



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KATERINE PANICHI ZANIN FERREIRA

**INFLUÊNCIA DA FERRITINEMIA NOS PARÂMETROS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E NA PROGRESSÃO DA DOENÇA  
EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

---

Londrina  
2016

KATERINE PANICHI ZANIN FERREIRA

**INFLUÊNCIA DA FERRITINEMIA NOS PARÂMETROS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E NA PROGRESSÃO DA DOENÇA  
EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Name Colado  
Simão

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ferreira, Katerine Panichi Zanin .

Influência da ferritinemia nos parâmetros de estresse oxidativo e na progressão da doença em pacientes com esclerose múltipla / Katerine Panichi Zanin Ferreira. - Londrina, 2016.  
70 f. : il.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose Múltipla - Tese. 2. Ferritinemia - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Hiperferritinemia - Tese. I. Simão, Andréa Name Colado . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

KATERINE PANICHI ZANIN FERREIRA

**INFLUÊNCIA DA FERRITINEMIA NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE  
OXIDATIVO E NA PROGRESSÃO DA DOENÇA EM PACIENTES COM  
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Name Colado  
Simão  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Maria Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

Londrina, 26 de agosto de 2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades dadas ao decorrer dela.

Agradeço aos meus pais, irmão e marido, pelo apoio incessante, incentivo aos estudos e à formação acadêmica. Pelo imenso amor e cuidado deles recebido durante todo o percurso dessa pós-graduação.

À minha orientadora, Profa Dra Andréa Name Colado Simão, pela excelente ajuda, orientação e conhecimento recebido durante toda a graduação e pós-graduação, e principalmente pelo carinho com que teve comigo após o nascimento da minha filha Helena. Ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental.

E, por fim, a todos da equipe de laboratório que sempre se dispuseram a me ajudar, sem eles esse trabalho não seria possível. Especialmente à Profa Dra Sayonara Rangel de Oliveira, que desde a iniciação científica esteve comigo me ensinando técnicas e teorias da pesquisa.

FERREIRA, Katerine Panichi Zanin. **Influência da Ferritinemia nos Parâmetros de Estresse Oxidativo e na Progressão da Doença em Pacientes com Esclerose Múltipla**. 2016. 70f. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM), é uma doença desmielinizante e inflamatória crônica, na qual o processo inflamatório é reponsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Essas espécies reativas ativam macrófagos e micróglia no sistema nervoso central (SNC), induzindo a morte de oligodendrócitos e proporcionando a degeneração axonal. Alguns estudos apontam que o estresse oxidativo (EO) tem um importante papel na fisiopatologia da EM, devido ao elevado consumo de oxigênio e altos índices de ácidos graxos no SNC. O EO faz parte de umas das condições de modulação da ferritina, que é uma proteína com alto grau de armazenamento de ferro e que faz parte das espécies reativas. As citocinas inflamatórias presentes nesta doença regulam positivamente a síntese de ferritina, os radicais livres resultantes da ativação da micróglia pelo excesso de ferro e, conseqüentemente, de ferritina, induzem um aumento significativo do EO e da peroxidação lipídica, levando a uma disfunção mitocondrial que pode levar à morte dessas células residentes do SNC. Embora a maior parte dos relatos demonstrem os efeitos deletérios da ferritina, também têm sido demonstrado efeitos antioxidantes dessa proteína. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência dos níveis séricos de ferritina nos parâmetros de EO e na progressão da doença em pacientes com EM. Foram incluídos 167 indivíduos saudáveis, recrutados do banco de sangue do Hemocentro Regional do Hospital Universitário de Londrina e 164 pacientes com EM, atendidos no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Ambulatório de Especialidades do HU (AEHU), classificados de acordo com critérios de McDonald. Esses pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com seus níveis de ferritina (<125,6 ng/mL e ≥125,6ng/mL). A incapacidade da doença foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS). Para avaliar a progressão da doença, foram considerados os escores de EDSS do ano de 2011 e subtraídos os escores de 2006. Para o EO foram avaliados a capacidade antioxidante total do plasma pelo método de TRAP, metabólitos de óxido nítrico (NOx), proteínas carbonílicas, produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e hidroperóxidos lipídicos (CL-L00H). Pacientes com EM e com níveis elevados de ferritina, tiveram maior progressão da doença ( $p = 0,030$ ), e níveis mais elevados de AOPP ( $p = 0,001$ ) e níveis mais baixos de NOx e TRAP, no plasma ( $p = 0,031$ ,  $p = 0,006$ , respectivamente), do que os indivíduos com EM e baixos níveis de ferritina. A análise de regressão logística multivariada mostrou que o aumento da AOPP e progressão da doença foram significativamente e positivamente associados com o aumento da ferritina. A combinação de níveis de ferritina no soro e marcadores de EO e ferritina foram responsáveis por cerca de 14% na progressão da doença. Em conclusão, os nossos resultados sugerem que a ferritina pode agravar o EO em pacientes com MS e contribuir para a progressão da doença.

