



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SAYONARA RANGEL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D,
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

SAYONARA RANGEL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D,
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.
Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado
Simão

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48av Oliveira, Sayonara Rangel.

Avaliação dos níveis séricos de vitamina D, marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla / Sayonara Rangel Oliveira. – Londrina, 2016.
88 f.: il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla - Teses. 2. Vitamina D - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Simão, Andréa Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616-004

SAYONARA RANGEL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D,
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO E
NITROSATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. Vinicius Daher Delfino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de abril de 2016

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 ao 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. Damacio Ramón Kaimen-Maciel pelo incentivo e apoio ao desenvolvimento das pesquisas, atuando como facilitador direto para a conclusão deste trabalho.

A todos os demais participantes da nossa equipe de trabalho, em especial às professoras Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida e Dra. Helena Kaminami Morimoto e às pós-graduandas Ana Paula Kallaur, Daniela Frizon Alfieri e Tamires Flauzino que contribuíram para a realização deste trabalho.

OLIVEIRA, Sayonara Rangel. **Avaliação dos níveis séricos de vitamina D marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla.** 2106. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Introdução: Esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante, imuno-mediada, com envolvimento de muitos processos lesivos e de etiologia desconhecida. A identificação de novos preditores da doença para auxiliar no diagnóstico, prognóstico, classificação das formas clínicas ou monitoração da eficácia terapêutica é de grande importância devido à heterogeneidade clínica e complexidade da EM.

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis séricos de vitamina D e marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com EM.

Materiais e Métodos: Foram avaliados 258 pacientes com EM atendidos no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, e 249 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. A incapacidade dos pacientes foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS). O estresse oxidativo foi avaliado pela formação de hidroperóxidos lipídicos iniciada por t-butil (CL-LOOH), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), dosagem de proteínas carbonílicas, determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) e capacidade antioxidante total do plasma corrigidos pelo ácido úrico (TRAP/AU). Os marcadores inflamatórios analisados foram proteína C reativa (PCR), albumina, proteínas totais e ferritina. Os níveis séricos de 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] foram quantificados por quimioluminescência e os pacientes com EM foram categorizados em 2 grupos: 25(OH)D \geq 20 ng/mL (status não deficiente de vitamina D) e $<$ 20 ng/mL (status deficiente de vitamina D).

Resultados: Pacientes com EM eram mais velhos que os indivíduos do grupo controle ($p < 0,0001$), e os marcadores ferritina e CL-LOOH apresentaram associação positiva com EM e podem ser considerados preditores da doença [odds ratio (OR): 1,006; 95% intervalo de confiança (IC): 1,003-1,009, $p < 0,001$, e OR: 1,029, 95% IC: 1,007-1,052, $p = 0,009$, respectivamente)]. Outros marcadores como albumina, TRAP/AU, AOPP e NOx apresentaram associação negativa com EM ($p = 0,019$, $p = 0,003$, $p = 0,001$, e $p = 0,003$, respectivamente). A regressão logística ajustada pela idade mostrou que pacientes com formas progressivas da EM apresentaram níveis séricos diminuídos de albumina e aumentados de AOPP quando comparados aos pacientes com a forma remitente-recorrente (EM-RR). Além disso, pacientes com EM apresentaram maior frequência de deficiência de vitamina D ($p = 0,001$) e menores níveis séricos de 25(OH)D ($p = 0,002$), NOx ($p < 0,0001$) e TRAP/AU ($p < 0,0001$) do que os controles. Após a regressão logística com ajuste da idade, os valores de 25(OH)D, NOx e TRAP permaneceram significativos. Pacientes com 25(OH)D $<$ 20 ng/mL mostraram maior EDSS e menor AOPP que o grupo com 25(OH)D \geq 20 ng/mL ($p = 0,016$ e $p = 0,046$, respectivamente). Após regressão logística binária com as variáveis que apresentaram $p < 0,10$, somente o EDSS permaneceu associado com a deficiência de vitamina D, independentemente de fatores que podem influenciar a incapacidade dos pacientes, como estresse oxidativo (AOPP e NOx), idade, sexo, índice de massa corporal, etnia, duração da doença, tratamento para EM, uso do interferon beta e as formas clínicas da doença, com uma razão de chance de 1,380 (intervalo de confiança de 95%: 1,030-1,843, $p = 0,031$). Além disso, a análise de regressão linear mostrou uma associação entre os níveis séricos de 25(OH)D e

EDSS ($r^2=0,115$, $p=0,002$) e demonstrou que deficiência de vitamina D pode predizer 11,5% de aumento do EDSS em pacientes com EM. Os resultados demonstraram, também, que os níveis de 25(OH)D não apresentaram associação com as formas clínicas da EM ($p=0,553$).

Conclusão: Os resultados sugerem que ferritina, albumina e marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo como CL-LOOH, AOPP, TRAP e NOx foram preditores de diagnóstico de EM, enquanto albumina e AOPP foram preditores das formas clínicas da doença. Além disso, nossos dados sugerem que níveis diminuídos de 25(OH)D podem ser preditores de prognóstico, indicando que a deficiência de vitamina D pode ser considerada um dos fatores que contribui para o aumento da incapacidade dos pacientes, independente do estado redox dos pacientes, sugerindo que a vitamina D exerça propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras em diferentes vias envolvidas na fisiopatologia da EM.

Palavras-chave: Esclerose múltipla, albumina. Ferritina. Estresse oxidativo. AOPP. EDSS. Inflamação. Vitamina D.

OLIVEIRA, Sayonara Rangel. **Evaluation of serum levels of vitamin D, inflammatory and oxidative and nitrosative stress markers in patients with multiple sclerosis.** 2016. 88p . Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2016.

ABSTRACT

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating, and immune-mediated disease with unknown etiology that involves many lesive processes. The identification of new predictors of the disease may be useful to assist in the diagnosis, prognosis, classification of clinical forms or monitoring of therapeutic efficacy and is of great importance because of the clinical heterogeneity and complexity of MS.

Objective: The aim of this study was to evaluate the serum levels of vitamin D, inflammatory and oxidative and nitrosative stress markers in patients with MS. We enrolled in the study 258 MS patients and 249 healthy blood donors. The disability of the MS patients was evaluated using Expanded Disability Status Scale (EDSS). Oxidative stress markers evaluated were lipid hydroperoxides initiated by tert-butyl chemiluminescence (CL-LOOH), advanced oxidation protein product (AOPP), carbonyl proteins, nitric oxide metabolites (NOx), and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) after uric acid (UA) correction. The inflammatory markers evaluated were C-reactive protein (CRP), albumin, total protein, and ferritin. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] were quantified by chemiluminescence and MS patients were divided in two groups: 25(OH)D \geq 20 ng/mL (no deficient vitamin D status) and $<$ 20 ng/mL (deficient vitamin D status).

Results: Patients with MS were older than controls ($p < 0.0001$) and markers such as ferritin and CL-LOOH were positively associated with MS and may be considered predictors of disease [odds ratio (OR): 1.006; 95% confidence interval (CI): 1.003-1.009, $p < 0.001$, and OR: 1.029, 95% CI: 1.007-1.052, $p = 0.009$, respectively). Other markers, such as albumin, TRAP, AOPP, and NOx were negatively associated with MS ($p = 0.019$, $p = 0.003$, $p = 0.001$, and $p = 0.003$, respectively). In the logistic regression analysis age-adjusted, MS patients with progressive forms showed lower albumin and higher AOPP than those with relapsing-remitting MS (RRMS) ($p = 0.037$). In addition, MS patients showed lower serum levels of 25 (OH)D ($p = 0.002$), NOx ($p < 0.0001$), and TRAP/UA ($p < 0.0001$) than controls. After logistic regression analysis age-adjusted, 25(OH)D, NOx, and TRAP remained significant. Patients with 25 (OH)D $<$ 20 ng / ml showed an increase in EDSS score ($p = 0.016$) and AOPP levels ($p = 0.046$) than the group with 25 (OH)D \geq 20 ng/mL. In subsequent six models of logistic regression analyses, low levels of 25(OH) were significantly associated with EDSS independently of O&NS (AOPP and NOx), sex, age, body mass index (BMI), ethnicity, duration of the disease, MS therapy, use of interferon beta, and clinical forms of MS (OR: 1.380, 95% CI: 1.030-1.843, $p = 0.031$). Moreover, it was observed an association between serum levels of 25(OH)D and EDSS ($r^2 = 0.115$, $p = 0.002$) showing that 25(OH)D can predict 11.5% of increased in EDSS in MS patients. There was no difference in the levels of 25(OH)D between patients with relapsing-remitting MS (RRMS) and progressive MS ($p = 0.553$).

Conclusion: The results suggest that ferritin, albumin, and O&NS markers, such as CL-LOOH, AOPP, TRAP, and NOx were predictors of MS diagnosis, whereas albumin and AOPP were predictors that differentiated RRMS from the progressive forms of MS. Our results also suggest that vitamin D deficiency may be considered one of the predictors of the disability in MS patients, independently of their redox status, probably through different anti-

inflammatory and immunoregulatory properties of this hormone. Further studies are warranted to a better comprehension of the mechanisms involved in the interaction between hypovitaminosis D, O&NS markers and disability in MS.

Keywords: Multiple sclerosis. Oxidative stress. Albumin. Ferritin. AOPP. EDSS. Inflammation. Vitamin D.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

25(OH)D	25-hidroxivitamina D
1,25 (OH) ₂ D	1,25 dihidroxivitamina D
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AOPP	<i>Advanced oxidatin protein products</i> (Produtos avançados de oxidação proteica)
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
CIS	<i>Clinically isolated syndrome</i> (Síndrome clinicamente isolada)
CL-LOOH	<i>T-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i> (quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido)
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i> (proteína ligadora de vitamina D)
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (Escala Expandida do Estado de Incapacidade)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetracético)
EM	Esclerose Múltipla
EM-PP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EM-RR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
EM-SP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
hsCRP	Proteína C reativa de alta sensibilidade
HU	Hospital Universitário
IFN- β	Interferon β
HU	Hospital Universitário
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IO&NS	<i>Inflammatory, oxidative and nitrosative stress</i> (Inflamação e estresse oxidativo e nitrosativo)
LAC	Laboratório de Análises Clínicas

LCR	Líquido cefalorraquidiano
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> (Proteínas quinases ativadas por mitógenos)
MDA	Malondialdeído
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOx	<i>Nitric oxide metabolites</i> (Metabólitos do óxido nítrico)
PCR	Proteína C reativa
QL	Quimioluminescência
SNC	Sistema nervoso central
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> (Fator de transformação do crescimento β)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Fator de necrose tumoral α)
TRAP	<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i> (Potencial antioxidante total)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (Receptor de vitamina D)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aspectos Gerais da Esclerose Múltipla	14
1.2	Vitamina D na Esclerose Múltipla	16
1.3	Vitamina D como Imunomodulador	20
1.4	Estresse Oxidativo na Esclerose Múltipla	23
1.5	Vitamina D como Antioxidante	25
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Delineamento	30
4.2	Aspectos Éticos	30
4.3	População	30
4.4	Cálculo do Tamanho da Amostra	30
4.5	Amostra	31
4.5.1	Critérios de exclusão	31
4.6	Características dos Sujeitos	31
4.7	Coleta de Material Biológico	32
4.8	Marcadores do Estresse Oxidativo e Nitrosativo	32
4.8.1	Determinação de hidroperóxidos lipídicos iniciados por t-butil (CL- LOOH)	32
4.8.2	Determinação dos produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)	33
4.8.3	Determinação de proteínas carbonílicas	33
4.8.4	Determinação de nitrito para estimativa do NO	33
4.8.5	Capacidade Antioxidante Total do Plasma (<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP</i>)	34
4.9	Marcadores Bioquímicos	34

4.9.1	Determinação dos níveis séricos de 25(OH)D	34
4.10	Marcadores Inflamatórios	35
4.11	Análise Estatística	35
5	RESULTADOS	36
	Albumin and protein oxidation are predictors that differentiate relapsing-remitting from progressive clinical forms of multiple sclerosis	37
	Vitamin D deficiency is associated with disability in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress	45
6	CONCLUSÃO	67
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	69
8	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL	85
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	86
	APÊNDICE B – Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica imuno-mediada, desmielinizante e neurodegenerativa do sistema nervoso central (SNC) que apresenta o envolvimento de vários processos fisiopatológicos como inflamação, desmielinização, perda de oligodendrócitos, comprometimento dos axônios, estresse oxidativo e mecanismos de reparo, embora estes eventos não estejam presentes em todos os pacientes de maneira uniforme (MILLER et al., 2012). Na maioria dos casos, as manifestações iniciais da EM ocorrem entre os 20 e 40 anos de idade, sendo duas a três vezes mais frequente em mulheres e em indivíduos caucasianos (VALE, 2010). O número estimado de pessoas com EM em todo o mundo aumentou de 2,1 milhões em 2008 para 2,3 milhões em 2013 (MILO; KAHANA, 2010; BROWNE et al., 2014).

A prevalência da EM varia consideravelmente entre os países. Estima-se que vários países da América do Sul, apresentam menor prevalência de EM (5 a 20 casos por 100.000 habitantes), enquanto que na América do Norte e alguns países da Europa como Espanha, Itália e Inglaterra, a prevalência pode variar entre 60 a 100 casos por 100.000 habitantes, no Hemisfério Norte, a prevalência é mais elevada, sendo > 100 casos por 100.000 habitantes (BROWNLEE; MILLER, 2014).

Embora o Brasil seja considerado uma área de baixa prevalência da EM, há regiões com prevalência média (entre 5 a 30 casos por 100.000 habitantes), como demonstram estudos realizados em cidades da região sul do país (CALLEGARO et al., 2001; ROCHA et al., 2002; GAMA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2011; LANA-PEIXOTO et al., 2012). Um estudo realizado recentemente no Brasil, em João Pessoa, Paraíba, demonstrou a prevalência de 12,0 casos/100.000 habitantes, com predomínio no sexo feminino (77%) e em brancos (66,7%), idade média de 43 anos e idade média do primeiro surto de 32,2 anos (NEGREIROS et al., 2015).

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 (MARQUES, 2010). O grau de incapacidade da doença é avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Status Scale*

EDSS), proposta por Kurtzke (1983), que é parcialmente baseada em avaliações de oito áreas do SNC conhecidas como sistemas funcionais (funções piramidais, tronco cerebral, cerebelar, sensoriais, intestinais, vesicais, cerebrais e visuais) (KURTZKE, 1983).

Tomando-se em consideração a ocorrência de surtos e progressão, a EM pode ser classificada em quatro formas clínicas, de acordo com a sociedade norte-americana de EM: EM remitente-recorrente (EM-RR), EM secundariamente progressiva (EM-SP), EM primariamente progressiva (EM-PP) e EM progressiva recorrente (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, geralmente, pode ser completa ou deixar sequelas. Nesta forma clínica, não ocorre progressão dos déficits entre os surtos (KOCH et al., 2007; MARQUES, 2010). A forma EM-SP é uma evolução natural da forma EM-RR em 30 a 40% dos casos após 10 anos do diagnóstico. Constata-se uma deterioração contínua das funções neurológicas e constitui cerca de 15 a 20% de todas as formas de EM num dado momento (MARQUES, 2010). 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; esta é a forma que mais se distingue das demais, pelos critérios clássicos de disseminação no tempo não estarem presentes, o que dificulta seu diagnóstico. EM-PR é caracterizada pelo início progressivo surgindo posteriormente surtos bem identificados, mantendo um padrão de progressão entre os surtos. Esta forma constitui cerca de 5% dos casos e parece ser a evolução natural da forma clínica EM-PP (MARQUES, 2010). A busca por preditores que auxiliem o diagnóstico, prognóstico e identificação das formas clínicas da EM é necessária para auxiliar o médico na definição de sua conduta terapêutica. A Figura 1 ilustra as formas clínicas da EM.

A Síndrome Clinicamente Isolada (CIS) é definida como uma manifestação clínica causada por inflamação no SNC que pode ser o primeiro sintoma da EM. Esta situação pode ser também a primeira manifestação de outras condições como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a Doença de Behçet. Entretanto, mais comumente, a CIS é a primeira manifestação da EM, sendo seus sintomas, portanto, um surto de EM. A CIS tem os mesmos sintomas de um surto de EM, tais como alterações visuais (visão turva ou dupla),

formigamento ou adormecimento na face, braços ou pernas, tontura e alterações do equilíbrio, diminuição da força ou coordenação, e incontinência urinária. Estes sintomas podem aparecer isolados, ou em combinação, e geralmente se instalam de forma gradual ao longo de alguns dias. Dois terços dos pacientes que apresentam a forma CIS poderão evoluir para a forma de EM-RR (BROWNLEE; MILLER, 2014).

