evaluate the prevalence of IR, cardiovascular risk factors, and inflammatory mediators in MS patients, and to verify the association between these biomarkers and clinical disability of the patients. The study enrolled 111 MS patients from the Neurology Outpatient of the Outpatient Clinical Hospital, Londrina, Paraná, Southern Brazil. The severity of MS was assessed by Extended Disability Status Scale (EDSS). The control group was constituted by 191 healthy blood donors from Regional Blood Bank of Londrina. The individuals were controlled by age, gender, ethnicity, smoking, and body mass index (BMI). Demographic, anthropometrical, clinical, and therapeutic data were obtained from the hospital and blood bank records. Biochemical serum biomarkers evaluated were total cholesterol, low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL), triglycerides, plasma levels of glucose, and insulin. IR was evaluated by *homeostasis model assessment* (HOMA-IR) and was detected when HOMA-IR  $\geq$  2.5. Nitric oxide metabolites (NOx) were also measured. The inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 17 (IL-17), and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) were determined by enzyme linked immunoassay. MS patients showed higher diastolic blood pressure ( $p=0.005$ ), total cholesterol ( $p=0.005$ ), LDL-cholesterol ( $p=0.003$ ), triglycerides ( $p=0.003$ ), and lower HDL-cholesterol ( $p=0.038$ ) than controls. Plasma levels of glucose did not differ among the individuals ( $p=0.426$ ); however, MS patients presented higher values of insulin ( $p<0.0001$ ), HOMA-IR ( $p<0.0001$ ), and

<sup>1</sup> Postgraduation Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina

<sup>2</sup> Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina

<sup>3</sup> Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil

\* Corresponding author: Andrea Name Colado Simão, PhD. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Robert Koch Avenue # 60, Bairro Cervejaria, State University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 2321 E-mail: deianame@yahoo.com.br

2.78 times more chance for developing IR than controls (*odds ratio*: 2.781, 95% confidence interval 1.723-4.801,  $p < 0.0001$ ). In addition, serum levels of IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$  were also higher among MS patients than controls ( $p = 0.0009$ ,  $p = 0.0377$ ,  $0.0379$ , respectively). The multivariate analysis showed that total cholesterol, HDL-cholesterol, insulin, and plasma levels of NOx were associated with the presence of MS in individuals evaluated ( $p = 0.0004$ ,  $p = 0.0383$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  respectively). Moreover, the multivariate analysis also showed that total cholesterol, LDL-cholesterol, insulin, and HOMA-IR were associated with the disability of MS patients ( $p = 0.0367$ ,  $p = 0.0449$ ,  $p = 0.0238$ ,  $p = 0.0304$ , respectively). These results underscore that inflammatory processes and metabolic abnormalities play an important role in the pathophysiology and progression of MS and could explain, in part, the high IR prevalence and cardiovascular risk factors in these patients. Considering that IR in MS patients could contribute to the cognitive impairment, the results reinforce the importance of monitoring the metabolic profile in these patients to prevent cardiovascular risk factors and to treat comorbidities that may be related with MS progression.

**Keywords:** Insulin resistance. cardiovascular risk factors. multiple sclerosis. Inflammation. Disability. EDSS. cytokines.

## 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and progressive immune-mediated disease of central nervous system (CNS), characterized by selective and coordinated inflammatory destruction of the myelin sheath, with damage to the axon (Sayre et al., 2008).

It was shown that patients with MS have about 30% higher risk of death by cardiovascular disease than general population (Koch-Henriksen et al., 1998; Bronnum-Hansen et al., 2004). One study reported that the most frequent comorbidities in MS patients were hypercholesterolemia and hypertension (Marrie et al., 2008). The increased frequency of cardiovascular comorbidities in MS patients might be mediated by hypertension, dyslipidemia, insulin resistance (IR), and inflammation. Moreover, vascular comorbidity was associated with increased disability progression of MS patients (Marrie et al., 2010).

Hypertension is a common comorbidity among MS patients and has been reported in recent study (Mondrego; Gazelle, 2012). In addition, hypertension is associated with increase cognitive decline and brain atrophy in MS patients (Marrie et al., 2010). Moreover, dyslipidemia have been observed in MS patients and it was associated with an increased risk for disability progression (Weinstock-Guttman et al., 2011) evaluated by the Extended Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983).

Approximately half of all MS patients develop cognitive impairment, and the severity of this impairment predicts the quality of life of MS patients (Amato et al., 2001; Boholz & Rao, 2003). There are evidences that abnormalities in insulin may be of particular importance in MS due the role of insulin in CNS (Watson; Craft, 2006). Studies have suggested that cognitive deficits may be related, in part, to changes in neurotransmitters such as insulin, a hormone that also regulates key processes such as neuronal survival and longevity, as well as learning and memory (Olefsky & Glass, 2010). However, little information is registered about IR in MS patients.

There are several mechanisms by which these metabolic changes in MS patients could be explained, such as chronic inflammation and using of therapeutic drugs for treatment of MS patients (Imitola, 2005; Watson and Craft, 2006). The chronic inflammatory process is closely linked with metabolic changes observed in MS patients. Several pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), and interleukin 17 (IL-17) were found to be increased in fluid biological of MS patients (Stelmasiak et al., 2001; Chen et al., 2012). In addition, immunohistological studies have shown increase on expression of cytokines and their receptors in MS patients (Matusevicius et al., 1999). Elevated serum concentration of key inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , are associated with development of IR (Bastard et al., 2006). Moreover, the possible influence of therapeutic drugs for treatment of MS patients in the metabolic parameters evaluated cannot be disregarded.