**Palavras-chave:** Esclerose Múltipla. Estresse Oxidativo. Inflamação Crônica. Ferritina. Hiperferritinemia.

FERREIRA, Katerine Panichi Zanin. **Influence of ferritin in Parameters Of Oxidative Stress and Disease Progression In Patients With Multiple Sclerosis.** 2016. 70p. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease, and chronic inflammatory, it is the inflammatory process is responsible for the formation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS). These reactive species activated macrophages and microglia in the central nervous system (CNS), leading to the death of oligodendrocytes and providing axonal degeneration. Some studies suggest that oxidative stress (OS) has an important role in the pathophysiology of MS, due to the high consumption of oxygen and high levels of fatty acids in these tissues. EO is part of one of the modulation conditions of ferritin, which is a protein with a high degree of iron storage, part of reactive species. Inflammatory cytokines present in this disease, upregulate the synthesis of ferritin, the free radicals resulting from activation of microglia by excess iron and consequently ferritin induce a significant increase in EO and lipid peroxidation, leading to mitochondrial dysfunction that can lead to death of these cells resident CNS. While most reports demonstrate mostly the deleterious effects of ferritin, it has also been demonstrated antioxidant effects of this protein. Our present study aimed to evaluate the influence of serum ferritin in the parameters of oxidative stress and disease progression in MS patients. This study included 167 healthy subjects recruited from the blood bank of the Regional Blood Center of the University Hospital of Londrina, and 164 patients with MS, coming outpatient demyelinating diseases of the same hospital, classified according to McDonald criteria, which were divided into two groups according to their serum ferritin levels (<125.6ng/mL and  $\geq$ 125.6ng/mL). The inability of the disease evaluated by the Expanded Disability Status Scale (EDSS), to assess disease progression was reduced by the EDSS 2011-2006. For the EO were evaluated Antioxidant Capacity Total Plasma (TRAP), Metabolites of Nitric Oxide (NOx), Carbonílicas Proteins, Advanced Products Protein Oxidation (AOPP) and hydroperoxides Lipid (CL-L00H). Patients with MS and high ferritin levels had greater disease progression ( $p=0.030$ ), AOPP ( $p=0.001$ ) and lower levels of NOx and TRAP ( $p=0.031$ ) ( $p=0.006$ ) respectively, than individuals with MS and low levels of ferritin. The multivariate logistic regression analysis showed that the increase of AOPP and disease progression was significantly and positively associated with increased ferritin. The combination of ferritin levels in serum and oxidative markers were responsible for around 14% of disease progression. In conclusion, our results suggest that ferritin can aggravate oxidative stress in patients with MS and contribute to disease progression.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Oxidative stress. Chronic inflammation. Ferritin. Hyperferritin.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEM	Associação Brasileira de Esclerose Múltipla
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AOPP	Produtos Avançados de Oxidação Proteica
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
BHE	Barreira Hemato-encefálica
CD	Células Dendríticas
CIS	Síndrome Clinicamente Isolada
CL-LOOH	Hidroperóxidos Lipídicos
CMIA	Ensaio de Quimioluminescência por Micropartículas
EDSS	Escala Expandida do Estado de Incapacidade
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EM	Esclerose Múltipla
EM-PP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EM-PR	Esclerose Múltipla Progressiva Recidiva
EM-RR	Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EM-SP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
EO&N	Estresse Oxidativo e Nitrosativo
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Oxigênio
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment</i> de Resistência à Insulina
HU	Hospital Universitário
IMC	Índice de Massa Corporal
IL	Interleucina
IFN-β	Interferon Beta
IFN-γ	Interferon Gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LB	Linfócitos B
LCR	Líquido Céfalorraquidiano
LT	Linfócitos T