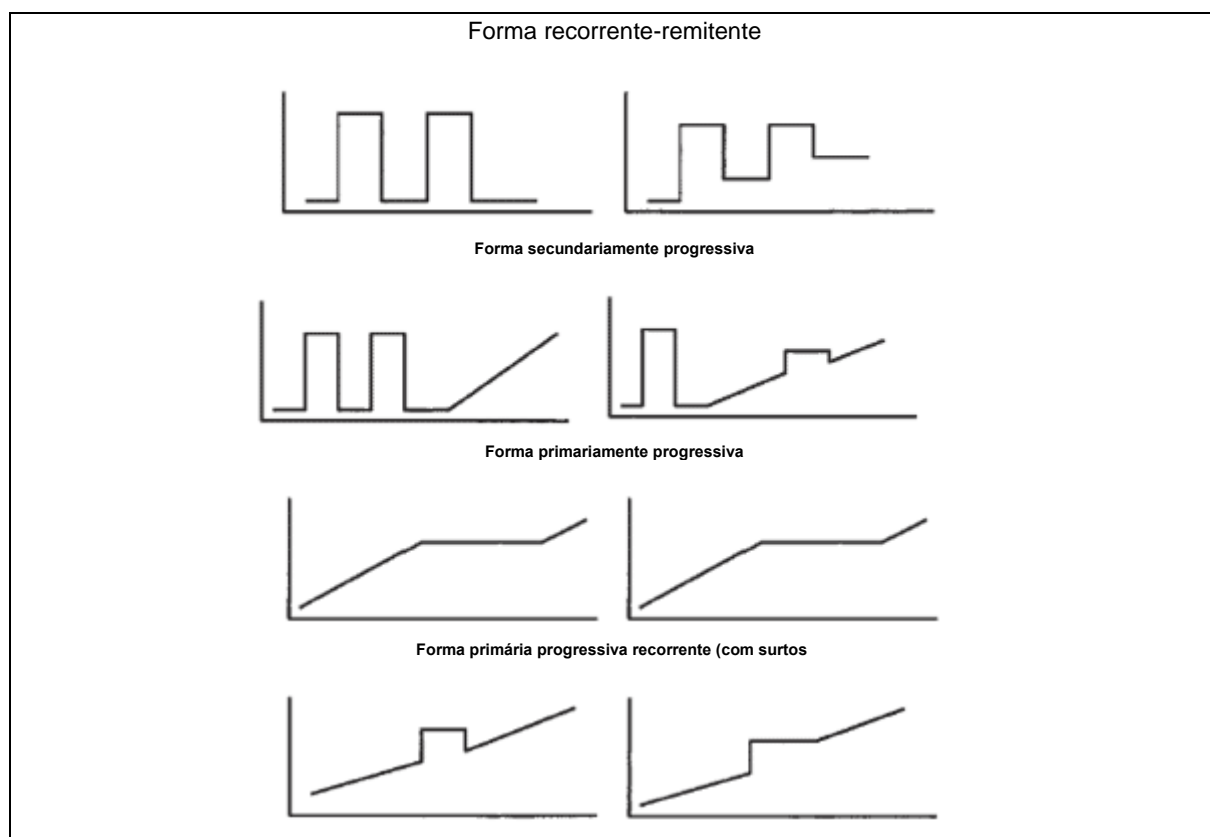


Figura 1 Representação gráfica das formas clínicas da esclerose múltipla.
Fonte: MARQUES (2010)

1.2 Vitamina D na Esclerose Múltipla

A etiologia da EM ainda permanece desconhecida. Provavelmente seja o resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento da doença (KJELL-MORTEN, 2009; KALLAUR et al., 2011). Entre os fatores ambientais que podem estar envolvidos com o desencadeamento da EM estão uso crônico do tabaco, obesidade, doenças virais, sedentarismo e baixos níveis

séricos de vitamina D (FRAGOSO, 2014). Dentre os vários fatores ambientais estudados, a vitamina D pode ser considerada um dos candidatos mais atraentes que parece participar da fisiopatologia da doença (KJELL-MORTEN, 2009; ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010).

A vitamina D provem de três fontes potenciais: 1) pode ser formada na pele a partir da exposição à luz solar; 2) fontes nutricionais; e 3) suplementos com vitamina D (HOLICK et al., 2007; MOAN et al., 2008). Em humanos, a principal via de síntese de vitamina D é por meio da exposição solar pela radiação ultravioleta (UV) (280 a 315 nm) que, ao entrar em contato com a pele, induz a formação de vitamina D. Quimicamente, a vitamina D é derivada do esteróide 7-deidrocolesterol, derivado do colesterol que é encontrado nas glândulas sebáceas da pele dos animais. Após exposição à luz solar, o composto 7-deidrocolesterol absorve a luz UV e converte a precalciferol (também denominado de previtamina D) na pele. Eventualmente, parte do precalciferol é isomerizado em colecalciferol (também denominado de vitamina D₃) por meio de uma conversão térmica (HOLICK et al., 1980). Além do 7-deidrocolesterol em animais, ergosterol, esteróide comumente presente em plantas, pode ser ativado pela irradiação para produzir ergocalciferol (também denominado de vitamina D₂). Ambas as vitaminas D₃, tanto a formada na pele e a vitamina D₃ absorvida do trato digestivo, são transportadas para o fígado, onde são hidroxiladas no carbono 25 pela 25-hidroxilase (CYP2R1 e CYP27A1) para formar o calcidiol, ou também denominada 25- hidroxivitamina D, abreviada como 25(OH)D. Este composto, 25(OH)D, é o principal metabólito circulante da vitamina D e é um indicador do status da vitamina D no indivíduo. Após a hidroxilação hepática, o calcidiol é posteriormente hidroxilado pela 1-alfa hidroxilase (CYP27B1) pelas células dos túbulos proximais dos rins, formando o calcitriol, também denominado de 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D), que é considerada a forma ativa da vitamina D (JONES; STRUGNELL; DELUCA, 1998). Em nível celular, a 1,25(OH)₂D interage com o receptor de vitamina D (VDR) localizado no núcleo celular para modular a transcrição gênica.

Os níveis de vitamina D dependem da sazonalidade, alcançando os menores valores no inverno e os valores máximos no final do verão. Os valores de referência para os níveis séricos de vitamina D são muito variáveis na literatura. Com base nos efeitos da vitamina D na homeostase mineral e óssea, indica-se como deficiência de vitamina D

valores <20 ng/mL e níveis suficientes de vitamina D valores entre 21 e 29 ng/mL (ROSEN et al., 2011; ROSS et al., 2011). Outros autores categorizam em valores suficientes como \geq 30 ng/mL e deficientes < 30 ng/mL (SOUBERBIELLE, 2010).

Tem sido sugerido que os níveis circulantes de 1,25(OH)₂D são muito baixos para afetarem a resposta imune *in vivo* e que níveis suficientes são obtidos localmente pela conversão da 25(OH)D a 1,25(OH)₂D. Outros importantes fatores que influenciam a biodisponibilidade dos níveis de vitamina D são a proteína ligadora de vitamina D (DBP) e albumina. As formas 25(OH)D e 1,25(OH)₂D circulam ligadas à DBP (80-90%) e à albumina (10–15%) com <1% presente na sua forma ativa (KONGSBÄK et al., 2014). Estudos em animais deficientes de DBP têm mostrado que a DBP age como reservatório de vitamina D protegendo contra a degradação e secreção renal (SAFADI et al., 1999).

As vias de síntese da vitamina D dão suporte para as evidências epidemiológicas que mostram uma distribuição geográfica para a presença da EM, onde a prevalência da doença é menor nas regiões equatorianas e torna-se maior com aumento da latitude (SELLNER et al., 2011). Este fenômeno poderia ser causado pela falta de luz solar nas regiões de alta latitude que é necessária para a síntese cutânea da vitamina D e sugere que níveis insuficientes deste hormônio poderia ser um potencial fator de risco para EM (ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010).

Evidências epidemiológicas e experimentais têm sugerido que níveis suficientes ou elevados de vitamina D diminuem o risco de indivíduos desenvolverem EM (MUNGER et al., 2006; SIMON; MUNGER; ASCHERIO, 2012). De fato, estudos mostraram uma correlação inversa entre prevalência da EM e exposição solar (KURTZKE, 1967; VAN DER MEI et al., 2001). Um estudo concluiu que os níveis séricos de 25(OH)D em adultos caucasianos saudáveis é um importante preditor de risco para o desenvolvimento de EM, independente de local de nascimento e latitude do local onde viveu durante a infância (MUNGER et al., 2006). Pacientes com EM apresentam níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D mais baixos do que controles sem a doença (SOILU-HANNINEN et al., 2005; CORREALE; YSMAELIT; GAITAN, 2009). Variações sazonais nos níveis séricos de 25(OH)D foram semelhantes em pacientes com EM e controles (SOILU-HANNINEN et al., 2008), mas os níveis de 25(OH)D foram menores durante as fases de surtos de EM do que nas fases de remissão da doença, sugerindo que a vitamina D poderia estar envolvida na

regulação da progressão clínica e gravidade da doença (SOILU-HANNINEN et al., 2005; SOILU-HANNINEN et al., 2008; CORREALE; YSMAELIT; GAITAN, 2009).

Outros estudos também demonstraram que a maioria dos pacientes com EM apresentava níveis deficientes de vitamina D (VAN DER MEI et al., 2007; SMOLDERS et al., 2008; HIREMATH et al. 2009). Baixos níveis de 25(OH)D foram associados com maior incapacidade e taxas de surtos em pacientes com EM (VAN DER MEI et al., 2007; SMOLDERS et al., 2008) e associados negativamente com a atividade da EM (LØKEN-AMSRUD et al., 2012; MOWRY et al., 2012). Entretanto, os níveis séricos de 1,25(OH)₂D, que é a forma biologicamente ativa do hormônio, não foram diretamente associados com a incapacidade e taxas de surtos (HIREMATH et al. 2009). Dois estudos descreveram uma forte correlação inversa entre os níveis séricos de 25(OH)D e o risco de EM (MUNGER et al., 2006; KRAGT et al., 2009); entretanto, a correlação foi evidente somente entre caucasianos e hispânicos (MUNGER et al., 2006). A razão para os pacientes com EM geralmente apresentarem níveis séricos mais baixos de 25(OH)D do que indivíduos saudáveis poderia ser a combinação de ingestão insuficiente de vitamina D e diminuição de atividades em ambientes externos causados pelas alterações no estilo de vida associadas ao aumento da incapacidade. Entretanto, é desconhecido se a alta prevalência da deficiência da vitamina D encontrada nos pacientes com EM é a causa ou efeito da doença, uma vez que os estudos apresentam delineamentos de caso–controle.

O calcitriol, forma ativa da vitamina D, mostrou-se efetivo na prevenção e tratamento da encefalomielite experimental autoimune (EAE), modelo experimental da EM (LEMIRE; ARCHER, 1991; CANTORNA; HAYES; DELUCA, 1996). Os resultados destes estudos experimentais sugeriram a hipótese de que a vitamina D poderia ser benéfica na prevenção e no tratamento da EM em humanos. Outro estudo realizado com pacientes classificados como CIS e seguidos por cinco anos mostrou que pacientes que apresentavam níveis aumentados de vitamina D desenvolveram menor taxa de progressão e redução da atividade da doença (ASCHERIO, 2014). Estes resultados sugerem que baixos níveis de vitamina D podem ser considerados preditores de maior EDSS, sendo um fator facilmente corrigido nestes pacientes.

Considerando que a deficiência de vitamina D poderia aumentar o risco de EM (CANTORNA, 2006), a detecção da deficiência da vitamina D e a recuperação do status

da vitamina D para níveis adequados poderia ser considerado como parte do tratamento clínico da EM. De fato, a intervenção com vitamina D têm sido avaliada em vários estudos (NORDVIK et al., 2000; ACHIRON et al., 2003; WINGERCHUK et al., 2005). Em um estudo clínico com pacientes com EM, 1000 UI de colecalciferol foram administradas diariamente por seis meses e os resultados demonstraram apenas aumento do fator de transformação do crescimento (TGF)- β , sem alteração de outras citocinas (MAHON et al., 2003).

Os efeitos da suplementação de vitamina D na resposta imune em humanos não têm sido sistematicamente investigado. Há poucos estudos duplos-cegos, placebo controlados publicados (MAHON et al., 2003; JORDE et al., 2010). Os estudos clínicos foram incapazes de fornecer evidências definitivas para dar suporte aos efeitos terapêuticos da intervenção com vitamina D, sendo a maioria devido ao pequeno número de pacientes com EM que foram recrutados. Devido a falta de um estudo duplo cego, placebo controlado e randomizado com um grande número de pacientes, os benefícios da suplementação oral da vitamina D na progressão da EM necessita de mais investigações (ANTICO et al., 2012). Além da efetividade clínica, a dose ótima e duração da suplementação de vitamina D não estão bem definidas e pode variar entre os pacientes (YANG et al., 2013).

1.3 Vitamina D como Imunomodulador

A hipótese de que a deficiência de vitamina D é um fator de risco para EM ganhou credibilidade após a descoberta do efeito imunomodulador deste hormônio (ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010). Embora a função mais conhecida da vitamina D seja atuar no metabolismo ósseo e na regulação fisiológica dos níveis séricos do cálcio, fostato e paratormônio pela sua ação no intestino, ossos, glândulas paratireóides e rins, este hormônio também parece exercer importantes efeitos no desenvolvimento e funcionamento do cérebro, proliferação celular e apoptose, na diferenciação de células imunológicas e na modulação da resposta imune (DELUCA; CANTORNA, 2001; ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010).

Os efeitos biológicos da 1,25 (OH)₂D são mediados pelo VDR. Este receptor é expresso em diferentes tipos celulares do SNC (GARCION et al., 2002), bem como

em células do sistema imunológico como monócitos, macrófagos, células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos (VELDMAN;CANTORNA; DELUCA, 2000), exercendo diversas funções imunomoduladoras tanto na resposta imune inata como na adaptativa.

A ativação do VDR induz alteração de transcrição, proliferação e diferenciação de células envolvidas na resposta imunológica (VELDMAN; CANTORNA; DELUCA, 2000). Vitamina D exerce um efeito anti-inflamatório por causar inibição da proliferação de linfócitos T, redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, indução a apoptose de linfócitos T ativados, inibição da proliferação de linfócitos B e, conseqüentemente, diminuição da produção de imunoglobulinas (SMOLDERS et al., 2008; KJELL-MORTEN, 2009). Estudos têm observado que quando ocorre ligação da 1,25 (OH)₂D ao VDR, este atua inibindo a transcrição de algumas citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-2 e tem a capacidade de alterar o balanço entre o perfil de citocinas produzidas pelos linfócitos T *helper* Th1 e Th2, a favor de células Th2 (SMOLDERS et al., 2008; ZELLA et al., 2010). Além disso, um estudo indicou que a vitamina D (calcitriol) foi capaz de suprimir diretamente a transcrição da IL-17, citocina que exerce um papel crítico na fisiopatologia de doenças autoimunes, incluindo EM (JOSHI et al., 2011). Resultados obtidos *in vitro* demonstraram que a administração de vitamina D inibiu a produção de fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6 e óxido nítrico (NO) pelas células da micróglia, indicando um efeito anti-inflamatório e imunomodulador deste hormônio (SLOMINSKI et al., 2014).

Células T regulatórias (Treg) são definidas como células T CD4⁺, CD25⁺ FoxP3⁺ pela expressão de CD4, CD25 (receptor de IL-2 de alta afinidade) e do fator de transcrição FoxP3. Estas células desempenham importante papel na proteção do indivíduo contra a apresentação e reconhecimento de auto antígenos pelas células efetoras do sistema imune, principalmente as células Th1 e Th17, suprimindo a autoimunidade. Fortes evidências sugerem o seu papel na prevenção do desenvolvimento da EM (NOORI-ZADEH et al., 2016).

A capacidade de migração das Treg para o SNC inflamado e sua habilidade em controlar o processo inflamatório na EM é ainda matéria de debate. Foi realizado um estudo de meta-análise para avaliar se o baixo número de Treg seria um fator de risco contribuindo para a patogênese da EM. Os resultados mostraram claramente que não há

diferença entre os pacientes com EM e sem quanto à frequência das células Treg (NOORIZADEH et al., 2016).

Além da ação da vitamina D em macrófagos e monócitos, outras APCs como as células dendríticas também expressam o VDR e as enzimas metabolizadoras como a 1α -hidroxilase e a 24-hidrozilase. Nestas células, a vitamina D exerce um papel importante na promoção da sua tolerogenicidade via alteração de suas funções e morfologia (ADORINI; PENA, 2009; GHOREISHI et al., 2009). Na presença da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, as células dendríticas exibem uma redução da expressão das moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II e várias moléculas de adesão como CD40, CD80 e CD86 (ADORINI et al., 2003; PENNA et al., 2007; FERREIRA et al., 2011). Isto leva a redução da apresentação do antígeno que é acompanhada pela redução da secreção de IL-12 e aumento da secreção da citocina tolerogênica IL-10, promovendo o desenvolvimento e diferenciação das células Th2, criando um perfil mais tolerogênico diante de um fenômeno de autoimunidade (LANG et al., 2014).

A administração de vitamina D aumentou o número de linfócitos Treg, produtores de IL-10, uma citocina com efeitos anti-inflamatórios, e diminuiu o número das células produtoras de IL-6 e IL-17, além de ter inibido a produção de IL-17 em pacientes com EM e controles (CORREALE et al., 2009). Tratamento de células T com calcitriol ou análogos, inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α), Th9 (IL-9) e Th22 (IL-22) (LEMIRE et al., 1995; CANTORNA, 2010; VAN BELLE; GYSEMANS; MATHIEU, 2011; PALMER et al., 2011) mas promove a produção de mais citocinas anti-inflamatórias Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10) (OVERBERG et al., 2000; BOONSTRA et al., 2001; LANG et al., 2013). Células T expostas a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzem valores significativamente diminuídos de IL-17, IFN- γ e IL-21 e apresentam aumento significativo da expressão de genes típicos das Tregs (JEFFERY et al., 2009). As Treg têm uma papel anti-inflamatório e controle das doenças autoimunes pela liberação de IL-10 e TGF- β (SAKAGUCHI et al., 2006).

Portanto, como a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias está intimamente relacionada à fisiopatologia da EM, baixos níveis de vitamina D poderiam contribuir com o processo inflamatório e o desequilíbrio imunológico observado nestes pacientes.