At the present moment, there are no studies that evaluated the prevalence of IR in MS patients. Thus, to clarify this issue, the aim of this study was to evaluate the prevalence of IR, cardiovascular risk factors, and inflammatory mediators in MS patients, and to verify the association between these biomarkers and clinical disability of the MS patients.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Subjects**

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of State University of Londrina. All individuals that were invited to

participate in the study were informed in detail about the research and a voluntary written consent form was obtained from those that were enrolled. The study included consecutively 111 patients with MS selected from the Neurology Outpatient Clinic of University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Southern Brazil. All of them were diagnosed with MS according to the McDonald revised criteria (Polman et al., 2005) and were classified into relapsing remitting MS (RR-MS), secondary progressive MS (SP-MS), and primary progressive MS (PP-MS). Patients with clinically isolated syndrome (CIS) and with neuromyelitis optica were not included. MS patients were clinically evaluated towards disability progression of disease using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983) and were dichotomized into two groups based on EDSS values  $\leq 3.5$  and  $> 3.5$  (Russo et al., 2008). The control group was composed by 191 healthy individuals from the same geographic area and all the individuals did not present either clinical or laboratory characteristics of autoimmune, renal, heart, liver disease or type 2 diabetes mellitus, and reported were not using anti-inflammatory drugs, estrogen replacement therapy, drugs for hyperglycemia, or any drugs that affect the metabolic profile. Information on lifestyle factors and medical history were obtained at clinical evaluation. Nutritional status of patients was similar to that of the control individuals and none of the subjects were receiving a specific diet. The patients that presented, simultaneously, MS and type 2 diabetes mellitus at the enrollment were excluded from the study. Moreover, all individuals enrolled in the study reported that they did not drink alcohol and no practice physical activity regularly. The individuals were gender, ethnicity, smoking, age, and body mass index (BMI) matched.

## **2.2 Anthropometric and Blood Pressure Measurements**

BMI was calculated as weight (kg) divided by square of height ( $m^2$ ), and waist circumference (WC) was measured at the umbilical levels. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured and expressed as mmHg. The mean of two blood pressure measurements taken with a minute interval between them after the subjects had been seated was used for the statistical analysis.

### 2.3 Metabolic and Inflammatory Biomarkers

Peripheral blood samples were collected after fasting for 12 hours. The metabolic biomarkers were evaluated by serum levels of lipides (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides) and by plasma glucose using Dade Behring™ reagents in a biochemical autoanalyzer (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Plasma insulin levels were determined by chemiluminescence microparticle immunassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$ ) were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial immunoassay (ELISA Ready-SET-Go! Set, eBioscience, San Diego, California, USA). The nitric oxide metabolites (NOx) plasma levels were assessed by nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration according to Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium and the results were expressed in  $\mu$ M (Panis et al., 2011).

The homeostasis model assessment (HOMA) was used as a surrogate measurement of insulin sensitivity (Haffner et al., 1997). HOMA for IR was calculated by the insulin fasting ( $\mu$ U/mL) x glucose fasting (nmol/L)/22.5. It was considered IR when subjects had HOMA-IR  $\geq$  2.5.

### 2.4 Statistical Analysis

The sample size was calculated with the Statcalc Program from Epi Info version 6.04d and the data were evaluated by the statistical analysis programs Graph Pad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) and GraphPad InStat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Distribution of gender, ethnicity, and smoking was analyzed by Chi-square test. Comparisons between healthy subjects and patients with MS were done using Mann-Whitney test. The data were expressed as median (interquartile range 25%-75%). Odds ratio (OR) and 95% confident interval (CI) were also calculated. To determine which factors were independently associated with MS and EDSS, the variables that presented  $p <$

0.10 in the univariate analyses and those values with supposed clinical relevance were included in the multivariate logistic regression model. The results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Demographic and anthropometric characteristics of MS patients and controls are shown in table 1. There was no difference between the groups related to gender, ethnicity, smoking, age, BMI, WC, and SBP ( $p > 0.05$ ). However, MS patients presented higher DBP than controls ( $p = 0.005$ ). Clinical characteristics of the MS patients are shown in table 2. Among MS patients, 98 (88.3%) were RR-MS and 82 (73.9%) were using IFN- $\beta$  (1a or 1b). The median duration of disease was of 5 years (interquartile range: 2-10 years). The EDSS scores ranged from 0 to 8 (median 2.75) and 81 (73.0%) MS patients had EDSS  $\leq 3.5$ .

In relation to metabolic and inflammatory biomarkers (table 3), MS patients showed higher serum levels of total cholesterol ( $p = 0.005$ ), LDL-cholesterol ( $p = 0.003$ ), triglycerides ( $p = 0.003$ ), and lower serum levels of HDL-cholesterol ( $p = 0.038$ ) than controls. Although the plasma glucose levels did not differ between the groups ( $p = 0.426$ ), the MS patients showed significant higher values of plasma insulin ( $p < 0.0001$ ) and HOMA-IR ( $p < 0.0001$ ) than controls.

TNF- $\alpha$  serum levels did not differ among the individuals ( $p > 0.05$ ). However, the serum levels of IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$  were higher among MS patients than controls ( $p = 0.0009$ ,  $p = 0.0377$ ,  $0.0379$ , respectively). The NOx plasma levels obtained among MS patients were lower than those obtained among healthy controls ( $p < 0.0001$ ), as showed in figure 1. The prevalence of IR in MS patients and controls is shown in figure 2. Among 111 patients, 48 (43.2%) presented HOMA-IR  $\geq 2.5$ ; 63 (56.8%) presented HOMA-IR  $< 2.5$ . In the control group, 40 (20.9%) presented HOMA-IR  $\geq 2.5$  and in 151 (79.1%), the HOMA-IR was  $< 2.5$  (OR= 2.781, 95% CI: 1.723- 4.801,  $p < 0.0001$ ).

The multivariate analysis showed that the cardiovascular risk factors including total cholesterol, HDL-cholesterol, and insulin, and the plasma levels of NOx were associated with the presence of MS in the individuals evaluated ( $p = 0.0004$ ,  $p = 0.0383$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  respectively), as showed in table 4. Moreover, the multivariate analysis also showed that cardiovascular risk factors

including total cholesterol, LDL-cholesterol, insulin, and HOMA-IR were associated with the disability of MS evaluated by EDSS ( $p=0.0367$ ,  $p=0.0449$ ,  $p=0.0238$ ,  $p=0.0304$ , respectively), as showed in table 5.

#### **4. Discussion**

In the present study, MS patients presented almost three times higher prevalence of IR than controls; and increase of cardiovascular risk factors such as hypertension and dyslipidemia. The strength of this study was the association obtained between dyslipidemia, insulin levels, and HOMA-IR with the disability evaluated by EDSS in MS patients, obtained by multivariate analysis. These results underscore that the progression of disease is closely associated with these metabolic changes. Moreover, biochemical parameters such as dyslipidemia, insulin and NOx were associated with the presence of the MS.

MS patients showed increase in DBP and reduction in the plasma levels of NOx when compared with healthy controls. Nitric oxide (NO) has been considered the principal mediator of vasodilatation caused by endothelial cells, with a major role in regulating blood pressure, and the deficient of its bioactivity is an important factor for hypertension (Simão et al.,2012). In agreement with previous study (De Bustos, 1999), the present data also showed that MS patients had lower serum NOx levels than controls. This result could be explained, in part, by therapies such as IFN- $\beta$  that decreases the induced-NO synthesis in a dose-dependent manner by inhibiting the inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Guthikonda et al., 1998). In this study, 82 (73.9%) patients with MS were using IFN- $\beta$  (1a or 1b) and this fact should influence the results obtained.

The present study also showed that MS patients had significant changes in the lipid profile demonstrated by higher total cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides, and lower serum levels of HDL-cholesterol than controls. Dysregulated lipid metabolism may be of particular importance for CNS injuries and neurodegenerative diseases such as MS, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease (Adibhatla and Hatcher, 2008). One previous study showed that worsening EDSS changes were correlated with increased total cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides (Weinstock-Guttman et al., 2011). Our data showed that the dyslipidemia observed in MS patients was associated with both the presence of MS

and EDSS, suggesting that changes in lipid profile may be involved in the clinical progression of MS.

The carbohydrate metabolism was also changed in MS patients, revealed by the higher insulin plasma levels and HOMA-IR values than control subjects. These patients presented 2.78 times more chances for developing IR than control group. Insulin and HOMA-IR were also associated with EDSS. The IR seems to be involved with develop cognitive impairment in MS and evidences suggest that insulin contributes to normal brain functioning and that peripheral insulin abnormalities increase the risk for memory loss and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and MS (Watson; Craft, 2006).

Some factors could explain the results obtained in the present study, such as the chronic inflammatory process, the dyslipidemia, and the use of therapeutic drugs for treatment of the MS patients. Chronic inflammation process mediated by cytokines leads to changes in lipid metabolism and IR (Esteve et al., 2005). Evidences strongly suggest that inflammation, in particular the microglia activation, is responsible for the release of large variety of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6, and IFN- $\gamma$  (Gonsette, 2008, Kawanokuchi et al, 2008). In humans, the expression of TNF- $\alpha$  in the CNS is significantly up-regulated in MS lesions and is expressed by macrophages, microglia, and astrocytes in chronic active lesions (Imitola et al., 2005). Previous studies demonstrated that TNF- $\alpha$  may have an important role in the IR by multiple mechanisms, such as the downregulation of genes that are required for normal insulin action and direct effects on insulin signaling (Moller, 2000). However, in the present study, differences were not observed between the TNF- $\alpha$  serum levels of MS patients and controls. This apparent discrepancy could be explained by some factors. First, the serum levels of the TNF- $\alpha$  do not represent the concentration of this cytokine locally produced in the site of inflammation (Aggarval & Natarajan, 1996). Second, the detectable serum levels of TNF- $\alpha$  do not take into account the membrane-bound form of TNF- $\alpha$ , which is up regulated on many cells including endothelial cells and leukocytes during inflammation processes (Mira et al., 1999).

In agreement with previous study, significant increase of IL-6 was found in the serum of MS patients (Stelmasiak et al., 2001). Probably, elevated concentration of IL-6 may also have contributed to the IR in these patients. It has

been postulated that increased IL-6 production might be involved in the IR through a variety of molecular mechanisms (Bastard et al., 2002). Both TNF- $\alpha$  and IL-6 can alter insulin sensitivity by triggering different key steps in the insulin signaling pathway (Bastard et al., 2002; Bastard et al., 2006).

In the present study, MS patients showed higher plasma levels of IL-17 than controls. This cytokine has been associated with various autoimmune diseases, although its regulation and action mechanisms remain to be clarified (Kawanokuchi et al., 2008). There are evidences that IL-17 may be involved with induced hypertension. Previous study carried out by Madhur et al. (2010) suggested that IL-17 promotes vascular inflammatory response and is a critical mediator of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. In addition, the authors demonstrated that hypertensive individuals had a greater than 3-fold increase in serum IL-17 when compared with controls normotensive. Therefore, there is growing evidence that IL-17 contributes to atherosclerotic vascular disease (Vietinghoff & Ley, 2010).

Regard to IFN- $\gamma$ , MS patients also presented increased in this inflammatory cytokine. Evidence showed that IFN- $\beta$ , therapy used by most of the MS patients, induces down-regulation of the number of circulating T cells secreting IFN- $\gamma$  (Imitola, 2005). IFN- $\gamma$  is a cytokine of Th1 axis and previous report shows that IFN- $\gamma$  also downregulates the insulin response (McGillicuddy et al., 2009).

The treatment with IFN- $\beta$  influences on the pattern of cytokine in MS patients either by the upregulating of the production of anti-inflammatory mediators or by decreasing the pro-inflammatory cytokines secretion (Sega et al., 2004). Although 73.9% of MS patients evaluated in this cohort were using IFN- $\beta$ -1b, the data obtained in this study showed an increase in the serum levels of pro-inflammatory cytokines including IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$ .

In addition to the chronic inflammatory processes mediated by cytokines, the role of corticosteroid therapy in IR cannot be disregard. It possible that the use of corticosteroids could influenced the metabolic parameters assessed in the present study. However, only 17 (15.3%) patients with MS were using corticosteroid therapy during 2 a 4 weeks when they were evaluated and 48 (43.2%) presented HOMA-IR  $\geq$  2.5, the cutoff value considered as IR. These data show that the corticosteroid therapy is not the only factor involved in the development of IR in these patients.

Some limitations of this study should be discussed such as the influence of IFN- $\beta$  on the pattern of cytokines in MS patients. Moreover, studies of cytokines in humans are limited to indirect measurement of these mediators in plasma or serum samples instead of cytokines expression in tissues or culture cells.