1.4 Estresse Oxidativo na Esclerose Múltipla

Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo pode exercer importante papel na patogênese da EM. Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), geradas em excesso pela micróglia ativada, têm sido implicadas como mediadores da desmielinização e podem contribuir para a formação e persistência das lesões características da doença (VAN HORSSSEN et al., 2008). O SNC é particularmente susceptível ao estresse oxidativo devido ao elevado consumo de oxigênio, resultando em produção excessiva de EROs, além da alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são particularmente vulneráveis ao ataque de peroxidação lipídica (FRIEDMAN, 2011). Além disso, o cérebro possui menor defesa antioxidante comparado à outros órgãos, altos níveis de ferro que agem como pró-oxidantes sob condições patológicas, e a ocorrência de reações envolvendo oxidação de dopamina e glutamato no tecido cerebral (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009).

Estudos prévios evidenciaram aumento dos produtos de peroxidação lipídica no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no plasma de indivíduos com EM (GRECO; MINGHETTI; LEVI, 2000; FERRETI et al., 2005). Além disso, marcadores de oxidação proteica como proteínas carbonílicas, mostraram-se elevados em pacientes com EM (MILLER et al., 2012). Os radicais livres danificam os componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos o que resulta em morte celular por necrose ou apoptose (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004). Desta maneira, teoricamente, o tratamento de pacientes com EM com antioxidantes poderia prevenir a propagação do dano tecidual e melhorar o quadro clínico (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004).

A incapacidade dos pacientes com EM, avaliada pelo EDSS, foi associada com o estresse oxidativo, mesmo em fase de remissão clínica. Marcadores do estresse oxidativo como produtos de peroxidação lipídica determinados por método de quimioluminescência (QL) (CL-LOOH) e proteínas carbonílicas apresentaram uma correlação positiva com EDSS, sugerindo que o estresse oxidativo poderia ter um importante papel na fisiopatologia da progressão da doença (OLIVEIRA et al., 2012).

Enquanto a oxidação lipídica tem sido extensivamente estudada em EM, a oxidação proteica tem recebido menos atenção (BIZZOZERO, 2009). Proteínas modificadas

oxidativamente são responsáveis por perturbações adicionais na tolerância ao próprio porque representam potenciais alvos para o sistema imunológico pela quebra da tolerância de células B (SHEIKH et al., 2007). Além das proteínas carbonílicas, os produtos de oxidação proteica, denominados de produtos avançados da oxidação proteica (AOPP) são marcadores do estresse oxidativo encontrados elevados em plasma de pacientes com doenças crônicas como uremia crônica na doença renal dialítica (WITKO-SARSAT et al., 1996; WITKO-SARSAT GAUSSON; DESCAMPS-LATSCHA, 2003), doença arterial coronariana, diabetes mellitus tipo 2, esclerose sistêmica, doença reumática valvar e cancer colorretal (CAO et al., 2014). A formação de AOPP é correlacionada com a concentração de oxidantes clorinados, indicando que AOPP resulta da interação entre oxidantes e proteínas plasmáticas (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Em relação à EM, um estudo avaliou marcadores de oxidação proteica em pacientes com EM-RR sem tratamento com imunomoduladores, pacientes com surtos e pacientes tratados com interferon (IFN)- β e acetato de glatiramer (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013). Estes autores relataram que os níveis de AOPP foram maiores em pacientes EM-RR sem tratamento e em pacientes com surto. Além disso, este estudo mostrou que marcadores de oxidação proteica estão correlacionados com proteína C reativa (PCR), sugerindo que as modificações de proteínas estão relacionados com o processo inflamatório. Os resultados do estudo indicam que ocorre oxidação de proteínas na EM e que marcadores do dano proteico, especialmente, a AOPP, podem ser úteis no monitoramento do estresse oxidativo em pacientes com EM (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013).

A albumina, a proteína plasmática mais abundante, foi identificada como a principal fonte de AOPPs no plasma (WITKO-SARSAT et al., 1996; CAPELLERE-BLANDIN et al., 2004). A albumina é um dos principais determinantes da capacidade antioxidante no plasma humano. Esta molécula possui a capacidade de se ligar e transportar *scavengers*, varredores de radicais livres, além de sequestrar metais de transição com atividade pró-oxidante e atuar diretamente com ação antioxidante (AYDIN et al., 2014). Além do seu potencial efeito antioxidante, sua relação com o processo inflamatório, como proteína de fase aguda negativa, justifica sua investigação como possível preditor em doenças inflamatórias.

Outra proteína que tem sido estudada em pacientes com doenças

neuroológicas é a ferritina. Trata-se de uma proteína de fase aguda positiva de síntese hepática induzida pela ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6. Estudos têm relatado aumento nos níveis séricos de ferritina em pacientes com EM quando comparado ao grupo controle (LEVINE et al., 1999; DA COSTA et al., 2011). Os níveis plasmáticos elevados de ferritina têm sido associados com deterioração neurológica precoce. Valores de ferritina >275 mg/mL predizem, independentemente, a deterioração neurológica precoce em pacientes com infartos hemisféricos (DAVALOS et al., 2000). Outro estudo mostrou que níveis séricos de ferritina estavam significativamente aumentados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM com formas progressivas comparados aos pacientes EM-RR (LEVINE et al., 1999). Os autores deste trabalho sugeriram que os níveis séricos de ferritina poderiam ser marcadores laboratoriais das formas clínicas progressivas na EM.

1.5 Vitamina D como Antioxidante

Além dos efeitos imunomoduladores da vitamina D, evidências têm surgido, indicando um possível efeito antioxidante deste hormônio. Baixos níveis de vitamina D foram associados ao aumento dos marcadores inflamatórios, do estresse oxidativo e nitrosativo (IO&NS) (LAN, et al., 2014; CHEN et al., 2014; SHARIFI et al., 2014). Wiseman (1993), foi o primeiro a descrever o possível papel antioxidante da vitamina D, mostrando que a forma ativa deste hormônio foi capaz de inibir a peroxidação lipídica dependente de ferro. No entanto, os resultados são conflitantes quanto as propriedades antioxidantes da vitamina D, enquanto alguns estudos mostraram associação entre vitamina D e marcadores do estresse oxidativo (TARCIN et al., 2009; SHARIFI et al., 2014; DE MEDEIROS CAVALCANTE et al., 2015), outros não observaram mudança nos marcadores de estresse oxidativo mesmo após suplementação com vitamina D (EFTEKHARI et al., 2013; ASEMI et al., 2013).

Tarcin et al., (2009) relataram que a administração de 300.000 UI mensal de vitamina D3 por três meses em pacientes com deficiência de vitamina D diminuiu significativamente os níveis séricos de malondialdeído (MDA), importante marcador de peroxidação lipídica. Em concordância com estes resultados, Sharifi et al. (2014), avaliaram o efeito da suplementação mensal com 50.000 UI de vitamina D3 por quatro meses em

adultos com doença hepática não alcoólica e os resultados demonstraram que, após a suplementação, níveis séricos da proteína de fase aguda positiva PCR e MDA apresentaram redução significativa, indicando um possível efeito inibidor da peroxidação lipídica nestes pacientes.

A suplementação com vitamina D reduziu marcadores de inflamação, estresse oxidativo e nitrosativo (IO&NS) em diversas populações (CHEN et al., 2014; SHARIFI et al., 2014; DE MEDEIROS CAVALCANTE et al., 2015). Um estudo realizado no Brasil mostrou que, após suplementação com vitamina D durante quatro semanas, mulheres idosas apresentaram um aumento significativo da capacidade antioxidante total do plasma e uma diminuição de PCR e alfa-1 glicoproteína ácida (DE MEDEIROS CAVALCANTE et al., 2015).

Por outro lado, um ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo controlado realizado com mulheres com diabetes mellitus gestacional mostrou que após suplementação com vitamina D3 com uma dose de 50,000 IU durante 6 semanas, não observaram alterações dos parâmetros de estresse oxidativo (ASEMI et al., 2013). Outro estudo realizado com pacientes com diabetes mellitus tipo II, também não mostrou diferenças significativas nos marcadores de estresse oxidativo, após suplementação com vitamina D durante 2 meses (EFTEKHARI et al., 2013). Portanto, as propriedades da vitamina D como antioxidantes permanecem incertas, e mais estudos são necessários para esclarecer estes resultados e delinear possíveis mecanismos de ação deste hormônio no desequilíbrio redox.

Estudos *in vitro* buscam esclarecer possíveis mecanismos antioxidantes da vitamina D, induzindo a inflamação e estimulando o estresse oxidativo para verificar os possíveis efeitos da vitamina D nestes processos. Um estudo usou a endotoxina bacteriana lipopolissacarídica (LPS) para induzir inflamação em cultura de células da glia e investigaram como a 1,25 (OH)₂D poderia afetar a neuroinflamação. A indução por LPS estimulou a produção de EROs, IL-6, NO, entre outros mediadores inflamatórios. Neste estudo, os autores observaram que o tratamento com a 1,25 (OH)₂D suprimiu a produção de EROs induzidos por LPS, reduziu a produção de IL-6 e a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) sem causar morte celular (HUANG et al., 2015). Estes resultados sugerem que a vitamina D atenua a neuroinflamação inibindo a via de sinalização das proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK) em culturas de células da glia. A ativação da via MAPK por LPS inicia uma cascata caracterizada pela ativação de células da glia e um aumento de produção de mediadores inflamatórios, incluindo EROs, NO, citocinas e quimiocinas. Portanto, o controle da ativação das células da glia, como resultado da suplementação com vitamina D, poderia ser usado como estratégia terapêutica integrativa para modular a neuroinflamação (HUANG et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, a classificação nas formas clínicas da EM torna-se difícil pela falta de preditores que poderiam auxiliar o médico nesta etapa. A busca por novos preditores de diagnóstico, prognóstico, identificação de formas clínicas da EM e monitoração de eficácia terapêutica, torna-se necessária devido a complexidade e heterogeneidade da EM. Há poucos registros na literatura que propõem possíveis preditores da doença, baseando-se num modelo estatístico.

Observamos as inúmeras evidências do papel da vitamina D como imunomodulador, anti-inflamatório e antioxidante em diversas populações; no entanto, ainda não há registros na literatura de trabalhos que tenham investigado a associação dos níveis séricos de vitamina D com marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com EM. A descoberta de propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da vitamina D ampliou este campo de pesquisa promissor que busca compreender melhor o papel protetor da vitamina D na EM e considera este hormônio associado às terapias convencionais uma terapia complementar e integrativa às terapias convencionais para o tratamento da doença. Além disso, não há registros de estudos que avaliaram os níveis séricos de vitamina D e correlacionaram com aspectos clínicos e laboratoriais na população brasileira. É importante saber se, mesmo em países tropicais como o Brasil, onde a exposição solar é maior quando comparados aos países do Hemisfério Norte, indivíduos da população em geral como os pacientes com EM apresentam deficiência de vitamina D e se nos pacientes com EM, esta deficiência poderia estar associada ao estresse oxidativo e assim contribuir para a incapacidade destes pacientes.

Estas informações podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da EM e caracterização do perfil clínico e epidemiológico destes pacientes na população brasileira. Neste contexto, a hipótese de nosso trabalho é que baixos níveis de vitamina D possam contribuir com o aumento do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com EM e desta maneira ser mais um fator envolvido com o aumento da incapacidade destes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis séricos de vitamina D, marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Determinar os níveis séricos de 25(OH)D nos pacientes com EM comparando-os ao grupo controle;

3.2.2 Avaliar o estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com EM e indivíduos saudáveis;

3.2.3 Avaliar se existe associação entre os níveis séricos de 25(OH)D e marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com EM;

3.2.4 Avaliar a associação entre os níveis séricos de 25(OH)D e a incapacidade dos pacientes, avaliada pela escala EDSS;

3.2.5 Avaliar possíveis preditores da EM e marcadores que possam auxiliar na diferenciação das suas formas clínicas.

4 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Foi realizado um estudo observacional, caso-controle para atingir os objetivos descritos no trabalho.

4.2 Aspectos Éticos

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, com o Parecer de Aprovação no. 159/10, CAAE no. 0140.0.268.000-10, em 30 de agosto de 2010 (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 (APÊNCIDE A).

4.3 População

Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes com diagnóstico de EM, adultos, de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, Paraná. O convite foi realizado de forma consecutiva, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015. Neste mesmo período, foram convidados indivíduos saudáveis candidatos a doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e da população em geral, adultos, de ambos os sexos.

4.4 Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no STATCALC do Programa Epi Info versão 6.04d. Para calcular o tamanho da amostra, dados de um estudo anterior desenvolvido por Naidoo e Knapp (1992) foram considerados. Neste estudo, produtos da peroxidação lipídica foram quantificados no soro de pacientes com EM e comparados ao grupo controle, obtendo-se uma diferença entre as médias de 30%. De acordo com os cálculos, a estimativa do tamanho da amostra para o presente estudo seria de 70 indivíduos em cada grupo.

4.5 Amostra

Os pacientes com EM foram selecionados no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes AEHU da UEL. A amostra foi obtida por conveniência de tempo e local. Foram avaliados no estudo 258 pacientes com EM, diagnosticados segundo os critérios de McDonald (POLMAN et al., 2011) e classificados como EM-RR, EM-SP e EM-PP. O grau de incapacidade dos pacientes foi avaliado por meio da EDSS, com escores que variam de 0,0 a 10,0 (KURTZKE, 1983). As informações sobre fatores que influenciam no estilo de vida e história médica foram obtidos na avaliação clínica.

O grupo controle foi composto de 249 indivíduos saudáveis selecionados, consecutivamente, entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina. Fatores como idade, sexo, etnia, tabagismo, índice de massa corporal (IMC) e uso dos medicamentos foram ajustados para não interferirem nos parâmetros avaliados. Os indivíduos avaliados deste grupo não apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, renal, cardíaca ou hepática e reportaram não fazerem uso de medicamentos anti-inflamatórios e suplementos antioxidantes. Todos os indivíduos envolvidos neste estudo relataram não fazer uso de bebidas alcoólicas regularmente e não praticavam exercício físico regularmente. Os hábitos nutricionais dos pacientes foram similares aos do grupo controle e nenhum dos indivíduos estava recebendo algum tipo de dieta específica.

4.5.1 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes com CIS e neuromielite óptica, pacientes e controles que estavam em uso de medicamentos anti-inflamatórios, suplemento com vitamina D e/ou antioxidante.

4.6 Características dos Sujeitos

Foram coletados dados demográficos (idade, sexo, etnia), epidemiológicos, antropométricos (peso, altura e IMC) e clínicos (formas clínicas, EDSS e terapia para EM) dos indivíduos inseridos no estudo. Os dados foram coletados pela aplicação de um questionário padrão (Apêndice B), respondidos pelos pacientes e pelos indivíduos do grupo

controle. Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL e do Hemocentro Regional de Londrina. As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (Kg) e altura (m), obtidas, por interrogatório, durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (Kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em kg/m^2 . Por meio do questionário foram obtidas informações sobre hábitos alimentares, tempo de exposição solar/dia, uso de protetor solar e uso de medicamentos em geral e específicos para o tratamento da EM.

4.7 Coleta de Material Biológico

Para a análise dos marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo, amostras de sangue periférico foram coletadas pela equipe de funcionários do LAC/HU, segundo a requisição de exames laboratoriais padronizada pelo hospital. Foram coletados 10 mL em tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e dois tubos de 5 mL com anticoagulante EDTA. Para análise dos marcadores bioquímicos, a coleta de sangue periférico, com EDTA e sem anticoagulante, foi realizada após um período de 12 horas de jejum. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. 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°C até o momento de uso. Todos os pacientes e controles, bem como suas respectivas amostras foram identificados por número e letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

4.8. Marcadores do Estresse Oxidativo e Nitrosativo

4.8.1 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. O método de QL foi realizado em equipamento luminômetro (GloMAX 20/20 Single Tube Luminometer, Promega Corporation, WI, USA). Uma média de leituras realizadas após 1 hora de reação foi expressa em unidades relativas de luz (URL) (Lozovoy et al., 2011).

4.8.2 Determinação dos produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

AOPP foi determinada no plasma usando um método semiautomático descrito por Witko-Sarsat et al. (1996). AOPP resulta da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, que são detectados espectrofotometricamente. As concentrações são expressas em micromol/ L (umol/L) de equivalente de cloramina T.

4.8.3 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 2,4 dinitrofenilhidrazona, de acordo com a técnica descrita por Reznick et al. (1994). Os resultados foram expressos em nmol mL⁻¹ mg⁻¹ proteínas totais.

4.8.4 Determinação de nitrito para estimativa do NO

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez e colaboradores (1998) adaptada. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de oxirredução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550nm. Os resultados foram expressos em µm.

4.8.5 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 QL, como descrito previamente (REPETTO et al., 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) análogo hidrossolúvel da vitamina E, usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado a capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de TRAP foram corrigidos pelos níveis séricos de ácido úrico (AU), segundo estudos prévios (VENTURINI et al. 2012) e os resultados foram expressos pela razão entre TRAP/AU. A determinação dos níveis séricos de AU foi realizada utilizando-se um autoanalisador bioquímico (Dimension® RxL Max, Sistema Integrado de Química, Newark, NJ, USA), expressos em mg/dL, segundo as recomendações e valores de referência do fabricante.

4.9 Marcadores Bioquímicos

4.9.1 Determinação dos níveis séricos de 25(OH)D

Níveis séricos de 25(OH) foram determinados em amostras de soro pelo imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) e os resultados foram expressos em ng/mL. Foram considerados deficientes de vitamina D indivíduos que apresentaram níveis séricos de 25(OH)D < 20 ng/mL e suficientes de vitamina D quando os valores de 25(OH)D foram ≥ 20 ng/mL (HOLICK ET AL., 2011; THOUVENOT et al., 2015)

Os níveis séricos de albumina foram determinados usando um autoanalisador bioquímico (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), e os

resultados foram expressos em g/dL. Os níveis séricos de proteínas totais foram avaliados por colorimetria e os resultados foram expressos em g/L.