All together, the results demonstrated that MS patients evaluated in this cohort had increase cardiovascular risk factors, such as hypertension, dyslipidemia, IR, and chronic inflammatory processes, and some of these factors, dyslipidemia and IR, are strongly associated with disability of patients. Moreover, MS patients had increase prevalence of IR with 2.7 times more chances for developing this comorbidity than control group. The metabolic changes observed in MS patients seem to be, in part, attributed to the cytokine patterns and the use of therapy for MS treatment. The data underscore the importance of monitoring metabolic profile in MS patients to prevent and/or to treat further cardiovascular comorbidities that may be related with disease progression.

## **Acknowledgments**

The study was supported by grants from Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); State University of Londrina (PROPPG); and Bayer HealthCare. We thank the State University of Londrina, the University Hospital of Londrina, and HUTEc for technical and administrative support.

**Conflict of Interest Statement:** All the authors declare that there is no conflict of interest.

## **References**

- 1 Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21:172-88
- 2 Koch-Henriksen N, Bronnum-Hansen H, Stenager E. Underlying cause of death in Danish patients with multiple sclerosis: results from the Danish Multiple Sclerosis Registry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 56–9.
- 3 Bronnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127: 844–50.

- 4 Marrie RA, Hortwitz R, Cutter G, Tyry T, Campagnolo D, Vollmer T. Comorbidity, socioeconomic status and multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008; 14:1091-8.
- 5 Marrie RA, Rudick R, Horwitz R, Cutter G, Tyry T, Campagnolo D, Vollmer T. Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010; 74: 1041-47.
- 6 Modrego P, Gazulla J. Arterial hypertension induced by interferon- $\beta$  1a in patient with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012. In press
- 7 Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, Carl E, Drake A, Schneider J, Teter B, Hussein S, Mehta B, Weiskopf M, Durfee J, Bergsland N, Ramanathan M. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 2011; 8: 1-7.
- 8 Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–52.
- 9 Amato MP, Ponziani G, Siracusa G, Sorbi S. Cognitive dysfunction in early-onset multiple sclerosis: a reappraisal after 10 years. *Arch. Neurol.* 2001; 58: 1602-06.
- 10 Bobholz JA, Rao S.M. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr. Opin. Neurol.* 2003; 16: 283–8.
- 11 Watson GS, Craft S. Insulin resistance, inflammation, and cognition in Alzheimer's Disease: Lessons for multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2006; 245: 21-33.
- 12 Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 219-46.
- 13 Imitola J, Chitnis T, Houry S J. Cytokines in Multiples Sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol. Ther.* 2005;106:163-77.
- 14 Stelmasiak Z, Koziol Montewka M, Dobosz B, Rejdak K. IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients. *Med Sci Monit* 2001; 7: 914-8.
- 15 Chen YC, Chen SD, Miao L, Liu ZG, Li W, Zhao ZX, Sun XJ, Jiang GX, Cheng Q. Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012; 243: 56-60.
- 16 Matusевичius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis *Mult Scler.* 1999; 5: 101-4.
- 17 Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Fève B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:4-12.
- 18 Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ,

- Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: Revisions to the "Mc-Donald Criteria". *Ann. Neurol.* 2005; 58: 840-46.
- 19 Russo C, Morabito F, Luise F, Piromalli A, Battaglia L, Vinci A, Trapani Lombardo V, De Marco V, Morabito P, Condino F, Quattrone A, Aguglia U. Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2008; 255: 64-9.
  - 20 Panis C, Lemos LG, Victorino VJ, Herrera AC, Campos FC, Colado Simão AN, Pinge-Filho P, Cecchini AL, Cecchini R. Immunological effects of taxol and adriamycin in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2011(in press) DOI 10.1007/s00262-011-1117-0
  - 21 Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in San Antonio Heart Study. *Diabetes Care.*1997; 20: 1087-92.
  - 22 Simão AN, Lozovoy MA, Bahls LD, Morimoto HK, Simão TN, Matsuo T, Dichi I. Blood pressure decrease with ingestion of a soya product (kinako) or fish oil in women with the metabolic syndrome: role of adiponectin and nitric oxide. *Br J Nutr.* 2012;8:1-8.
  - 23 De Bustos F, Navarro JA, De Andres C, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Ortí-Pareja M, Gasalla T, Tallón-Barranco A, Martínez-Salio A, Arenas J. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1999; 41: 44-7.
  - 24 Guthikonda P, Baker J, Mattson DH. Interferon-beta-1-b (IFN- $\beta$ ) decreases induced nitric oxide (NO) production by a human astrocytoma cell line. *J Neuroimmunol* 1998; 82: 133-39.
  - 25 Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered Lipid Metabolism in Brain Injury and Disorders. *Subcell. Biochem.* 2008; 49: 241–268.
  - 26 Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin. Nutr.* 2005; 24: 16-31.
  - 27 Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci.* 2008;274:48-53.
  - 28 Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol.* 2008;194:54-61.
  - 29 Moller DE. Potential Role of TNF- $\alpha$  in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11: 212-217.
  - 30 Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* 1996; 7:93-124.
  - 31 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF.

- Association of TNF2, a TNF- $\alpha$  promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a Multicenter Study, *JAMA* 1999; 282: 561-568.
- 32 Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2084-9.
- 33 Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2010;55:500-7.
- 34 Vietinghoff SV, Ley K. Interleukin 17 in vascular inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010; 21: 463-69.
- 35 McGillicuddy FC, Chiquoine EH, Hinkle CC, Kim RJ, Shah R, Roche HM, Smyth EM, Reilly MP. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J Biol Chem.* 2009; 284:31936-44.

**Table 1** - Demographic and anthropometric characteristics of patients with multiple sclerosis (MS) and healthy individuals (controls) from Southern Brazilian population

	<b>MS Patients (n= 111)</b>	<b>Controls (n= 191)</b>	<b>p value</b>
<b>Gender n (%)<sup>a</sup></b>			
Female	80 (72.1)	150 (78.5)	0.203
Male	31(27.9)	41 (21.5)	
<b>Ethnicity n (%)<sup>a</sup></b>			
Caucasian	88 (79.3)	153 (80.1)	0.863
No Caucasian	23 (20.7)	38 (19.9)	
<b>Smoking n (%)<sup>a</sup></b>			
Yes	14 (12.6)	21 (11.0)	0.671
No	97 (87.4)	170 (89.0)	
<b>Age (years)<sup>b</sup></b>	39.5 (29.0-49.0)	36.0 29.0-44.0	0.064
<b>Body Mass Index (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>b</sup></b>	24.11 (20.97-27.85)	24.32 (21.77-27.68)	0.939
<b>Waist circumference (cm)<sup>b</sup></b>	87.5 (82.0-98.7)	89.0 (81.0-97.0)	0.946
<b>SBP (mmHg)<sup>b</sup></b>	112 (103-121)	111 (100-125)	0.374
<b>DBP (mmHg)<sup>b</sup></b>	75 (70-80)	71 (64-80)	0.005

<sup>a</sup> Chi-square test, <sup>b</sup> Mann-Whitney test. Data are expressed as median (25% - 75%).  
**SBP**: Systolic blood pressure; **DBP**: Diastolic blood pressure

**Table 2** - Clinical characteristics of patients with multiple sclerosis (MS) from Southern Brazilian population.

	<b>MS patients (n=111)</b>	<b>Frequency %</b>
<b>Clinical forms</b>		
Relapsing-remitting	98	88.3
Secondary progressive	11	9.9
Primary progressive	2	1.8
<b>Therapy</b>		
Interferon $\beta$ (1a or 1b)	82	73.9
Glatiramer acetate	11	9.9
Natalizumab	2	1.8
Corticosteroid	17	15.3
Other immunosuppressive	9	8.1
Azathioprine	7	6.3
<b>EDSS scores</b>		
	2.75 (0-8)	
$\leq 3.5$	81	73.0
$> 3.5$	30	27.0

Data are expressed median (25%-75%). **EDSS**: Extended Disability Status Scale

**Table 3** - Metabolic biomarkers of patients with multiple sclerosis (MS) and control healthy individuals from Southern Brazilian population.

<b>Biomarker</b>	<b>MS Patients (n= 111)</b>	<b>Controls (n=191)</b>	<b>p value</b>
<b>Total-Cholesterol (mg/dL)</b>	199.0 (176.0-234.0)	191.0 (165.0-212.0)	0.0050
<b>LDL- cholesterol (mg/dL)</b>	123.0 (104.0-146.0)	113.6 (89.0-133.8)	0.0030
<b>HDL- cholesterol (mg/dL)</b>	52.0 (43.0 -63.0)	55.0 (47.0-64.0)	0.0380
<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	105.0 (70.0- 153.0)	82.0 (60.0-124.0)	0.0030
<b>Fasting plasma glucose (mg/dL)</b>	89.0 (84.0 -95.0)	88.0 (83.0-95.0)	NS
<b>Fasting serum insulin (<math>\mu</math>U/mL)</b>	9.90 (7.40- 14.80)	7.15 (5.02- 10.40)	< 0.0001
<b>HOMA-IR</b>	2.32 (1.54-3.31)	1.51 (1.06-2.29)	< 0.0001
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	2.00 (2.00-3.50)	2.00 (2.00-11.0)	NS
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	2.40 (1.20-4.20)	1.20 (1.00-3.50)	0.0009
<b>IL-17 (pg/mL)</b>	2.00 (2.00-2.60)	2.00 (2.00-2.00)	0.0370
<b>IFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</b>	43.30 (25.60-65.65)	25.10 (12.50-108.40)	0.0370

Mann-Whitney test. Data are expressed as median (25% to 75%). **LDL**: Low-density lipoprotein; **HDL**: High-density lipoprotein; **HOMA-IR**: Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance; **TNF- $\alpha$** : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; **IL-6**: interleukin 6; **IL-17**: interleukin 17; **IFN- $\gamma$** : Interferon- $\gamma$ ; **NS**: not significant

**Table 4 -** Multivariate analysis between cardiovascular risk factors and nitric oxide metabolites (NOx) and the presence of multiple sclerosis

<b>Variables</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p value</b>
<b>Total Cholesterol</b>	0.2091	0.0004
<b>HDL-Cholesterol</b>	0.1007	0.0383
<b>Insulin</b>	0.0639	<0.0001
<b>NOx</b>	0.0383	<0.0001

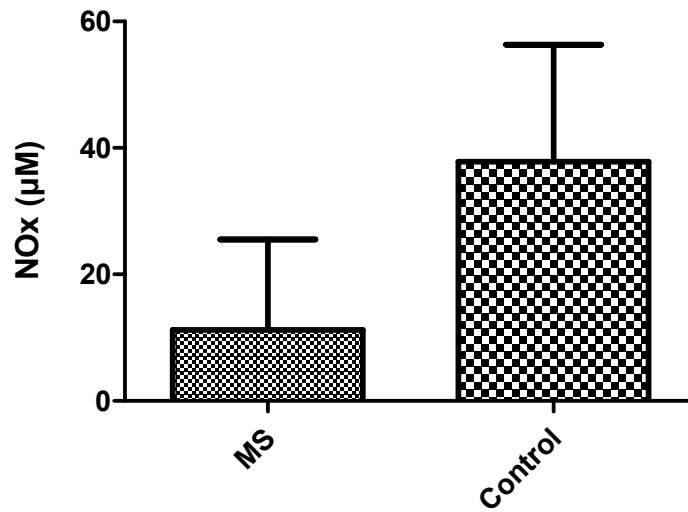
Multivariate analysis,  $p < 0.05$ . HDL: High-density lipoprotein.

**Table 5** - Multivariate analysis between Expanded Disability Status Scale (EDSS) and cardiovascular risk factors obtained in multiple sclerosis patients from Southern Brazilian population.