4.10 Marcadores Inflamatórios

Os níveis séricos de PCR ultrasensível (usPCR) foram quantificados por nefelometria (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L e expressos em mg/L. Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por CMIA (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) e expressos em ng/mL. Valores de ferritina > 274,7 ng/mL e > 204,0 ng/mL são considerados elevados para homens e mulheres, respectivamente, segundo as instruções do fabricante.

4.11 Análise Estatística

As análises das tabelas de contingência (teste de χ^2) foram utilizadas para avaliar as associações entre as características dos dois grupos pacientes e controles. Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. Transformações logarítmicas (ln) de dados contínuos foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal ou quando não havia heterogeneidade da variância (conforme avaliado com o teste de Levene). Para avaliar as diferenças nos dados demográficos, clínicos e exames laboratoriais entre pacientes e controle foi utilizada a análise de variância (ANOVA). Para se realizar a comparação entre os três grupos (pacientes com EM-RR, formas progressivas e grupo controle foi utilizado o teste de Fisher (LSD at $p < 0.05$). A regressão logística binária foi usada para definir o preditor significativo, com *odds ratio* (OR) e 95% de intervalo de confiança (IC) de EM *versus* controle. A regressão logística multinomial foi utilizada para avaliar os preditores significativos entre as formas clínicas da doença. Todos os testes foram realizados no programa SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA), utilizando-se $p < 0,05$ para valores estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos descritos a seguir.

O primeiro artigo descreve os possíveis preditores da EM e de suas formas clínicas, tendo como base um modelo estatístico proposto pelo grupo de pesquisa em EM da UEL. Em novembro de 2015, foi submetido no *Molecular Neurobiology* (ISSN: 0893-7648 (*Print*) e v1559-1182 (*Online*), com fator de impacto 5,135, e aceito para publicação em março de 2016. O artigo foi disponibilizado *online* no PubMed em 30 de março de 2016.

O segundo artigo descreve os resultados da associação entre hipovitaminose D, marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo e incapacidade dos pacientes com EM.



Albumin and Protein Oxidation are Predictors that Differentiate Relapsing-Remitting from Progressive Clinical Forms of Multiple Sclerosis

Sayonara R. Oliveira¹ · Ana Paula Kallaur¹ · Edna M. V. Reiche² · Damacio R. Kaimen-Maciel³ · Carolina Panis⁴ · Marcell Alysson B. Lozovoy² · Helena K. Morimoto² · Michael Maes⁵ · Isaias Dichi⁶ · Andrea Name Colado Simão²

Received: 19 November 2015 / Accepted: 17 March 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The aim of the present study was to evaluate inflammatory, oxidative, and nitrosative stress (IO&NS) blood markers as possible predictors of multiple sclerosis (MS) and its clinical forms. This study included 258 MS patients (175 with relapsing-remitting MS (RRMS) and 83 with progressive MS clinical forms) and 249 healthy individuals. Peripheral blood samples were obtained to determine serum levels of albumin, ferritin, C-reactive protein (CRP), total protein, lipid hydroperoxide by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH), carbonyl protein content, advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide metabolites (NOx), and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). MS patients showed higher ferritin ($p < 0.001$) and CL-LOOH ($p < 0.001$) and lower albumin ($p = 0.001$), TRAP ($p < 0.001$), AOPP ($p = 0.013$), and NOx values ($p < 0.001$)

than controls. Difference was not observed in CRP, total protein, and carbonyl proteins between patients and controls. In the logistic regression age-adjusted, ferritin and CL-LOOH showed positive association with MS and were predictors of MS development (OR: 1.006, 95 % CI: 1.003–1.009, $p < 0.001$ and OR: 1.029, 95 % CI: 1.007–1.052, $p = 0.009$, respectively). Albumin, TRAP, AOPP, and NOx were negatively associated with MS ($p = 0.019$, $p = 0.003$, $p = 0.001$, and $p = 0.003$, respectively). Moreover, other logistic regression age-adjusted showed that MS patients with progressive clinical forms had lower albumin and higher AOPP than those with RRMS ($p = 0.037$). In conclusion, ferritin, albumin, and biomarkers of IO&NS, such as CL-LOOH, AOPP, TRAP, and NOx were predictors of MS diagnosis, whereas albumin and AOPP were predictors that differentiated RRMS from the progressive clinical forms of MS.

✉ Andrea Name Colado Simão
deianame@yahoo.com.br

Keywords Multiple sclerosis · Oxidative stress · Nitrosative stress · Inflammation · Clinical forms

¹ Postgraduate Program, Health Sciences Center, University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, 86038-440 Londrina, Paraná, Brazil

² Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, University Hospital, State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, Vila Operária, CEP 86038-350 Londrina, Paraná, Brazil

³ Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, 86038-440 Londrina, Paraná, Brazil

⁴ Laboratory of Inflammatory Mediators, University of West Paraná, UNIOESTE, Campus Francisco Beltrão, Paraná, Brazil

⁵ IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, VIC, Australia

⁶ Department of Internal Medicine, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and degenerative neurological disease in which damage to the central nervous system (CNS) causes widespread dysfunction [1]. In early disease, active bouts of demyelination are followed by periods of remission. The clinical form in which relapses are associated with the appearance of new lesions or reactivation of old lesions in the white matter of the brain and spinal cord and alternated with remission periods is named relapsing-remitting MS (RRMS) [2]. Over time, RRMS is followed by a phase of uninterrupted disease progression, termed secondary progressive MS (SPMS). However, in 10–20 % of

patients, RRMS is not present, but instead experience unremitting disease progression, named as primary progressive MS (PPMS) [3].

A growing body of evidences has shown that activated immune-inflammatory response, oxidative, and nitrosative stress (IO&NS) pathways play an important role in MS pathophysiology [4–6]. In all forms or stages of the disease, inflammation mediated by T cells, B cells, macrophages, activated microglia, and reactive oxygen and nitrogen species seem to drive demyelination and neurodegeneration. Furthermore, in the progressive stages, inflammation is increased in its extent and becomes, at least in part, trapped within the CNS behind the blood-brain-barrier (BBB) [6, 7]. Increased inflammatory status in MS patients has been demonstrated by elevation in pro-inflammatory cytokines in serum and cerebrospinal fluid (CSF) [8]. In addition, previous study from our group demonstrated that oxidative stress biomarkers were associated with clinical disability evaluated by Expanded Disability Status Scale (EDSS) [5].

MS is a disabling disease with a considerable unexplained heterogeneity in outcomes. Furthermore, the classification of MS clinical forms is still difficult [9]. We are not aware of any study, to date, in which IO&NS biomarkers were used to predict MS diagnosis and to differentiate its clinical forms in MS patients. Therefore, the objective of this study was to examine whether IO&NS biomarkers could be used as predictors of MS diagnosis and its clinical forms.

Materials and Methods

Subjects

The study included 258 MS patients, who were recruited from the Demyelinating Diseases Outpatient Department of the University of Londrina, Londrina, Paraná, Southern Brazil. The MS diagnosis was established according to the McDonald criteria [10], and the patients were classified as with RRMS ($n=175$) or with MS progressive clinical forms, including PPMS and SPMS ($n=83$); 220 MS patients were treated with interferon (IFN) β or other immunosuppressive drugs, and 38 were unmedicated for MS. The patients were clinically evaluated for disability using the Extended Disability Status Scale [11]. The control group consisted of 249 healthy individuals from the same geographic area. All the subjects were controlled for age, sex, ethnicity, body mass index (BMI), and waist circumference (WC). The nutritional status of the patients was similar to that of the control group. All of the individuals enrolled in the study did not drink alcohol or practiced physical activity regularly. None of them presented clinical symptoms or laboratory markers of heart, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal, or oncological diseases. None of the subjects were placed on a specific diet and were

receiving antioxidant supplements. The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of University of Londrina, Paraná, Brazil, and all of the individuals invited were informed in detail about the research and gave written informed consent.

Demographic, anthropometric, epidemiological, and clinical characteristics, as well the use of any therapeutic drugs before the inclusion in the study were obtained using a standard questionnaire on admission. The ethnicity was self-reported as Caucasians and non-Caucasians (Black, Afro-Brazilian, and Asiatic) [12].

Anthropometric Measurements

Body weight was measured to the nearest 0.1 kg by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning; height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. BMI was calculated as weight (kilogram) divided by height (meter) squared. WC was measured with a tape measure, by the same professional and expressed in centimeter.

Blood Collection

Peripheral blood samples were collected without anticoagulant after fasting for 12 h. For oxidative stress evaluation, peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant. All of the samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and the sera aliquots were stored in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Biochemical and Inflammatory Markers

Ferritin levels were determined by chemiluminescent micro-particle immunoassay (CMIA; Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Uric acid, albumin, and total protein were evaluated by a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Serum levels of high sensitivity CRP (hsCRP) were determined using a turbidimetric assay (ARCHITECT c8000, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Oxidative Stress Biomarkers

Tert-butyl Hydroperoxide-initiated Chemiluminescence (CL-LOOH)

Lipid hydroperoxides in plasma were evaluated by CL-LOOH as described previously [13], a method with higher sensitivity and specificity than the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement, the usual method to determine lipid oxidation. The results were expressed in counts per minute (cpm).

Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

AOPP was determined in the plasma samples using the semi-automated method [14]. AOPP results from oxidation of amino acid residues such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine-containing protein cross-linking products detected by spectrophotometry. AOPP concentrations were expressed as micromoles per Liter ($\mu\text{mol/L}$) of chloramines-T equivalents.

Carbonyl Protein Content

Carbonyl content was measured as an estimate of protein oxidative injury. Carbonyl protein content was determined as described previously by [15]. The results are expressed in nmol/mL/mg total proteins.

Nitric Oxide (NO)

Serum NO metabolite (NO_x) levels were assessed by nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) concentration according to the Griess reaction, supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [15]. The values were expressed as micrometer.

Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

The TRAP was determined as reported previously [16]. This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis(2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX, and the values of TRAP were expressed in equivalent of micrometer Trolox/UA mg/dL .

Statistical Analyses

Analyses of contingency tables (χ^2 test) were used to evaluate the associations between the characteristics of two study groups (patients and controls). Differences in demographic, clinical, and blood marker data between MS patients and controls were ascertained using analyses of variance (ANOVAs). Fisher's protected least significant difference (LSD at $p < 0.05$) was used to examine multiple comparisons between three study groups (RRMS, progressive MS, and controls). Bivariate logistic regression analysis was used to define the significant predictor, with odds ratio (OR) and 95 % confidence intervals (CI) of MS versus controls using the markers and other significant characteristic data. Multinomial logistic regression analysis was employed to delineate the significant predictors of RRMS and other MS clinical forms (progressive MS)

versus controls using the markers and other significant characteristic data. Tests for homogeneity of variance were carried out when appropriate (Levene test). Degree of freedom (df) was also demonstrated. All tests were two-tailed, and a p value of 0.05 was used for statistical significance.

Results

Characteristics of the MS Patients and Controls

Table 1 shows the baseline characteristics of the MS patients and controls included in this study. We did not use Bonferroni p -corrections to interpret the multiple statistical analyses listed in Table 1 that examines the differences in demographic, anthropometric, and clinical characteristics between the two groups. Indeed, the results of these univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables to be used as determinants of independent association with diagnostic groups in subsequent logistic regression analyses. Without p -correction, we found that controls were younger than MS patients and subsequently age was used as an additional explanatory variable in logistic regression analyses. As expected, there were no significant differences in female:male ratio, self-reported ethnicity, BMI, and WC between the two groups, since these variables were controlled.

Blood Marker Differences Between MS Patients and Controls

Table 2 shows the outcome of ANOVAs performed on the different blood markers that were evaluated in the present study. We found no significant differences in hsCRP, total protein, and carbonyl protein levels when MS patients and controls were compared. MS patients showed lower albumin ($p = 0.001$), TRAP ($p < 0.001$), AOPP ($p = 0.013$), and NO_x ($p = 0.001$) values, but higher ferritin ($p < 0.001$) and CL-LOOH ($p < 0.001$) values than controls. General linear model (GLM) analyses with sex as a second factor and age as covariate did not change any of these results.

Table 3 shows the outcome of a logistic regression analysis with MS group as dependent variable and the controls as the reference group and the significant blood markers shown in Table 2 as explanatory variables ($\chi^2 = 91.15$, $\text{df} = 6$, $p < 0.001$; Nagelkerke = 0.412). We found that ferritin and CL-LOOH were significantly and positively associated with MS, whereas albumin, TRAP, AOPP, and NO_x were significantly and negatively associated with MS. Using this regression analysis, 82.7 % of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 73.6 % and a specificity of 89.5 %.

Table 1 Baseline characteristics of patients with multiple sclerosis and healthy controls

Characteristics	MS patients (n=258)	Controls (n=249)	F or χ^2 ^a	df	p value
Age (years)	43.2 (\pm 13.8)	36.7 (\pm 10.9)	33.86	1	<0.001
Gender n (%)					
Male	77 (29.9)	72 (28.9)	0.053	1	0.818
Female	181 (70.1)	177 (71.1)			
Ethnicity n (%)					
Non-Caucasian	44 (23.3)	50 (20.1)	0.286	1	0.593
Caucasian	198 (76.7)	199 (79.9)			
Body mass Index (kg/m ²)	25.09 (\pm 5.1)	25.09 (\pm 4.4)	.000	1	0.996
Waist circumference (cm)	89.9 (\pm 13.8)	90.8 (\pm 12.1)	0.392	1	0.531
MS clinical forms n (%)					
RRMS	175 (67.8)	–	–	–	–
Others subtypes	83 (32.2)	–	–	–	–
Therapy n (%)					
Interferon beta	158 (61.2)	–	–	–	–
Other drugs	62 (24.0)	–	–	–	–
Without medication	38 (14.8)	–	–	–	–

The continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation (SD)

MS multiple sclerosis, RRMS relapsing-remitting multiple sclerosis, df degree of freedom

^a All the results of analyses of variance (F values) or analyses of contingency tables (χ^2 tests)

Effects of Background Variables

Because there were differences in age between the two diagnostic groups, the logistic regression analysis was re-run with age as additional covariate. Table 4 shows that all significances reported in Table 3 remained significant ($\chi^2=97.41$, df = 7, $p<0.001$; Nagelkerke = 0.435). Forced entry of BMI (Wald = 0.32, df = 1, $p=0.572$), ethnicity (Wald = 1.15, df = 1, $p=0.282$), and sex (Wald = 1.93, df = 1, $p=0.165$) showed that these variables were not significant in predicting MS and did not change the associations between the biomarkers and

MS. Since the drug state of the patients could be another possible factor modulating biomarker levels, their effects were evaluated on the results using ANOVA. This analysis showed no significant differences between MS patients treated or unmedicated in the levels of ferritin ($F=3.34$, df = 1/160, $p=0.069$), albumin ($F=0.01$, df = 1/162, $p=0.935$), TRAP ($F=0.13$, df = 1/126, $p=0.723$), CL-LOOH ($F=1.79$, df = 1/123, $p=0.183$), AOPP ($F=0.01$, df = 1/106, $p=0.955$), NOx ($F=1.55$, df = 1/113, $p=0.216$), carbonyl proteins ($F=0.95$, df = 1/112, $p=0.332$) (data not shown).

Table 2 Inflammatory, oxidative, and nitrosative stress markers in multiple sclerosis (MS) patients and healthy controls

Parameters	MS patients (n=258) (n, \pm SD, or %)	Controls (n=249) (n, \pm SD, or %)	F	df	p value
CRP (mg/L)	2.96 (\pm 4.15)	2.95 (\pm 4.72)	0.001	1/395	0.971
Ferritin (μ g/L)	214.0 (\pm 250.1)	94.6 (\pm 90.1)	40.39	1/370	<0.001
Total protein (g/dL)	7.35 (\pm 0.52)	7.42 (\pm 0.47)	2.08	1/366	0.150
Albumin (g/dL)	4.02 (\pm 0.422)	4.15 (\pm 0.310)	10.66	1/367	0.001
TRAP (μ M of Trolox/UA mg/dL)	663.7 (\pm 131.6)	721.1 (\pm 144.6)	12.84	1/307	<0.001
CL-LOOH (cpm)	25,384 (\pm 14,964)	16,770 (\pm 15,787)	23.25	1/306	<0.001
AOPP (μ mol/L of chloramine-T equivalents)	124.44 (\pm 51.06)	141.82 (\pm 61.43)	6.21	1/293	0.013
Carbonyl protein (nmol mL ⁻¹ mg ⁻¹ total protein)	78.02 (\pm 19.19)	77.21 (\pm 17.03)	0.03	1/134	0.859
NOx (μ M)	22.93 (\pm 30.26)	45.99 (\pm 26.01)	46.07	1/275	<0.001

The results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). All the results of analyses of variance (F values)

df degree of freedom, CRP C-reactive protein, TRAP total radical-trapping antioxidant parameter, UA uric acid, CL-LOOH tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, AOPP advanced oxidation protein product, NOx nitric oxide metabolites

Table 3 Logistic regression analysis with multiple sclerosis as dependent variable (healthy controls are the reference group) and the listed biomarkers as explanatory variables

Explanatory variables	Wald	df	p value	Odds ratio	95 % Confidence interval	
					Lower	Upper
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	19.10	1	<0.001	1.006	1.003	1.009
Albumin (g/dL)	5.85	1	0.016	0.306	0.118	0.799
TRAP (μM of Trolox/UA mg/dL)	8.31	1	0.004	0.996	0.994	0.999
CL-LOOH (cpm)	6.20	1	0.013	1.030	1.006	1.053
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ of chloramine-T equivalents)	9.66	1	0.002	0.990	0.983	0.996
NOx (μM)	10.62	1	0.001	0.978	0.965	0.991

df degree of freedom, TRAP total radical-trapping antioxidant parameter, UA uric acid, CL-LOOH tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, AOPP advanced oxidation protein product, NOx nitric oxide metabolites

Characteristics of RRMS patients

As shown in Table 1, we included 175 patients with RRMS and 83 with progressive clinical forms of MS, named as other subtypes, and the values of the biomarkers between these two MS subgroups and controls were compared. Table 5 shows the outcome of ANOVAs and protected LSD tests (performed at $p < 0.05$). All the biomarkers evaluated, except carbonyl protein groups, were significantly different between the RRMS, other subtypes, and controls. Ferritin and CL-LOOH were significantly higher in both MS subgroups than in controls ($p < 0.001$); albumin was significantly lower in MS patients with progressive forms than in controls and those with RRMS ($p < 0.001$); TRAP and NOx were significantly lower in both MS subgroups than in controls ($p = 0.002$ and $p < 0.001$, respectively); and AOPP was significantly lower in RRMS than in controls ($p = 0.013$).

Table 6 shows the outcome of a multinomial logistic regression analysis with the two subgroups of MS patients and controls as dependent variable and the biomarkers and age as explanatory variables. The overall regression was highly significant ($\chi^2 = 116.20$, $df = 14$, $p < 0.001$; Nagelkerke = 0.446).

Table 4 Logistic regression analysis with multiple sclerosis as dependent variable (healthy controls as the reference group) and the listed biomarkers and age as explanatory variables

Explanatory variables	Wald	df	p value	Odds ratio	95 % Confidence interval	
					Lower	Upper
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	19.44	1	<0.001	1.006	1.003	1.009
Albumin (g/dL)	5.51	1	0.019	0.309	0.116	0.824
TRAP (μM of Trolox/UA mg/dL)	8.90	1	0.003	0.996	0.993	0.999
CL-LOOH (cpm)	6.74	1	0.009	1.029	1.007	1.052
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ of chloramine-T equivalents)	10.83	1	0.001	0.989	0.982	0.995
NOx (μM)	8.82	1	0.003	0.980	0.967	0.993
Age (years)	5.99	1	0.014	1.035	1.007	1.064

df degree of freedom, TRAP total radical-trapping antioxidant parameter, UA uric acid, CL-LOOH tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, AOPP advanced oxidation protein product, NOx nitric oxide metabolites

Patients with other MS subtypes were significantly differentiated from controls by increased ferritin and lowered albumin levels. Patients with RRMS were significantly differentiated from controls by increased ferritin and CL-LOOH and lowered TRAP, AOPP, and NOx. Albumin and AOPP were significantly different between patients with RRMS versus those with other MS clinical forms.

Discussion

The main finding of the present study was that ferritin and albumin and some oxidative stress blood markers (CL-LOOH, AOPP, NOx, and TRAP) may be considered as predictors of MS, independently of sex, age, and treatment of the patients. In this model of analysis, 82.7 % of MS patients were correctly classified with MS, with sensitivity of 73.6 % and specificity of 89.5 %. The second major finding of this study was that patients with progressive clinical forms of MS presented lower levels of albumin and higher AOPP levels than those with RRMS.

Table 5 All the results of variance between inflammatory, oxidative, and nitrosative stress blood markers in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), progressive MS clinical forms (other subtypes), and healthy controls

Biomarkers	Controls ^a (n = 249) (mean ± SD)	Other subtypes ^b (n = 83) (mean ± SD)	RRMS ^c (n = 175) (mean ± SD)	F	df	p value
Ferritin (µg/L)	94.65 (±90.11) ^{b,c}	176.25 (±190.99) ^a	230.615 (±269.76) ^a	22.18	2/368	<0.001
Albumin (g/dL)	4.15 (±0.31) ^b	3.88 (±0.32) ^{b,c}	4.08 (±0.44) ^b	10.21	2/365	<0.001
TRAP (µM of Trolox/UA mg/dL)	721.1 (±144.6) ^{b,c}	666.1 (±159.68) ^a	662.9 (±122.9) ^a	6.41	2/306	0.002
CL-LOOH (cpm)	16,770 (±15,787) ^{b,c}	26,831 (±19,844) ^a	24,992 (±13,125) ^a	11.78	2/305	<0.001
AOPP (µmol/L of chloramine-T equivalents)	141.82 (±61.43) ^c	141.14 (±71.24)	119.72 (±43.14) ^a	4.41	2/292	0.013
Carbonyl protein (nmol mL ⁻¹ mg ⁻¹ total protein)	77.21 (±17.03)	81.39 (±21.26)	77.05 (±18.56)	0.55	2/133	0.579
NOx (µM)	45.99 (±26.01) ^{b,c}	27.32 (±25.34) ^a	21.68 (±31.54) ^a	23.43	2/273	<0.001

F values: analyses of variance

RRMS relapsing-remitting multiple sclerosis, SD standard deviation, df degree of freedom, TRAP total radical-trapping antioxidant parameter, UA uric acid, CL-LOOH tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, AOPP advanced oxidation protein product, NOx nitric oxide metabolites

^{a,b,c} Results of protected least significant difference (LSD) at $p < 0.05$. Other subtypes included progressive forms of multiple sclerosis

In the current study, patients with MS showed significant increase in lipid hydroperoxides, measured using plasma chemiluminescent method, and this result is in agreement with other studies, which demonstrated increased lipid

peroxidation, but using different methods [4, 17]. Previous study [5] showed an association between oxidative stress measured by plasma chemiluminescence and disability of the MS patients and that lipid peroxidation was present even in

Table 6 Multinomial logistic regression analyses with multiple sclerosis (MS) patients divided into those with relapsing-remitting MS (group 2) and those with other clinical forms (group 1) as dependent

variables (healthy controls as the reference group or group 0) and the listed biomarkers and age as explanatory variables

Variables	χ^2	df	p value	Wald for contrasts	p value	OR	95 % CI
Ferritin (µg/L)	34.20	1	<0.001	A vs B: 9.32	0.002	1.005	1.002–1.008
				A vs C: 20.19	<0.001	1.006	1.004–1.009
				B vs C: 1.906	0.167	0.999	0.996–1.001
Albumin (g/dL)	11.43	1	0.003	A vs B: 10.26	0.001	0.074	0.015–0.363
				A vs C: 1.93	0.165	0.473	0.165–1.361
				B vs C: 5.32	0.021	0.155	0.032–0.756
TRAP (µM of Trolox/UA mg/dL)	10.52	1	0.005	A vs B: 1.84	0.175	0.997	0.994–1.001
				A vs C: 9.37	0.002	0.996	0.993–0.998
				B vs C: 0.90	0.343	1.002	0.998–1.006
CL-LOOH (cpm)	9.08	1	0.011	A vs B: 1.24	0.266	1.018	0.987–1.050
				A vs C: 8.24	0.004	1.033	1.010–1.056
				B vs C: 1.02	0.312	0.986	0.958–1.014
AOPP (µmol/L of chloramine-T equivalents)	17.30	1	<0.001	A vs B: 0.86	0.354	0.996	0.987–1.005
				A vs C: 13.84	<0.001	0.985	0.977–0.993
				B vs C: 4.33	0.037	1.011	1.001–1.021
NOx (µM)	13.15	1	0.001	A vs B: 0.94	0.333	0.333	0.972–1.010
				A vs C: 10.04	0.002	0.975	0.960–0.990
				B vs C: 1.96	0.161	1.016	0.994–1.039
Age (years)	10.30	1	0.006	A vs B: 9.48	0.002	1.065	1.023–1.109
				A vs C: 2.19	0.139	1.023	0.993–1.054
				B vs C: 3.89	0.049	1.042	1.000–1.085

A: controls, B: other subtypes included progressive forms of multiple sclerosis, and C: relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS)

df degree of freedom, OR odds ratio, CI confidence interval (lower–upper limit), TRAP total radical-trapping antioxidant parameter, CL-LOOH tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, AOPP advanced oxidation protein product, NOx nitric oxide metabolites

patients in clinical remission, suggesting that at least at the molecular level the neurological damage process could be continuous and could lead to the progression of the disease.

Unexpectedly, AOPP was lower in MS patients when compared in controls and between the MS clinical forms. The decreased AOPP in MS patients could be explained by several factors. Some pro-oxidant decreased levels may be related to MS pathophysiology and to the role of reactive substances and their metabolites in redox signaling. For instance, irreversible modifications induced by oxidative stress, such as protein oxidation, are generally associated with permanent loss of protein function and may lead to the progressive accumulation of damage proteins. In cells, the level of progressive accumulation of modified proteins reflects the balance between the rate of protein oxidation and the rate of oxidized protein degradation, and is dependent of multiple factors that influence the levels of pro- and antioxidant and the levels of proteases that catalyze the degradation of oxidized protein residues [18, 19]. Thus, different diseases in different phases may present a different profile in oxidative stress markers.

Our data also showed that the serum levels of NOx were lower in MS patients compared in controls. There have been conflicting results regarding the role of nitric oxide (NO) in the pathophysiology of MS [20, 21]. While some studies demonstrated elevated NOx levels among the MS patients [21], others showed lower levels [5, 20]. These conflicting results could be explained by some factors, including the effect of therapies on NO, such as IFN- β , which can decrease induced-NO synthesis in a dose-dependent manner by the inhibition of inducible NO synthase (iNOS) [22]. In this study, 158 patients were treated with IFN- β , which may influence the results obtained. It is also likely that the reduction in NOx levels is associated with redox imbalance demonstrated in this study. It is known that inflammation elevates reactive oxygen species levels and that increased NO consumption occurs with high inflammatory activity, resulting in decreased serum NOx bioavailability. Furthermore, NO is consumed when it reacts with superoxide anion, producing the strong oxidant species peroxynitrite (ONOOH⁻) [5, 23] that is toxic for oligodendrocytes and axons and seems to be a key molecule of IO&NS involved in the pathophysiological mechanisms of MS [24].

Antioxidant deficiencies may occur during the clinical course of MS as result of chronic inflammation that is accompanied by increased oxidative stress [25]. Taken together our results show changes in the redox status in MS patients. Our group has already demonstrated significant increased plasma lipid oxidation and a strong decrease in plasma total antioxidant capacity in patients with MS [5]. Similar results were obtained in the present study; however, with an additional result suggesting that these markers could be predictors of MS development.

Elevated serum levels of ferritin during the inflammatory response are due to release from damaged tissues, increased

synthesis, as well as decreased clearance of this positive acute phase protein; therefore, it may play an important role as pro-oxidant molecule [19, 26]. In addition, IFN- β therapy increases ferritin concentration in MS patients [27]. Among the MS patients included in the present study, 61.2 % were in treatment with IFN- β ; however, the analysis showed that significant differences were not observed in the serum levels of ferritin and other blood markers among those treated or unmedicated patients. Nevertheless, controversy exists whether ferritin has pro- or antioxidant properties. Oligodendrocytes have high concentrations of ferritin and iron [1, 28], and elevated ferritin levels could be a defense mechanism against iron-induced oxidative injury. However, observations that superoxide can mobilize iron from ferritin suggest that exposure to oxygen radicals may, in fact, increase the pool of reactive iron and exacerbate oxidant injury [29]. Taken together with the other data verified in the oxidative status of MS patients, our study is in agreement with the later hypothesis.

In the present study, ferritin and CRP did not differ when the MS clinical forms were compared, contrasting from higher levels of ferritin obtained in CSF samples of patients with progressive forms of MS [1]. The variability among different ethnic populations, degree of disability of MS patients, time for sample collection in the long-term evolution of the disease, and different assays used by previous studies, also could contribute to some divergent results.

Albumin is a negative acute phase reactant and constitutes an important extracellular antioxidant defense in blood plasma. This protein possesses antioxidant properties, such as binding copper tightly and iron weakly, scavenging free radicals, hypochlorous acid (HOCl) and peroxynitrite, and providing thiol group [30]. In the present study, it is possible that the decreased albumin levels could contribute to oxidative and nitrosative stress verified in MS patients. The reduced levels of albumin and AOPP were the only biomarkers capable of differentiating RRMS from the other clinical forms.

The change verified in the levels of acute phase proteins, ferritin, and albumin, in the present study may have contributed to the redox imbalance and immune-inflammatory burden in MS. The interplay between all of these factors leads to self-amplifying feed forward loops causing a chronic state of activated IO&NS, immune-inflammatory and autoimmune pathways, which may sustain the disease.

There are limitations in the current study that may be considered. First, the single-point measurement of the IO&NS markers since repeated measures should be necessary to define the variance of our findings, as well as the predictive nature of a biomarker. However, in support to our findings, several studies previously reported the usefulness of a single-point measurement of these markers in MS. Second is the relative small number of individuals with progressive MS clinical forms. In contrast, strengths of our study are the adjusted results performed for many potential confounders,

including age, sex, ethnicity, and MS therapy. In addition, this study evaluated the IO&NS with several different methodologies making possible to find biomarkers, which could be adequate and useful as predictive model for evaluating MS patients.

In conclusion, we have constructed a model of MS diagnosis in which IO&NS biomarkers, such as ferritin, albumin, CL-LOOH, AOPP, TRAP, and NOx were the main predictors, whereas albumin and AOPP were the predictors that differentiated RRMS from the MS progressive clinical forms. Further studies with large number of patients are warranted to confirm the present results.

References

- LeVine SM, Lynch SG, Ou CN, Wulser MJ, Tam E, Boo N (1999) Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Brain Res* 821:511–515
- Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, Muraro PA, Ebers GC (2014) Onset of secondary progressive phase and longterm evolution of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:67–75
- Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907–911
- Ferretti G, Bacchetti T, Principi F, Di Ludovico F, Viti B, Angeleri VA, Danni M, Provinciali L (2005) Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler* 11:677–682
- Oliveira SR, Kallaur AP, Simão AN, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, Petenucci DL, da Silva E et al (2012) Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci* 321:49–53
- Haider L (2015) Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Celular Oxid Med Longev* 2015:725.370
- Rossi S, Motta C, Studer V, Barbieri F, Buttari F, Bergami A, Sancenario G, Bernardini S et al (2014) Tumor necrosis factor is elevated in progressive multiple sclerosis and causes excitotoxic neurodegeneration. *Mult Scler* 3:304–312
- Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, Murai H, Kira J (2013) Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 4, e61835
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW et al (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121–127
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302
- Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444–1452
- Brazil IBGE (2011) Brazilian Institute of Geography and Statistics. Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. Available in: http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed 16 July, 2013.
- Gonzales-Flecha BG, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93–100
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P et al (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524–2532
- Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, Colado Simão AN, Cecchini AL et al (2012) Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 133:89–97
- Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255:107–117
- Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema D, De Keyser J (2007) Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 14: 529–533
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 3:709–718
- Lozovoy MA, Simão AN, Oliveira SR, Iryioda TM, Panis C, Cecchini R, Dichi I (2013) Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 4:303–310
- de Bustos F, Navarro JA, de Andrés C, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Orti-Pareja M, Gasalla T, Tallón-Barranco A et al (1999) Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 41:44–47
- Danilov AI, Andersson M, Bavand N, Wiklund NP, Olsson T, Brundin L (2003) Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 136:112–118
- Guthikonda P, Baker J, Mattson DH (1998) Interferon-beta-1-b (IFN-β) decreases induced nitric oxide (NO) production by a human astrocytoma cell line. *J Neuroimmunol* 82:133–139
- Simão AN, Lozovoy MA, Simão TN, Venturini D, Barbosa DS, Dichi JB, Matsuo T, Cecchini R et al (2011) Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress. *Braz J Med Biol Res* 44:606–728
- Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* 274:48–53
- van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, van Tol EA (2005) Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr* 59:1347–1361
- Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV (2010) Serum ferritin: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 1800:760–769
- Strupp M (2010) News on multiple sclerosis: induction of immune tolerance, a biomarker for predicting disease activity, and CSF ferritin levels. *J Neurol* 257:2114–2116
- Connor JR, Boeshore KL, Benkovic SA, Menzies SL (1994) Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J Neurosci Res* 37:461–465
- Arosio P, Levi S (2002) Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 33:457–463
- Sitar ME, Aydin S, Cakatay U (2013) Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin Lab* 59:945–949

**VITAMIN D DEFICIENCY IS ASSOCIATED WITH DISABILITY IN MULTIPLE
SCLEROSIS PATIENTS INDEPENDENTLY OF OXIDATIVE AND
NITROSATIVE STRESS**

Sayonara R Oliveira¹, Daniela Frizon Alfieri¹, Ana Paula Kallaur¹, Andréa NC Simão² Isaias Dichi³, Marcell Alysson B Lozovoy², Beatriz Sardinha Sabino⁴, Katerine Panichi Zanin Ferreira¹, Wildea LCJ Pereira^{1,5}, Damacio R Kaimen-Maciel^{3,5}, Edna MV Reiche²

¹Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

²Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

³Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁴Pharmacy School, Health Sciences Center, State University of Londrina; Londrina, Paraná, Brazil.

⁵Outpatient Clinic of Demyelinating Diseases, University Hospital, State University of Londrina; Londrina, Paraná, Brazil.

Correspondence author: Andréa Name Colado Simão. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; deianame@yahoo.com.br. Phone: +55-43-3371-2321; FAX: +55-43-3371-2619

Abstract

Background: The aim of this study was to assess vitamin D status in patients with multiple sclerosis (MS) and to evaluate whether it was associated with oxidative and nitrosative stress (O&NS) markers and disability.