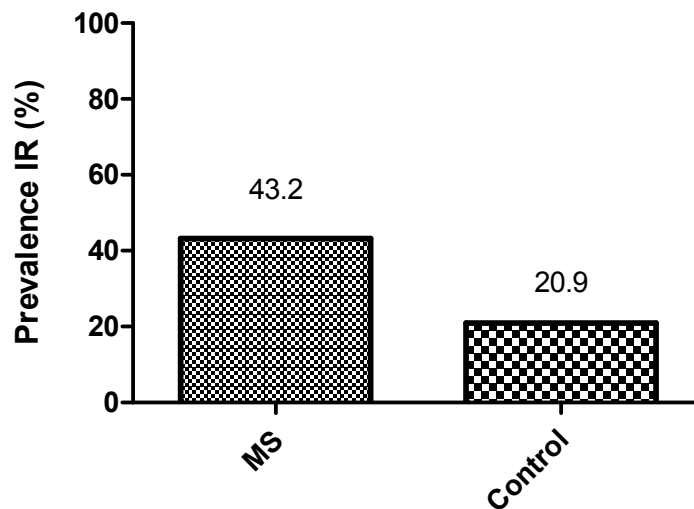
<b>Variables</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p value</b>
<b>Total Cholesterol</b>	0.7265	0.0367
<b>LDL-Cholesterol</b>	0.7316	0.0449
<b>Insulin</b>	0.8421	0.0238
<b>HOMA-IR</b>	0.8468	0.0304

Multivariate analysis,  $p < 0.05$ . **LDL**: Low-density lipoprotein; **HOMA-IR**: Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance.

**Figure 1** - Plasma levels of nitric oxide metabolite (NOx) in patients with multiple sclerosis (MS) and control healthy individuals from Southern Brazilian population ( $p < 0.0001$ ). Mann-Whitney test.



**Figure 2** - Prevalence of insulin resistance (IR), evaluated by Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance (HOMA-IR  $\geq 2.5$ ) in patients with multiple sclerosis (MS) and healthy controls from Southern Brazilian population. Chi-square test. Odds ratio: 2.781 (95% Confidence interval: 1.723- 4.801,  $p < 0.0001$ ).



## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que :

- Os pacientes com EM apresentaram níveis plasmáticos aumentados de hidroperóxidos lipídicos ( $p < 0,0001$ ), proteínas carbonílicas ( $p = 0,0217$ ) e diminuídos de NOx ( $p < 0,0001$ ), grupamento sulfidríla de proteínas ( $p = 0,0004$ ) e TRAP ( $p = 0,0001$ ) quando comparados com o grupo controle. Estes resultados confirmam aumento do estresse oxidativo, evidenciado pelos níveis elevados de marcadores do dano oxidativo (lipídico e proteico) e diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante;
- Foi obtida uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos e os valores de EDSS ( $r = 0,212$ ,  $p = 0,014$ ) e entre proteínas carbonílicas e EDSS ( $r = 0,221$ ,  $p = 0,035$ ), sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na progressão da doença.
- Pacientes com EM mostraram níveis séricos elevados de colesterol total ( $p = 0,005$ ), LDL-colesterol ( $p = 0,003$ ), triglicerídeos ( $p = 0,003$ ) e diminuídos de HDL-colesterol ( $p = 0,038$ ) comparados ao grupo controle. Além disto, apresentaram níveis mais elevados de insulina ( $p < 0,0001$ ), HOMA-IR ( $p < 0,0001$ ) e uma frequência de RI de 2,8 vezes maior nos pacientes com EM que no grupo controle (*odds ratio*: 2,781; IC 95%: 1,723-4,801,  $p < 0,0001$ ). Estes resultados confirmam que os os pacientes com EM apresentam alterações no perfil lipídico e glicêmico.
- Os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$  foram mais elevados nos pacientes com EM ( $p = 0,0009$ ,  $p = 0,0377$ ,  $p = 0,0379$ , respectivamente) do que nos controles, confirmando o envolvimento do processo inflamatório crônico mediado pelas citocinas inflamatórias na fisiopatologia da EM.
- Os fatores de risco cardiovascular como dislipidemia, insulina e HOMA-IR mostraram estar associados ao estado de incapacidade dos pacientes com EM quando avaliado pela EDSS.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Pacientes com EM apresentaram aumento persistente do estresse oxidativo evidenciado pelo aumento dos marcadores de dano oxidativo tanto lipídico como protéicos e diminuição das defesas antioxidantes, mesmo não estando no período de surto da doença. A correlação positiva entre os marcadores do estresse oxidativo e o EDSS sugere que o estresse oxidativo exerce importante papel na fisiopatologia da progressão da doença.

De acordo com esses resultados, é importante considerar a viabilidade de associar o uso de antioxidantes como terapia integrativa à terapia convencional no tratamento da EM, uma vez que muitos pacientes não apresentam resposta terapêutica adequada aos medicamentos disponíveis. Este estudo pode ser o primeiro passo para encorajar futuras pesquisas que avaliem o efeito da ingestão de dietas antioxidantes na redução da progressão da doença nos pacientes com EM.

Além disso, alterações significativas nos marcadores bioquímicos foram encontradas nos pacientes com EM, como RI e aumento dos fatores de risco cardiovascular. Os resultados demonstram a importância de se monitorar esses componentes do metabolismo, na tentativa de prevenir futuros eventos cardiovasculares nesta população. Novos estudos devem ser realizados para identificar biomarcadores viáveis que apresentem correlação com atividade e severidade da EM e que contribuam para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento da EM.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2008.
- AMORINI, A.M.; PETZOLD, A.; TAVAZZI, B. et al. Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p.1001-1006, 2009.
- BAGAEVA, L.V.; WILLIAMS, L.P.; SEGAL, B.M. IL-12 dependent/IFN- $\gamma$  independent expression of CCR5 by myelin-reactive T cells correlates with encephalitogenicity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 137, p.109-116, 2003.
- BESLER, H.T.; COMOGLU, S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, p.189-196, 2003.
- BIRNBAUM, G.; ANTEL, J. The immunology of multiple sclerosis. ANTEL, J.; BIRNBAUM, G.; HARTUNG, H.P.; VICENT, A. (editors). In: **Clinical Neuroimmunology**, 2<sup>o</sup> edition, New York: Oxford, 2008, p.185-194.
- CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAES, L. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 104, p.208-213, 2001.
- CONFAVREUX, C; VUKUSIC, S; MOREAU, T; ADELEINE, P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v.343, p. 1430-1438, 2000.
- CONFAVREUX, C; VUKUSIC, S. The clinical, epidemiology of multiple sclerosis. **Neuroimag Clin N Am**, v. 18, p.589-622, 2008.
- DANILOV, A.I.; ANDERSSON, M.; BAVAND, N. et al. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.136, p.112-118, 2003.
- DE BUSTOS, F.; NAVARRO, J.A.; DE ANDRES, C. et al. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. **European Neurology**, v.41, p.44-47, 1999.
- DE GROOT, C.J.; RUULS, S.R.; THEEUWES, C.D. et al. immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.56, p. 10-20, 1997.
- D'HAESELEER, M.; CAMBRON, M.; VANOPDENBOSCH, L. et al. Vascular aspects of multiple sclerosis. **Lancet Neurology**, v.10, p. 657-666, 2011.
- FERRETI, G.; BACCHETTI, T.; PRINCIPI, F. et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. **Multiple Sclerosis**, v. 11, p. 677-682, 2005.