Methods: This study included 137 patients with MS and 218 healthy controls. At the inclusion of patients, the disability was obtained using Disability Expanded Status Scale (EDSS) and blood samples were obtained to evaluate the serum levels of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and O&NS markers, such as lipid hydroperoxides, advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide metabolites (NOx), and total radical-trapping antioxidant parameter TRAP/UA). MS patients were divided in two groups: non deficient [25(OH)D \geq 20 ng/mL] and deficient [25(OH)D <20 ng/mL].

Results: Among the patients, 91 (66.4%) were female and 112 (81.7%) were Caucasians. MS patients presented higher age ($p < 0.0001$), and lower 25(OH)D ($p = 0.002$), NOx, and TRAP/UA (< 0.0001) than controls. When the age was used as an additional explanatory variable in binary logistic regression analyses, 25(OH)D, NOx, and TRAP/UA remained significant ($p = 0.016$, $p < 0.0001$, and $p = 0.002$, respectively). Patients with 25(OH)D <20 ng/mL showed higher EDSS ($p = 0.016$) and lower AOPP ($p = 0.046$) than those with 25(OH)D \geq 20 ng/mL. After the binary logistic regression analyses, EDSS remained significantly associated with vitamin D deficiency. A binary logistic regression analysis also showed that lower levels of 25(OH) were associated with higher EDSS independently of variables such as O&NS (AOPP and NOx), age, sex, body mass index, ethnicity, disease duration, MS therapy, use of interferon beta, and clinical forms of MS (odds ratio: 1.380, 95% confidence interval 1.030-1.843, $p = 0.031$). Moreover, the study showed an association between serum levels of 25(OH)D and EDSS ($r^2 = 0.115$, $p = 0.002$), demonstrating that 25(OH)D may contributed with 11.5% of increase in EDSS.

Conclusion: Our results suggest that vitamin D deficiency may be considered one of the predictors of the disability in MS patients, independently of their redox status, probably through different anti-inflammatory and immunoregulatory properties of this hormone. Further studies are warranted to a better comprehension of the mechanisms involved in the interaction between hypovitaminosis D, O&NS markers and disability in MS.

Keywords: multiple sclerosis, vitamin D, disability, oxidative stress, nitrosative stress, EDSS

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease characterized by immune-mediated damage of central nervous system (CNS) and its etiology has been attributed to a complex interaction between several genetic and environmental factors [1-3].

Recent evidence suggests that inflammation and oxidative/nitrosative stress (IO&NS) are the major causes of ongoing tissue damage in MS patients. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are produced by active macrophages and microglia and are, thus, likely candidates to be involved in tissue damage in MS [4]. Haider et al. (2011) showed an important role of oxidative damage in the pathogenesis of demyelination and neurodegeneration in MS lesions, which may act in addition to nitric oxide radicals [5]. In a previous report we showed that patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) presented higher levels of oxidative stress markers than healthy individuals and that lipid and protein oxidation were correlated with the disability of the patients evaluated by the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [6].

Deficiency of vitamin D might be one of the most attractive candidates among the environmental factors that have been suggested to contribute to the development and progression of MS [7-9]. Low levels of vitamin D have been reported during the remitting clinical phase of the disease in patients with RRMS [8,10,11] and these levels correlated inversely with disability [8,11].

Vitamin D shows important anti-inflammatory and immunomodulatory effects [12,13] and some studies have reported possible association between vitamin D and oxidative stress markers [14,15]. The results regarding the antioxidant properties are scarce and conflicting. While some studies showed that vitamin D supplementation reduces the oxidative stress markers [14,15], others did not confirm this result [16,17]. Several studies have demonstrated the effect of vitamin D deficiency on oxidative stress in different conditions [18-21], however, at the best of our knowledge, no study has been performed in MS patients.

Considering that IO&NS are intrinsically associated in the development and progression of MS [4-6] and that evidences show that patients with MS have lower serum levels of vitamin D [7-11], we hypothesized that this reduction could be associated with oxidative and nitrosative stress (O&NS) markers, contributing to the increase of disability of the MS patients. Therefore, the aim of the present study was to assess the vitamin D status in MS patients and to evaluate whether low serum levels of vitamin D were associated with O&NS markers, as well as with disability of them.

Methods

Subjects

This study included 137 patients with MS who were recruited from the Neurology Outpatient of the University Hospital, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. The diagnosis of MS was established according to the McDonald criteria [22] and the patients were clinically evaluated for disability using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [23].

The control group consisted of 218 healthy individuals selected among blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina with similar nutritional status of the patients. None of the participants of the study presented clinical symptoms of heart, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal, or oncological diseases, as well as none of them were receiving antioxidant and/or vitamin D supplementation.

The protocol (CAAE n° 0140.0.268.000-10) was approved by the Institutional Research Ethics Committee of State University of Londrina, Paraná, Brazil, and all individuals invited were informed in detail about the research and gave written informed consent.

Anthropometric Measurements

Body weight was measured to the nearest 0.1 kg by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning; height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

Status of vitamin D

The quantitative determination of 25-hydroxivitamin D [25(OH)D] was assayed using the chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), and the results were expressed as ng/mL. The individuals were categorized according to their vitamin D status, as deficient when 25(OH)D < 20 ng/mL and non deficient when (25(OH)D \geq 20 ng/mL), based on previous reports [11, 24].

Oxidative and nitrosative stress (O&NS) markers

Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH)

Plasma levels of lipid hydroperoxide were evaluated by CL-LOOH as described previously [25] and the results were expressed in relative light unit (RLU).

Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

AOPP was determined in the plasma samples using the semi-automated method described previously [26]. AOPP results from oxidation of amino acid residues such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine-containing protein cross-linking products detected by espectrophotometry. AOPP levels were expressed as umol/L of chloramines-T equivalents.

Determination of nitric oxide metabolites (NOx)

Serum levels of NOx were assessed by nitrite (NO₂⁻) concentration according to the Griess reaction, supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [27].

Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)

The TRAP was determined as reported [28]. This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX. Uric acid (UA) serum levels were determined using a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL) and were used to correct the TRAP values. The TRAP results were expressed by the mM Trolox/UA mg/mL ratio [29].

Statistical analyses

Categorical data were analyzed by chi-square test and were expressed as absolute number and percentage. Comparisons between two groups were performed using ANOVA and data were expressed as mean \pm standard deviation (\pm SD). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analyses when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test). To determine association between O&NS parameters, 25(OH)D and MS diagnosis, the variables that presented $p < 0.10$ in the univariate analyses were included in the binary logistic regression model. The linear regression analysis with six models was also performed to verify the association between 25(OH) levels and EDSS. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also determined. All the results were considered significant when $p < 0.05$. The software SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) was used for the analysis.

Results

Characteristics of the subjects

Table 1 shows the demographic, anthropometric, and clinical characteristics of the MS patients and controls included in the study. Patients were older than controls (mean 42.68 ± 13.43 vs. 35.67 ± 10.45 years, $p < 0.0001$); other parameters including sex, ethnicity, BMI, smoking, and the frequency of comorbidities, such as type 2 diabetes mellitus and hypertension, did not differ when patients and controls were compared. Most of the patients 97 (70.8%) presented RRMS, the mean of EDSS and duration of the disease were 3.28 and 8.04 years, respectively. Regarding the therapy, 76 (55.5%) were using interferon (IFN)- β (1a or 1b) and 30 (21.9%) glatiramer acetate.

Table 2 shows the vitamin D status and O&NS markers in MS patients and controls. The frequency of vitamin D deficient status was higher in MS patients than controls (24.08% vs. 10.55%, $p = 0.001$); moreover, MS patients showed lower 25(OH)D levels than controls ($26.12 \text{ ng/mL} \pm 8.47$ vs. $29.71 \text{ ng/mL} \pm 9.17$, $p = 0.002$). Regarding the O&NS markers, MS patients showed lower NOx ($17.05 \text{ } \mu\text{M} \pm 12.35$ vs. $34.84 \text{ } \mu\text{M} \pm 27.39$, $p < 0.0001$) and TRAP ($182.98 \text{ } \mu\text{M}$ of Trolox/UA mg/dL ± 59.44 vs. $239.63 \text{ } \mu\text{M}$ of Trolox/UA mg/dL ± 123.00 ,

$p < 0.0001$) than controls. AOPP and CL-LOOH did not differ between the patients and controls ($p > 0.05$).

As the MS patients and controls differed in age, a binary logistic regression analysis was made between the presence of MS and the variables that presented significance in the univariate analysis with age as an additional covariate (Table 3). The results showed that low levels of 25(OH)D, NO_x, and TRAP/UA remained negatively associated with MS ($p = 0.016$, $p < 0.0001$, and $p = 0.02$, respectively).

Clinical and laboratory parameters of MS patients according to their vitamin D status

The characteristics of the MS patients stratified according to their vitamin D status are summarized in Table 4. The variables sex, ethnicity, age, BMI, smoking, and treatment for MS did not differ between those with and without vitamin D deficient status. MS patients with vitamin D deficient status showed higher EDSS when compared to those without vitamin D deficient status (4.41 ± 2.91 vs. 2.91 ± 2.03 , $p = 0.016$). AOPP showed lower levels among the patients with 25(OH)D < 20 ng/mL than those ≥ 20 ng/mL (133.83 ± 58.95 vs. 164.99 ± 91.40 , $p = 0.046$). However, after a binary logistic regression analysis with EDSS, AOPP, and other variables with $p < 0.1$, such as NO_x ($p = 0.091$) and IFN therapy ($p = 0.100$), only EDSS remained significantly associated with the vitamin D status.

Thereafter, some results of the univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables as determinants of independent association between vitamin D status and EDSS in subsequent models of logistic regression analyses (Table 5). With model 1, adjusted for AOPP and NO_x, low levels of 25(OH)D was associated with EDSS (OR: 1.311, 95% CI: 1.080-1.590, $p = 0.006$); with model 2, that included model 1 and additionally adjusted for age, sex, BMI, and ethnicity, low levels of 25(OH)D remained associated with EDSS (OR: 1.387, 95% CI: 1.086-1.771, $p = 0.009$); with model 3, that included model 2 and disease duration (years), this association remained significant (OR: 1.492, 95% CI: 1.127-1.979, $p = 0.005$); with model 4, that included model 3 and any MS treatment, the association also remained significant (OR: 1.531, 95% CI: 1.143-2.049, $p = 0.004$); when any MS treatment was excluded and IFN therapy was added into model 5, the association also remained significant (OR: 1.482, 95% CI: 1.110-1.976, $p = 0.007$). Finally, with model 6, that included model 4 and was additionally adjusted for MS clinical

forms, this association remained significant (OR: 1.380, 95% CI: 1.030-1.843, $p=0.031$). In addition, there was an association between EDSS and 25(OH)D levels ($r^2=0.115$; $p=0.002$) and this result showed that 11.5% of EDSS can be explained by the variations of vitamin D levels (Figure 1).

Moreover, the serum levels of 25(OH)D did not differ between the patients with different clinical forms, such as RRMS and progressive MS ($26.39 \text{ ng/mL} \pm 8.06$ vs. $25.44 \text{ ng/mL} \pm 9.49$, $p=0.553$) (data not shown).

Discussion

The main findings of the present study were that low vitamin D deficiency status and the redox changes are associated with the presence of MS, although the deficient vitamin D status was associated with the increase of disability independently of the O&NS. Even after controlling for the classical variables that could interfere in the disability of the patients, such as sex, age, ethnicity, duration of the disease, and therapy for MS, the low levels of 25(OH)D remained associated with the EDSS scores. Therefore, vitamin D deficiency status can be considered an independent factor associated with the disability of the patients. In addition, the present study showed a negative association between low levels of NOx and total antioxidant capacity and MS.

Our results are consistent with previous studies that also described low levels of vitamin D in patients with MS and their association with disability [8,11]. Apart from its classical effects on bone and skeletal homeostasis [30], vitamin D has been associated with the regulation of inflammatory response through several mechanisms, such as inhibiting prostaglandin, mitogen-activated protein kinase (MAPK, and nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathways [31,32], downregulation of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-12, and interferon (IFN)- γ , and upregulation of anti-inflammatory T regulatory (Treg) and Th2 cells and their cytokines [33-35]. All these potential inflammatory mechanisms may explain the association between vitamin D deficiency and MS, as well with disability. Moreover, vitamin D induces neuroprotection by increasing neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF), neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) [36, 37]. Therefore, vitamin D deficiency may increase disability by decreasing the availability of neuroprotective growth factors.

The reason why MS patients generally have lower serum 25(OH)D levels than healthy controls could be a combination of insufficient vitamin D intakes and decreased outdoor activities caused by lifestyle changes associated with the increasing disability [38]. In addition, the present study showed that low levels of the vitamin D may contribute with 11.5% of increase in disability of the patients. Our data are in agreement with a recent study [39], which demonstrated that high serum levels of 25(OH)D robustly predicted a low degree of MS activity, magnetic resonance imaging (MRI) lesion load, brain atrophy, and clinical progression evaluated by EDSS over 5 years of follow-up.

Previous studies reported that vitamin D levels were significantly higher in RRMS than in progressive forms of MS [8, 11]. In contrast to these authors, our results showed that serum levels of 25(OH)D did not differ among the patients with different clinical forms of MS. One reason for this discrepancy could be that, in the present study, we evaluated progressive forms, such as primary progressive MS (PPMS) and secondary progressive (SPMS) in the same subgroup due to the small number of individuals with these clinical forms, while the previous studies [8,11] evaluated them separately.

Regarding the O&NS, patients with MS showed an unfavorable oxidative stress profile, as previously demonstrated [6, 40, 41]. In the present study, patients with MS showed low levels of NO_x and total antioxidant capacity that were negatively associated with the presence of MS. It has been suggested that NO production via inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays an important role in the pathogenesis of several systemic autoimmune disorders [42]. It is feasible to suggest that in conditions of inflammation and increased oxidative stress, such as MS, NO is consumed in a reaction with superoxide anion yielding the strong oxidant peroxynitrite, which in turn accelerates the lipid peroxidation reaction and decrease NO bioavailability [42,43].

The lower plasma total antioxidant capacity observed among the MS patients compared to controls is also in agreement with previous studies [6,44]. Antioxidant deficiencies may occur during the course of MS as result of chronic inflammation and oxidative stress; however, it is not clear if antioxidant deficiency in MS is constitutive or due to excessive antioxidant consumption to cope with oxidative stress [45].

Our results showed that the O&NS markers did not differ in MS patients according to their vitamin D status. Studies have shown that deficient 25(OH)D levels increased O&NS

and inflammatory response in different conditions, such as non-alcoholic fatty liver disease in adults [14], obesity in children [18], and chronic hepatitis C [21], but there is no information on MS patients. Moreover, the results are conflicting regarding the antioxidant property of vitamin D. While some studies show an association between vitamin D and oxidative stress markers [14,15,19, 21], others did not show changes in the oxidative stress markers after vitamin D supplementation [16,17]. A double-blind and placebo controlled clinical trial carried out with women with gestational diabetes mellitus did not observe difference in the oxidative stress markers after vitamin D supplementation [16]. Other study also did not show significant effects of vitamin D on oxidative stress markers in patients with type 2 diabetes mellitus [17].

At our knowledge, the present study is the first to evaluate whether vitamin D is associated with O&NS markers and disability of MS patients. Our results showed that deficiency of vitamin D is associated with increased disability but not through the oxidative stress lesive mechanisms evaluated using the makers aforementioned in this study. Different O&NS markers of lipid, protein, and nucleic acid damage than those evaluated in the present study should be further included in this model of analysis.

Probably, the vitamin D deficiency fails to modulate inflammatory pathways that are involved in the pathophysiological mechanisms of MS and the disability of the patients. Studies reported that vitamin D deficiency is associated with inflammatory markers [15, 18], through increased TNF- α and transcription nuclear factor kappa B (NF-kB) expression compared to those patients with vitamin D sufficiency [18].

One limitation of the present study is the small number of patients with progressive clinical forms of MS that may influence the statistical analysis of the results. Although the current study design does not allow to link the vitamin D deficiency with the causality of MS and disability of patients, the independent association observed suggested that vitamin D deficiency may be considered one predictor of the disability in MS patients and underscores the important role of vitamin D in the MS pathophysiology. Although previous studies have already shown an association between vitamin D and EDSS [8,11], the strength of the present study can be considered the robust statistical analysis with stepwise models to evaluate whether other possible factors besides vitamin D deficiency could interfere in the disability of the patients.

Taken together, our results suggest that vitamin D deficiency may be considered one of the predictors of the disability in MS patients, independently of their redox status, probably through different anti-inflammatory and immunoregulatory properties of vitamin D. Further studies are warranted to a better comprehension of the mechanisms involved in the interaction between hypovitaminosis D, O&NS markers and disability in MS.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All the authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Kallaur AP, Kaimen-DR Maciel, Morimoto HK, et al. (2011) Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis (review). *Int J Mol Med* 28 (4): 467-79.
- 2 Luckey D, Bastakoty D, Mangalam AK (2011) Role of HLA class II genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: studies using HLA transgenic mice. *J Autoimmun* 37:122–128
- 3 Moroni L, Bianchi I, Lleo A (2012) Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 11:A386–A392
- 4 Van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J et al (2008) Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesion coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radical Biology & Medicine* 45: 1729-1737.
- 5 Haider L, Fischer MT, Frischer JM et al (2011) Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134(Pt 7):1914-1924.

6 Oliveira SR, Kallaur AP, Simão AN et al (2012) Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci* 321 (1-2): 49-53.