FOUNTOURA, Paulo. Fisiopatologia da Esclerose Múltipla. PEDROSA, Rui (editor). In: **Introdução a Esclerose Múltipla**: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1º Edição. Lisboa:Biogen Indec, 2010, p. 41-66.

FRAGOSO, Y.D.; PERES, M. Prevalence of multiple sclerosis in the city of Santos, São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, p. 479-482, 2007.

FRIEDMAN, J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: GADOTH, N.; GOBEL, H.H. (editors). In: **Oxidative stress and free radical damage in Neurology**. 1ª. edição, New York: Humana Press, 2011, p.19-21.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. **Journal of Neurology**, v. 251, p. 261-268, 2004.

GONZALES-FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, p. 93-100, 1991.

GRECO, A. MINGHETTI, L.; LEVI, G. Isoprostanes, novel markers of oxidative injury help understanding the pathogenesis of neurodegenerative disease. **Neurochemical Research**, v. 25,p.1357-1364, 2000.

HAFFNER, S.M.; MIETTINEN, H.; STERN, M.P. The homeostasis model in San Antonio Heart Study. **Diabetes Care**, v.20, p. 1087-1092, 1997.

HOTAMISLIGIL, G.S.; ARNER, P.; CARO, J.F. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2409–2415, 1993.

HU M-L, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI (eds). **Methods in Enzymology**. California:Academic Press, 1994, pp. 380-382.

IRANI, D.N. Immunological mechanisms in multiple sclerosis. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.5, p.257-269, 2005.

KAIMEN-MACIEL, D.R.; REICHE, E.M.V.; SOUZA, D.G.B. et al. CCR5- $\Delta$  32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v.20, p.337-344, 2007.

KALLAUR, AP ; KAIMEN-MACIEL DR ; MORIMOTO, HK; WATANABE, MAE; GEORGETO, S. M. ; REICHE, E.M. V. Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, p. 467-479, 2011.

KANTARCI, O.H.; MORALES, Y.;ZIEMER,P.A. et al. CCR5  $\Delta$  32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.169, p.137-143, 2005.

- KENNEDY, K.J.; STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L. et al. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1a and monocyte chemoattractant protein-1. **Journal of Neuroimmunology**, v. 92, p. 98–108, 1998.
- KOCH, M.; MOSTERT, J.; ARUTJUNYAN, A.V. et al. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**, v. 14, p.529-533, 2007.
- KRAKAUER, M.; SORENSEN, P.; KHADEMI, M. et al. Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. **Multiple Sclerosis**, v.14, p.622-630, 2008.
- KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v. 33, p.1444–1452, 1983.
- LUCCHINETTI, C; BRÜCK, W; PARISI, J. et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol.**, v.47, p.707-717, 2000.
- MAHAD, D.J.; TRAPP, B.D.; RANSOHOFF, R.M. Tissue pathology of multiple sclerosis. ANTEL, J.; BIRNBAUM, G.; HARTUNG, H.P.; VICENT, A. (editors). In: **Clinical Neuroimmunology**, 2<sup>o</sup> edition, New York, Oxford, 2008, p.173-183, 2008.
- MARRIE, R.A.; RUDICK, R.; HORWITZ, R. et al. Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 74, p.1041-1047, 2010.
- MCDONALD W. I.; COMPSTON, A.; EDAN, G.; et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 50, n. 1, p. 121–7, 2001.
- MILLER, E.; MROWICKA, M.; SALUK-JUSZCZAK, J. et al. The levels of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipoperoxidation in secondary progressive multiple sclerosis. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1012-1016, 2011.
- MILLER, E.; WALCZAK, A.; SALUK, J. et al. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v.45, p.26-30, 2012.
- MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. A387–A394, 2010.
- NAIDDO, B.; KNAPP, M.L. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. **Clinical Chemistry**, v.38, p. 2449-2454, 1992.
- OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. **Annual Review of Physiology**, v.72, p.219-246, 2010.

- PANIS, C.; MAZZUCO, T.; COSTA, C.Z.F. et al. *Trypanossoma cruzi*: Effects of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v.127, p. 58-65, 2011.
- POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; EDAN, G. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: Revisions to the "Mc-Donald Criteria". **Annals of Neurology**, v. 58, p.840-846, 2005.
- POSER, C. M. Multiple sclerosis, observations and reflections-a personal memoir. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 107, p. 127–140, 1991.
- RAIVICH, G.; BANATI, R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. **Brain Research Reviews**, v.46, p.261-281, 2004.
- REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, p. 107-117, 1996.
- REZNICK, A.Z.; PACCKER, L. Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, 233, p.357-363, 1994.
- RUSSO, C.; MORABITO, F.; LUISE, F. et al. Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 255, p. 64-69, 2008.
- SIMÃO, A.N.C; GODENY, P.; LOZOVYOY, M.A.B. et al. Efeito dos ácidos graxos n-3 no perfil glicêmico e lipídico, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante total de pacientes com síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, p.1-7, 2010.
- SIMPSON, J.;REZAIE, P.;NEWCOMBE, J. et al. Expression of the  $\beta$ -chemokine receptors CCR2,CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central system tissue. **Journal of Neuroimmunology**, v.108, p.192-200, 2000.
- SOUZA, A.W.S.; JUNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P. et al. Immune system – Part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v.50, p. 665-694, 2010.
- STEINMAN, L. Multiple sclerosis: a two stage disease. *Nature Immunology*, v. 2, p. 762-764, 2001.
- TONCEV, G.; MILICIC, B.; TONCEV, S. et al. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis increases serum uric acid levels. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 505-508, 2002.
- VAN DAM, A.M.; BAUER, W.K.; MAN-A-HING, C. et al. Appearance of inducible nitric oxide synthase in the rat central nervous system after rabies virus infection and during experimental allergic encephalomyelitis but not after peripheral administration of endotoxin. **Journal of Neuroscience Research**., v.40, p. 251-260, 1995.
- VAN HORSSSEN, J.; SCHREIBELT, G.; DREXHAGE, J. et al. Severe oxidative

damage in multiple sclerosis lesion coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 1729-1737, 2008.

VAN MEETEREN, M.E. TEUNISSEN, C.E.; DIJKSTRA, C.D. et al. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 1347-1361, 2005.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H.L. et al. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p.971-979, 2004.

WATSON, G.S.; CRAFT, S. Insulin resistance, inflammation, and cognition in Alzheimer's Disease: Lessons for multiple sclerosis. **Journal of Neurological Sciences**, v. 245, p. 21-33, 2006.

WEINSTOCK-GUTTMAN, B.; ZIVADINOV, R.; MAHFOOZ, N. et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v.8, p. 1-7, 2011

YUCEYAR, N.; TASKIRAN, D.; SAGDUYU, A. Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v.103,p. 206-211, 2001.

ZAGORSKI, T; DUDEK, I; BERKAN, L. et al. Superoxide dismutase (SOD-1) activity in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 25, p. 725-730, 1991.

**ANEXOS**

## ANEXO A

Parecer do Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da UEL



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
 Registro CONEP 268

<b>Parecer de Aprovação Nº 159/10</b> <b>CAAE Nº 0140.0.268.000-10</b> <b>FOLHA DE ROSTO Nº 355660</b>	Londrina, 30 de agosto de 2010.
<b>PESQUISADORA: EDNA MARIA VISSOCI REICHE</b>	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center"><b>"AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA"</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>APROVADO</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/Uel relatório final da pesquisa.</p>	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center"><b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel</b>          Coordenadora          Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/Uel</p>	

## ANEXO B

### Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes com Esclerose Múltipla

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) para o grupo de pacientes com Esclerose Múltipla**

Por favor, leia cuidadosamente este consentimento e não hesite em perguntar sobre qualquer dúvida que tenha.

Você está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, de um projeto de pesquisa com o título **“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA”**, coordenado pela professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche e com a participação de outros docentes pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina. Cabe ao senhor (a) decidir se pretende participar ou não. Caso não tenha condições de ler e/ou compreender as informações contidas neste termo, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da sua família ou responsável legal.

Você está tendo a opção de participar de uma pesquisa que tem o objetivo de saber quantos pacientes com Esclerose Múltipla apresentam alterações no sangue como exames bioquímicos e os que compõem o estresse oxidativo, com ênfase no estudo da importância e ação dos radicais livres na Esclerose Múltipla. Para participar do projeto, será necessária a coleta dos dados como peso, altura e cálculo do índice de massa corpórea ( $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ ); circunferência abdominal e medida de pressão arterial. Também será necessária a coleta de uma pequena amostra de sangue (20mL) para realização das provas bioquímicas e avaliação do estresse oxidativo. A coleta dos dados e da amostra de sangue será efetuada no mesmo dia em que o senhor (a) será atendido pelo serviço especializado para a realização dos exames de rotina do monitoramento do seu tratamento. Não haverá necessidade de agendar outros dias para coletas específicas para este projeto de pesquisa.

Os dados pessoais fornecidos e os resultados do exame realizado serão mantidos sob sigilo e somente serão utilizados para fins de pesquisa. Durante todas as etapas do projeto, os participantes serão identificados por um número codificado que será utilizado nas análises posteriores para garantir a preservação da integridade do indivíduo, garantir o anonimato e evitar a quebra de confidencialidade. Ao final do projeto, os resultados serão divulgados em forma de artigos científicos e comunicações em eventos científicos, sempre mantendo o sigilo da identidade dos participantes e as amostras de material biológico coletadas serão descartadas em local apropriado de descarte de material biológico (sangue, soro, plasma) dos laboratórios envolvidos, seguindo as normas de biossegurança padronizada no Hospital Universitário.

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tenho nenhuma dúvida sobre sua natureza e os procedimentos, sem risco, aos quais será submetido. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de que será informado sobre os resultados dos exames realizados, de não terá nenhum ônus e de que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou prejuízo algum para

seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou aos familiares pela participação no presente estudo.

Eu estou disposto a participar dessa pesquisa e compreendi as condições acima descritas, concordo voluntariamente a participar desse estudo.

Assinaturas

Paciente ou representante legal (caso o paciente esteja impossibilitado de assinar ou compreender o conteúdo deste TCLE

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local e data: \_\_\_\_\_

Profissional que obteve o TCLE

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local e data: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável

Nome: Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Endereço: Departamento de Patologia, Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440.

Fone: 43-3371-2321 (Imunologia)

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina Fone: 43-3371-2490

## ANEXO C

Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo

## FICHA DE AVALIAÇÃO – ESCLEROSE MÚLTIPLA

Nome:	Prontuário:
Data de nascimento:	Caucasiano ( ) Não Caucasiano ( )
Idade:	
Telefone casa:	
Celular:	
Medicamentos:	Dose diária:
Outras doenças:	

Data:	
Fumante:	
Peso:	
Altura:	
IMC:	
Pressão Arterial:	
Circunferência Abdominal:	
Tempo de diagnóstico:	
Atividade física:	( ) Sim Quantas vezes? ( ) Não

**ANEXO D**  
**Confirmação da submissão do artigo 1**

Dear Andréa,

We have received your article "OXIDATIVE STRESS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS IN CLINICAL REMISSION: ASSOCIATION WITH THE EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE" for consideration for publication in Journal of the Neurological Sciences.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jns/>

2. Enter these login details:

Your username is: Andréa Simão

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/jns/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jns/automail_query.asp)

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Journal of the Neurological Sciences