7 Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. *Ann Neurol* 61: 504–513

8 Smolders J, Menheere P, Kessels A et al (2008) Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14: 1220–1224

9 Kjell-Morten M (2009) Vitamin D treatment in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 286: 104–108

10 Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I et al (2005) 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 11:266– 271

11 Thouvenota E, Orsinic M, Daures JP (2015) Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing–remitting multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 22: 564–569

12 Hayes CE, Cantorna MT, Deluca HF (1997) Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 21–27

13 Ascherio A, Munger KL, Simon KC (2010) Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 9: 599–612

14 Sharifi N, Amani R, Hajiani E et al (2014) Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine* 47:70–80.

15 de Medeiros Cavalcante IG, Silva AS, Costa MJ et al (2015) Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. *Experimental Gerontology* 66:10-16.

16 Asemi, Z.; Hashemi, T.; Karamali, M. et al. (2013) Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr.* v. 98, n. 6, p.1425-1432.

17 Eftekhari, M.H.; Akbarzadeh, M.; Dabbaghmanesh, M.H. et al. (2014) The effect of calcitriol on lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *ARYA Atheroscler.* v.10, n. 2, p.82-88.

18 Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Simó-Jordá R et al (2012) Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J Pediatr* 161:848–854

19 Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B et al (2009) Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 94:4023–4030.

20 Lan N, Luo L, Yang X et al (2014) 25-Hydroxyvitamin D3-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. *PLoS One* 9 (11): e111599

21 Sales de Almeida JP, Liberatti LS, Nascimento Barros FE et al (2016). Profile of oxidative stress markers is dependent on vitamin D levels in patients with chronic hepatitis C. *Nutrition* 32 (3):362-367.

22 Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69 (2): 292-302

- 23 Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–1452
- 24 Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari et al. (2011) Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(7): 1911–1930.
- 25 Gonzales-Flecha BG, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93-100
- 26 Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C et al (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49:1304-13
- 27 Panis C, Mazzuco T, Costa CZF et al (2011) 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. *Exp Parasitol*, 127: 58-65
- 28 Repetto M, Reides C, Carretero MLG et al (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255:107-117
- 29 Venturini D, Simão AN, Sripes NA et al (2012) Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesidade (Silver Spring)* 20 (12): 2361-2366.
- 30 Ebeling PR (2014) Vitamin D and bone health: Epidemiologic studies. *Bonekey Rep* 3:511

31 Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, et al. (2006) Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol. Dial Transplant.* 21(4):889–897.

32 Huang YN, Ho YJ, Lai CC, et al. (2015) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. *J. Neuroinflammation.* 12:147.

33 Zhang Y, Leung DY, Richers BN, et al. (2012) Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol.* 188 (5): 2127–2135.

34 Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. (2001) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J. Immunol.* 167 (9): 4974–4980.

35 Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, et al. (2005) Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood.* 106 (10):3490–3497.

36 Neveu I, Naveilhan P, Jehan F, et al. (1994) 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 24(1-4):70-76

37 Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, et al. (2002) New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 13(3):100-105.

38 Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE et al (2013) The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45(2):217-226.

39 Ascherio A, Munger KL, Branco R et al (2014) Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol* 71 (3): 306-314.

40 Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV et al (2007) Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 14:529-533

41 Miller E, Walczak A, Saluk J et al (2012) Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry* 45:26-30

42 Nagy G, Koncz A, Talarico T et al (2010) Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 12(3):210

43 Simão ANC, Lozovoy MAB, Simão TNC, et al (2011) Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress. *Braz J Med Biol Res* 44: 606-728.

44 Besler HT, Comoglu S (2003) Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional neuroscience* 6:189-196

45 Van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD et al (2005) Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59: 1347-1361

Table 1 Demographic, anthropometric, and clinical characteristics of the patients with multiple sclerosis (MS) and healthy individuals (controls).

	Controls (n=218)	MS patients (n=137)	p value
Sex n (%)			
Female	152 (69.72)	91 (66.42)	0.515
Male	66 (30.28)	46 (33.58)	
Ethnicity n (%)			
Caucasian	174 (79.81)	112 (81.75)	0.653
No Caucasian	44 (20.19)	25 (18.25)	
Age (years)	35.67 (\pm 10.45)	42.68 (\pm 13.43)	<0.0001
Body Mass Index (Kg/m²)	25.46 (\pm 4.54)	24.68 (\pm 5.46)	0.648
Smoking n (%)			
No	194 (88.99)	121 (88.32)	0.846
Yes	24 (11.01)	16 (11.68)	
Other disease n (%)			
Hypertensive Yes/No	27 (12.39) /191 (87.61)	23 (16.79)/114 (83.21)	0.245
Diabetics Yes/No	32 (14.68) /186 (85.32)	21 (15.33)/ 116 (84.67)	0.867
Clinical Forms n (%)			
Relapsing-remitting	---	97 (70.8)	
Progressive Forms	---	40 (29.2)	
EDSS (score)	---	3.28 (\pm 2.35)	
Disease duration (years)	---	8.04 (\pm 7.20)	
Therapy n (%)			
Interferon β (1a or 1b)	---	76 (55.5)	
Glatiramer acetate	---	30 (21.9)	
Fingolimode	---	13 (9.5)	
No treatment	---	11 (8.0)	
Natalizumab	---	7 (5.1)	

Categorical data are expressed as absolute number (n) and percentage (%) and analyzed using Chi-square test; the continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD); [†] These variables were processed in Ln transformation.; EDSS, Expanded Disability Status Scale

Table 2 Vitamin D status and oxidative stress blood markers in patients with multiple sclerosis and healthy controls.

	Controls n=218	MS patients n=137	p value
Vitamin D status			
25(OH)D < 20 ng/mL	23 (10.55)	33 (24.08)	0.001
25(OH)D ≥ 20 ng/mL	195 (89.45)	104 (75.92)	
25(OH)D (ng/mL)	29.71 (±9.17)	26.12 (±8.47)	0.002
CL-LOOH (RLU) †	186.71 (±146.05)	195 (±153.42)	0.162
AOPP (µmol/L of chloramine-T equivalents) †	142.16 (±56.77)	157.32 (±85.44)	0.121
NOx (µM) †	34.84 (±27.39)	17.05 (±12.35)	<0.0001
TRAP (µM of Trolox/UA mg/dL)	239.63 (±123.00)	182.89 (±59.44)	<0.0001

Categorical data are expressed as absolute number (n) and percentage (%) and analyzed using Chi-square test; the continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD); † These variables are processed in Ln transformation; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; CL-LOOH, Lipid hydroperoxide-initiated chemiluminescence; AOPP, Advanced oxidation protein product; NOx, Nitric oxide metabolites; TRAP/UA, Total radical-trapping antioxidant parameter/uric acid.

Table 3 Binary logistic regression age-adjusted between the presence of multiple sclerosis (MS) and the variables that were significant in the univariate analysis

	B	S.E.	Wald	df	p value	OR	95% C.I.
Age (year)	0.037	0.012	9.890	1	0.002	1.037	1.014 – 1.062
25(OH) D (ng/mL)	-0.042	0.017	5.856	1	0.016	0.959	0.927 – 0.992
NOx (μ M)	-0.048	0.010	23.921	1	<0.0001	0.953	0.935 -0.972
TRAP (μ M of Trolox/UA mg/dL)	-0.006	0.002	9.815	1	0.002	0.994	0.991 – 0.998

25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; NOx, Nitric oxide metabolites; TRAP, Total radical-trapping antioxidant parameter/uric acid ratio. OR, odds ratio; CI, confidence interval

Table 4 Epidemiological, clinical and oxidative stress parameters of multiple sclerosis (MS) patients according to the vitamin D status

	Vitamin D non deficient (n=104)	Vitamin D Deficient (n=33)	p value
Age (years)	42.23 (\pm 13.94)	44.14 (\pm 11.70)	0.360
Sex			
Female/Male	68 (65.38)/36 (24.62)	23 (69.70)/10 (30.30)	0.648
Ethnicity			
Caucasian/No Caucasian	87 (83.65)/17 (16.35)	28 (84.84)/5 (15.16)	0.966
BMI (Kg/m²)	26.07 (\pm 5.71)	24.58 (\pm 4.44)	0.199
Smoking			
Yes/No	11 (10.58)/93 (89.42)	5 (15.15)/28 (84.85)	0.364
Disease duration (years)[†]	8.09 (\pm 7.48)	7.89 (\pm 7.19)	0.901
Treatment			
Yes/No	95 (91.35)/9 (8.65)	31 (93.94)/2 (0.06)	0.990
Interferon β therapy			
Yes/No	62 (59.62)/33 (40.38)	14 (42.42)/15 (57.58)	0.100
EDSS (score)[†]	2.91 (\pm 2.03)	4.41 (\pm 2.91)	0.016
25(OH)D (ng/mL)	29.41 (\pm 6.80)	15.71 (\pm 3.05)	<0.0001
CL-LOOH (RLU) [†]	199.70 (\pm 134.63)	188.63 (\pm 97.36)	0.876
AOPP (μmol/L of chloramine-T equivalents)	164.99 (\pm 91.40)	133.83 (\pm 58.95)	0.046
NOx (μM) [†]	17.84 (\pm 13.05)	14.61 (\pm 9.7)	0.091
TRAP (μM of Trolox/UA mg/dL) [†]	178.51 (\pm 56.71)	195.41 (\pm 66.10)	0.322

Categorical data are expressed as absolute number (n) and percentage (%) and analyzed using Chi-square or exact Fisher test; the continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD); [†] These variables are processed in Ln transformation.

25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; BMI, Body Mass Index; EDSS, Expanded Disability Status Scale; CL-LOOH, Lipid hydroperoxide-initiated chemiluminescence; AOPP, Advanced oxidation protein product; NOx, Nitric oxide metabolites; TRAP/UA, Total radical-trapping antioxidant parameter/uric acid.

Table 5 Odds ratio (95% confidence interval) of binary logistic regression analysis to evaluate the association between vitamin D deficient status and disability of patients with multiple sclerosis

Vitamin D status	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
Deficient (<20.0 ng/mL)	1.311 (1.080-1.590) p=0.006	1.387 (1.086-1.771) p=0.009	1.492 (1.127-1.979) p=0.005	1.531 (1.143-2.049) p=0.004	1.482 (1.110-1.976) p=0.007	1.380 (1.030-1.843) p=0.031
Non deficient (\geq 20 ng/mL)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)

Model 1, adjusted for Advanced oxidation protein product (AOPP) and nitric oxide metabolites (NOx);

Model 2, additionally adjusted for age (years) and sex, body mass index levels (kg/m²), and ethnicity;

Model 3, additionally adjusted for disease duration (years);

Model 4, additionally adjusted for treatment (yes/no);

Model 5, retired treatment e additionally for IFN (yes/no);

Model 6, model 4 additionally adjusted for clinical forms (RR/Progressive).

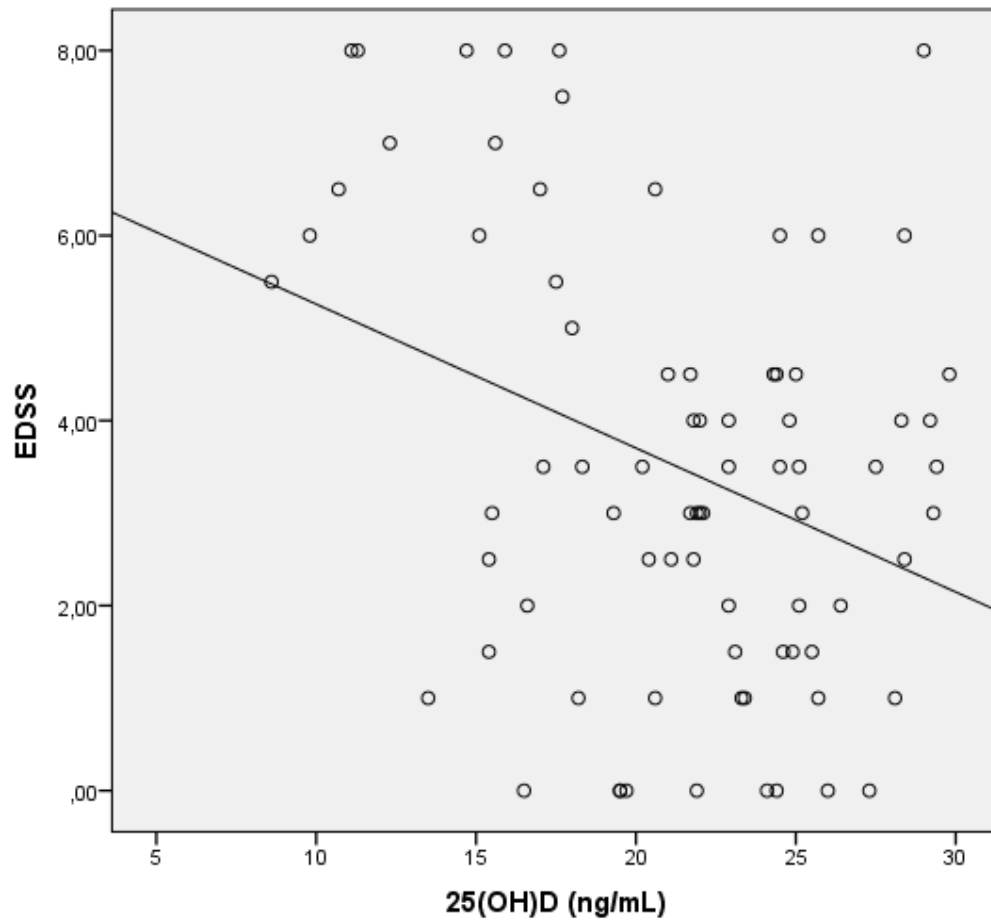


Figure 1 Linear simple regression between Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and serum 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels in multiple sclerosis patients with of vitamin D insufficient status ($r^2 = 0.115$; $p=0.002$).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente tese de doutorado permitem as seguintes conclusões:

- Os níveis de albumina, TRAP, AOPP e NOx foram negativamente associados com EM;
- Mesmo após o ajuste da idade, pacientes com as formas progressivas da EM apresentaram níveis séricos diminuídos de albumina e aumentados de AOPP quando comparados aos pacientes com EM-RR;
- Os níveis séricos de ferritina e hidroperóxidos lipídicos apresentaram associação positiva com EM e podem ser considerados preditores da doença;
- Pacientes com EM apresentaram menores níveis séricos de 25(OH)D do que os controles, mesmo após ajuste da idade;
- Pacientes com deficiência de vitamina D [(25(OH) < 20 ng/mL] mostraram aumento da incapacidade, avaliada pelo EDSS, comparados ao grupo de pacientes não deficientes de vitamina D [25(OH)D > 20 ng/mL]; no entanto, os pacientes com EM não apresentaram alteração significativa nos marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo quando avaliados segundo o status de vitamina D (deficiente vs. não deficiente);
- Uma associação negativa foi observada entre os níveis de 25(OH)D e EDSS, independente de fatores como estresse oxidativo (AOPP e NOx), sexo, idade, etnia, IMC, duração da doença, tratamento de EM, uso de IFN- β e formas clínicas da EM. Pacientes com deficiência de vitamina D apresentam uma razão de chance de 1,380 (com IC 95% de 1,030-1,843) de terem maior incapacidade do que os sem deficiência de vitamina D;
- Os níveis séricos de 25(OH)D apresentaram associação negativa com o EDSS, sendo preditor de 11,5% do aumento de incapacidade nos pacientes com EM;
- Os níveis séricos de 25(OH)D não diferiram entre os pacientes com as formas EM-RR e progressivas da EM.

Os resultados sugerem que ferritina, albumina e marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo como CL-LOOH, AOPP, TRAP e NOx foram preditores de diagnóstico de EM, enquanto albumina e AOPP foram preditores das formas clínicas da doença. Além disso, os dados sugerem que níveis diminuídos de 25(OH)D podem ser preditores de prognóstico e que a deficiência de vitamina D pode ser considerada um dos fatores que contribui para o aumento da incapacidade dos pacientes com EM,

independentemente do estado redox dos pacientes, sugerindo que a vitamina D exerça propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras em diferentes vias envolvidas na fisiopatologia da EM.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Não há consenso quanto aos níveis séricos recomendados e dose ótima de vitamina D para suplementação em pacientes com EM. Parece que altas doses de suplementação poderiam resultar em melhores desfechos na progressão da atividade da EM, mas ainda existe grande variabilidade entre os estudos e conclusões ainda não foram obtidas. Mais estudos envolvendo um maior número de pacientes são necessários para determinar como a suplementação de vitamina D afetaria a expressão de genes envolvidos na fisiopatologia da EM, os níveis séricos de marcadores inflamatórios, anti-inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo e a evolução clínica dos pacientes com EM. Além disto, avaliar como a suplementação de vitamina D poderia contribuir para melhorar a eficácia das atuais terapias convencionais disponíveis para o tratamento de pacientes com EM.

8 REFERÊNCIAS

ACHIRON, A.; BARAK, Y.; MIRON, S. et al. Alfacalcidol treatment in multiple sclerosis. **Clin Neuropharmacol**, v. 26, p.53, 2003.

ADORINI, L.; PENNA, G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. **Human Immunology**, v.70, n.5, p.345–352, 2009.

ADORINI, L.; PENNA, G.; GIARRATANA, N. et al. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.88, n.2, p.227–233, 2003.

ALLEN, C.L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v.4, p.461-470, 2009.

ANTICO, A.; TAMPOIA, M.; TOZZOLI, R. et al. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. **Autoimmun Rev**, v.12, n.2, p.127-136, 2012.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K.L.; SIMON, K.C. Vitamin D and multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v.9, n.6, p. 599-612, 2010.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K.L.; WHITE, R. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. **JAMA Neurol**, v.71, n.3, p. 306-314, 2014.

ASEMI, Z.; HASHEMI, T.; KARAMALI, M. et al. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. **Am J Clin Nutr**. v. 98, n. 6, p.1425-1432, 2013

AYDIN, O.; ELLIDAG, H.Y.; EREN, E. et al. Ischemia modified albumin is an indicator of oxidative stress in multiple sclerosis. **Biochem Med**, v.24, n.3,p. 383-389, 2014.

BIZZOZERO, O.A. Protein carbonylation in neurodegenerative and demyelinating CNS Diseases. In: Naren, L., Banik, S. K. R., Lajtha, A. (eds), Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Brain and Spinal Cord Trauma, vol. 3, Springer, p 544-556, 2009.

BOONSTRA, A.; BARRAT, F.J.; CRAIN, C. et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4⁺ T cells to enhance the development of Th2 cells. **Journal of Immunology**, v.167, n.9, p.4974–4980, 2001.

BROWNE, P.; CHANDRARATNA, D.; ANGOOD, C. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013:A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n 11, p.1022-1024, 2014.

BROWNLEE, W.J.; MILLER, D.H. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. **J Clin Neurosc**, v. 21, n12, p. 2065-2067, 2014.

CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAES, L. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurol Scand**, v. 104, p.208-213, 2001.

CANTORNA, M.T. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.69, n.3, p.286–289, 2010.

CANTORNA, M.T. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 92, p.60–64, 2006.

CANTORNA, M.T.; HAYES, C.E.; DELUCA, H.F. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci**, v.93: p. 7861–7864, 1996.

CAO, W.; HOU, F.F.; NIE, J. AOPPs and the progression of kidney disease. **Kidney Int Suppl** (2011).v.4, n.1, p.102-106, 2014.

CAPEILLERE-BLANDIN, C.; GAUSSON, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochim Biophys Acta**, v.1689, p.91–102, 2004.

CHEN, N.; WAN, Z.; HAN, S.F. et al. Effect of vitamin D supplementation on the level of circulating high-sensitivity C-reactive protein: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 6, p.2206–2216, 2014.

CORREALE, J.; YSRRAELIT, M.C.; GAITAN, M.I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. **Brain**, v.132, p.1146–1160, 2009.

DA COSTA, R.; SZYPER-KRAVITZ, M.; SZEKANECZ, Z. et al. Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. **Isr Med Assoc J**, v.13, n. 2, p. 91-95. 2011.

DÁVALOS, A.; CASTILLO, J.; MARRUGAT, J. et al. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. **Neurology**, v. 54, p.1568-1574, 2000.

DE MEDEIROS CAVALCANTE, I.G.; SILVA, A.S.; COSTA, M.J. et al. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of *BsmI* polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. **Exp. Gerontol**, v. 66, p.10-16, 2015.

DELUCA, H.F.; CANTORNA, M.T. Vitamin D: its role and uses in immunology. **FASEB J**, v.15, n.14, p. 2579-2585, 2001.

EFTEKHARI, M.H.; AKBARZADEH, M.; DABBAGHMANESH, M.H. et al. The effect of calcitriol on lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. **ARYA Atheroscler**. v.10, n. 2, p.82-88, 2014.

FERREIRA, G.B.; VAN ETTEN, E.; VERSTUYF, A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.27, n. 8, p.933–941, 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. **Mult Scler**, v. 11, p. 677-682, 2005.

FRAGOSO, Y.D. Modifiable environmental factors in multiple sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr**, v.72, n.11, p. 889-894, 2014.

FRAGOSO, Y.D.; PERES, M. Prevalence of multiple sclerosis in the city of Santos, São Paulo. **Rev Bras Epidemiol**, v.10, p. 479-482, 2007.

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

GAMA, P.D.; TRIGO, L.X.; ANDRADE, C.R.R. Sala CR. Epidemiological study of multiple sclerosis in the city of Sorocaba, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v.62 Suppl 1:S13, 2004.

GARCION, E.; WION-BARBOT, N.; MONTERO-MENEI, C.N. et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, p. 100– 105, 2002.

GHOREISHI, M.; BACH, P.; OBST, J. et al. Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin D analog calcipotriol. **Journal of Immunology**, v. 182, n.10, p.6071–6078, 2009.

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**, v. 251, p. 261-268, 2004.

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

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

HIREMATH, G.S.; CETTOMAI, D.; BAYNES, M. et al. Vitamin D status and effect of low-dose cholecalciferol and high-dose ergocalciferol supplementation in multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 15, p.735–740, 2009.

HOLICK, M.F.; MACLAUGHLIN, J.A.; CLARK, M.B. et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. **Science**, v. 210, p.203–205, 1980.

HOLICK, M.F.; CHEN, T.C.; LU, Z. et al. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. **J Bone Miner Res**, v. 22, (Suppl 2), p. 28–33, 2007

HOLICK, M.F.; BINKLEY, N.C.; BISCHOFF-FERRAR, H.A. et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96(7): p.1911–1930, 2011.

HUANG, Y.N.; HO, Y.J.; LAI, C.C. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **J Neuroinflammation**.v.12, p. 147, 2015.

JEFFERY, L.E.; BURKE, F.; MURA, M. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. **Journal of Immunology**, v.183, n.9, p.5458–5467, 2009.

JONES, G.; STRUGNELL, S.A.; DELUCA, H.F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. **Physiol Rev**, v. 78, p.1193–1231, 1998.

JORDE, R.; SNEVE, M.; TORJESEN, P.A. No effect of supplementation with cholecalciferol on cytokines and markers of inflammation in overweight and obese subjects. **Cytokine**, v.50, p.175–180, 2010.

JOSHI, S.; PANTALENA, C.L.; LIU, X.K. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. **Mol. Cell. Biol**, v. 31, p.3653–3669, 2011.

KALLAUR, A.P.; KAIMEN-MACIEL, DR.; MORIMOTO, H.K. et al. Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis (review). **International Journal of Molecular Medicine**, 28:467-479, 2011.

KJELL-MORTEN, M.Y.H.R. Vitamin D treatment in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 286, p.104–108, 2009.

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.

KONGSBAK, M.; VON ESSEN, M.R.; LEVRING, T.B. et al. Vitamin D-binding protein controls T cell responses to vitamin D. **BMC Immunol**, v. 15, p. 35, 2014.

KRAGT, J.; VAN AMERONGEN, B.; KILLESTEIN, J. et al. Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. **Mult Scler**, v. 15, p.9–15, 2009.

KURTZKE, J.F. On the fine structure of the distribution of multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**, v. 43, n. 3, p. 257-282, 1967.

KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v. 33, p.1444–1452, 1983.

LAN, N.; LUO, L.; YANG, X. et al. 25-Hydroxyvitamin D3-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. **PLoS One**, v. 9, n.11, p. e111599, 2014.

LANA-PEIXOTO, M.A.; FROTA, E.R.C.; CAMPOS, G.B. et al. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v.70, n. 2, 102-107, 2012.

LANG, C.L.; WANG, M.H.; HUNG, K.Y. et al. Altered molecular repertoire of immune system by renal dysfunction in the elderly: is prediction and targeted prevention in the horizon? **EPMA Journal**, v. 4, n.1, p. 17, 2013.

LANG, C.L.; WANG, M.H.; CHIANG, C.K. et al. Vitamin D and the Immune System from the Nephrologist's Viewpoint. **ISRN Endocrinol.**, v. 2014, p.105456, 2014.

LEMIRE, J.M.; ARCHER, D.C. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Clin Invest**, v.87, p. 1103–1107, 1991.

LEMIRE, J.M.; ARCHER, D.C.; BECK, L. et al. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1704S–1708S, 1995.

LEVINE, S.M.; LYNCH, S.G.; OU, C.N. et al. Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. **Brain Res**, v.13, n. 821, p. 511-515, 1999.

LØKEN-AMSRUD, K.I.; HOLMØY, T.; BAKKE, S.J. et al. Vitamin D and disease activity in multiple sclerosis before and during interferon- β treatment. **Neurology**, v. 79, n. 3, p.267-273, 2012.

LOZOVOY M, SIMÃO A, PANIS C et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 20, p. 1250–1259, 2011.

MAHON, B.D.; GORDON, S.A.; CRUZ, J. et al. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. **J Neuroimmunol**, v.134, p.128–132, 2003.

MARQUES, José Pinto. Esclerose Múltipla- Formas e fases da doença. In: PEDROSA, Rui Introdução a Esclerose Múltipla: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1º Edição. Lisboa:Biogen Indec, 2010, p. 155-161.

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: Geoeidemiology, genetics and the environment. **Autoimm Rev**, v. 9, p. A387–A394, 2010.

MOAN,J.; POROJNICU, A.C.; DAHLBACK, A. et al. Addressing the health benefits and risks involving vitamin D or skin cancer, of increased sun exposure. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 2, p. 668–73, 2008.

MOWRY, E.M.; WAUBANT, E.; MCCULLOCH, C.E. et al. Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 72, n. 2, p. 234-240, 2012.

MUNGER, K.L.; LEVIN, L.I.; HOLLIS, B.W. et al. Serum 25 hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. **JAMA**, v. 296, p. 2832-2838, 2006.

NAIDOO, R.; KNAPP, M.L. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. **Clin Chem**, v. 38, n.12, p. 2449-2454, 1992.

NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. **Clin Chem.**, v. 44, p. 679-681,1998.

NEGREIROS, A.A.; SOUSA-MUNÕZ, R.L.; OLIVEIRA, B.E. et al. Clinical and epidemiological profile of patients diagnosed with multiple sclerosis in João Pessoa, Paraíba, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v.73, n.9, p.741-745.,2015.

NOORI-ZADEH, A.; MESBAH-NAMIN, S.A.; BISTOON-BEIGLOO, S. Regulatory T cell number in multiple sclerosis patients: A meta-analysis. **Mult Scler Relat Disord**. v.5, p.73-76, 2016.

NORDVIK, I.; MYHR, K.M.; NYLAND, H. et al. Effect of dietary advice and n-3 supplementation in newly diagnosed MS patients. **Acta Neurol Scand**, v. 102, p.143–149, 2000.

OLIVEIRA, S.R.; KALLAUR, A.P.; SIMÃO, A.N. et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. **J Neurol Sci**, v.321, p. 49-53, 2012.

OVERBERGH, L.; DECALLONNE, B.; WAER, M. et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543) **Diabetes**, v.49, n.8, p.1301–1307, 2000.

PALMER, M.T.; LEE, Y.K.; MAYNARD, C.L. et al. Lineage-specific effects of $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ on the development of effector CD4 T cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.2, p.997–1004, 2011.

PENNA, G.; AMUCHASTEGUI, S.; GIARRATANA, N. et al. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.178, n.1, p.145–153, 2007.

POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; BANWELL, B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Ann Neurol**, v.69, n.2, p.292-302, 2011.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin Chim Acta**, v. 255, p. 107-117, 1996.

REZNICK, A.Z.; PACCKER, L. Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol** 1994;233, p.357-363.

RIBEIRO, S.B.F.; MAIA, D.F.; RIBEIRO, J.B. et al. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v. 69, n 2,p.184-187, 2011.

ROCHA, F.; HERRERA, L.C.; MORALES, R.R. Multiple sclerosis in Botucatu, Brazil: a population study. **Mult Scler**. v.8, 8 Suppl:S41, 2002.

ROSEN, C.J.; GALLAGHER, J.C. The 2011 IOM report on vitamin D and calcium requirements for North America: clinical implications for providers treating patients with low bone mineral density. **J Clin Densitom**, v. 14, n. 2, p. 79–84, 2011.

ROSS, A.C.; MANSON, J.E; ABRAMS, S.A. et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 1, p. 53–58, 2011.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; ADAMCZYK-SOWA, M.; GALINIAK S. et al. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. **Neurochem Int**, v.63, n.5, p.507-516, 2013.

SAFADI, F.F.; HERMEY,D.C.; POPOFF,S.N.;SEIFERT,M.F. Skeletal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteopetroticrats. **Endocrine**, v. 11, n. 3, p. 309–319, 1999.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R. et al. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunological Reviews**, v.212, p. 8–27, 2006.

SELLNER, J.; KRAUS, J.; AWAD, A. et al. The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis—a critical analysis of potential environmental factors. **Autoimmun Rev**, v.10, p.495–502, 2011.

SHARIFI, N.; AMANI, R.; HAJIANI, E. et al. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. **Endocrine**, v. 47, p.70–80, 2014.

SHEIKH, Z.; AHMAD, R.; SHEIKH, N. et al. Enhanced recognition of reactive oxygen species damage human serum albumin by circulating systemic lupus erythematosus autoantibodies. **Autoimmunity**, v.40, p. 512-520, 2007.

SIMÃO, A.N.C; GODENY, P.; LOZOVY, 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. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, p.1-7, 2010

SIMON, K.C.; MUNGER, K.L.; ASCHERIO A. Vitamin D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology, and genetics. **Curr Opin Neurol**, v. 25, n. 3, p.246-251, 2012.

SLOMINSKI, A.T.; KIM, T.K.; LI, W. et al. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions, **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 144, p. 28 –39, 2014.

SMOLDERS, J.; DAMOISEAUX, J.; MENHEERE, P. et al. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. **J Neuroimmunol**, v.194, p.7–17, 2008.

SMOLDERS, J.; MENHEERE, P.; KESSELS, A. et al. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. **Mult Scler**, v.14, p. 1220–1224, 2008.

SOILU-HANNINEN, M.; AIRAS, L.; MONONEN, I. et al 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 11, p.266–271, 2005.

SOILU-HANNINEN, M.; LAAKSONEN, M.; LAITINEN, I. et al. A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 79, p.152–157, 2008.

SOUBERBIELLE, J.C. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. **Autoimmun Rev**, v. 9, p.709-715, 2010.

TARCIN, O.; YAVUZ, D.G.; OZBEN, B. et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 94, p. 4023–4030, 2009.

THOUVENOT, E.; ORSINI, M.; DAURES, J.P. et al. Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing-remitting multiple sclerosis. **Eur J Neurol**. v.22, n. 3, p.564-569,2015.

VALE, José. Esclerose Múltipla: Manifestações Clínicas. In: PEDROSA, Rui Introdução a Esclerose Múltipla: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1º Edição. Lisboa:Biogen Indec, 2010, p.131-150.

VAN BELLE, T.L.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player? **Best Practice and Research**, v.25, n.4, p.617–632, 2011.

VAN DER MEI, I.A.; PONSONBY, A.L.; BLIZZARD, L. et al. Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. **Neuroepidemiology**, v.3, 168-174, 2001.

VAN DER MEI, I.A.; PONSONBY, A.L.; DWYER, T. et al. Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. **J Neurol**, v. 254, p.581–590, 2007.

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.

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. **Quimi. Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VELDMAN, C.M.; CANTORNA, M.T.; DELUCA, H.F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. **Arch Biochem Biophys**, v. 374, p.334– 338, 2000.

VENTURINI D, SIMÃO AN, SCRIPES NA et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity* v. 20, n. 12, p. 2361-2366, 2012.

WINGERCHUK, D.M.; LESAUX, J.; RICE, G.P. et al. A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 76, p. 1294–1296, 2005.

WISEMAN, H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. **FEBS Lett**, v. 326, p. 285–288, 1993.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLERE-BLANDIN, C. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v.49, p.1304–1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; NGUYEN KHOA T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J Immunol**, v.161, p.2524–2532, 1998.

WITKO-SARSAT, V.; GAUSSON, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins. **Kidney Int Suppl**, v.84, p.S11–S14, 2003.

YANG, C.Y.; LEUNG, P.S.C.; ADAMOPOULOS, I.E. et al. The implications of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 45, p.217-226, 2013.


ZELLA, L.A.; MEYER, M.B.; NERENZ, R.D. et al. Multifunctional enhancers regulate mouse and human vitamin D receptor gene transcription, **Mol. Endocrinol**, v. 24, p.128-147, 2010.

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo 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

Parecer de Aprovação Nº 159/10 CAAE Nº 0140.0.268.000-10 FOLHA DE ROSTO Nº 355660	Londrina, 30 de agosto de 2010.
PESQUISADORA: EDNA MARIA VISSOCI REICHE	
<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">"AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</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">Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/Uel</p>	

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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 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

APÊNDICE B

Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos

Dados demográficos		Nº no projeto:	
Nome			
Endereço			Telefone:
Data de nascimento			
Imunomodulador	<input type="checkbox"/> IFN-β1a <input type="checkbox"/> IFN-β1b <input type="checkbox"/> Glatiramer <input type="checkbox"/> Natalizumab		
Corticóide	<input type="checkbox"/> Pulsoterapia <input type="checkbox"/> Corticóide oral → mg		
Outros medicamentos			
Doenças associadas			
Etnia	<input type="checkbox"/> Caucasiano <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Mulato <input type="checkbox"/> Asiático		
Cor da pele	<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Amarela		
Exposição solar diária	<input type="checkbox"/> Não se expõe ao sol diariamente <input type="checkbox"/> Baixa exposição (≤ 20 min/dia) <input type="checkbox"/> Exposição solar adequada (> 20 min/dia)		
Usa protetor solar?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Frequência		
Tabagismo	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Consumo de álcool	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Profissão			
Hábitos de dieta	<input type="checkbox"/> Suplementação alimentar <input type="checkbox"/> Antioxidante <input type="checkbox"/> Vitamina <input type="checkbox"/> Dieta específica		
	Obs.:		
Dados Clínicos			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Forma clínica	<input type="checkbox"/> RR <input type="checkbox"/> SP <input type="checkbox"/> PP <input type="checkbox"/> CIS <input type="checkbox"/> não definida		
EDSS 2013			
Atividade da doença	<input type="checkbox"/> Remissão <input type="checkbox"/> Surto Nº de surtos/ ano:		
RMN	Nº lesões:	<input type="checkbox"/> Gd+ <input type="checkbox"/> Gd-	Data RMN:
	Local:		
	Tipo de RMN:		
Inflamação/ Infecção	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Qual?	
Pós Menopausa	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data última menstruação:	