LT- $\alpha$	Linfotoxina Alfa
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
NO	Óxido Nítrico
NOx	Metabólitos do Óxido Nítrico
OH	Grupamento Hidroxila
QL	Quimioluminescência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Beta
Th1	Linfócito T <i>Helper</i> Tipo 1
Th2	Linfócito T <i>Helper</i> Tipo 2
Th17	Linfócito T <i>Helper</i> Tipo 17
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAP	Capacidade Antioxidante Total do Plasma
Tregs	Linfócitos T Reguladoras
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VCAM	Molécula de Adesão Celular Vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM): DEFINIÇÃO E FORMAS CLÍNICAS .....	12
1.2	EPIDEMIOLOGIA .....	14
1.3	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL.....	15
1.4	AVALIAÇÃO DA INCAPACIDADE FUNCIONAL .....	17
1.5	FATORES DE RISCO E FISIOPATOLOGIA DA EM .....	18
1.6	ESTRESSE OXIDATIVO E EM .....	23
1.7	FERRITINA E EM .....	25
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	GERAL .....	29
3.2	ESPECÍFICOS.....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	DELINEAMENTO E ASPECTOS ÉTICOS .....	30
4.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	30
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	31
4.4	CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS .....	31
4.5	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO .....	32
4.6	MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	32
4.6.1	Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por t-butil (CL-LOOH) .....	32
4.6.2	Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP) .....	33
4.6.3	Determinação de Proteínas Carbonílicas .....	33
4.6.4	Determinação de Nitrito para Estimativa de NO.....	33
4.6.5	Capacidade Antioxidante Total do Plasma .....	33
4.7	FERRITINEMIA .....	34
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34

5	<b>RESULTADOS</b> .....	36
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>APÊNDICES</b> .....	65
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....	66
	APÊNDICE B – Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos .....	68
	<b>ANEXOS</b> .....	69
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL.....	70

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA: DEFINIÇÃO E FORMAS CLÍNICAS

A esclerose múltipla (EM) foi primeiramente descrita em 1868 por Jean-Martin Charcot, neurologista francês, (POSE; BRINAR, 2004), após observar pacientes com episódios intermitentes de disfunção neurológica e visualização de células inflamatórias na substância branca do cérebro e medula espinhal (HAFLER et al., 2005).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da EM são conhecidos por incluírem uma cascata de eventos que induzem déficits físicos e cognitivos. Existe também, uma redução da integridade e função neuronal que afeta a massa cinzenta e que pode ser o processo patológico fundamental que leva à disfunção cognitiva nesta doença (CICCARELLI; THOMPSON, 2016).

A EM tem uma etiologia multifatorial, desencadeada por fatores genéticos e ambientais (MILO; KAHANA, 2010) e caracteriza-se por ser imunomediada e inflamatória acometendo o sistema nervoso central (SNC), com infiltrados perivasculares de células mononucleares. Atinge a mielina e oligodendrócitos e causa desmielinização e perda axonal, principalmente na matéria branca (COMPSTON et al., 2006).

A desmielinização é a principal característica fisiopatológica da EM e é causada pela inflamação crônica apresentada pelos pacientes. O processo inflamatório é responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Essas espécies reativas ativam macrófagos e micróglia induzindo a morte de oligodendrócitos e a degeneração axonal (LASSMANN, 2008). Clinicamente, pacientes com EM convivem com uma variedade de sinais e sintomas neurológicos que podem ocorrer em ataques repentinos ou serem insidiosos e progressivos (COMPSTON et al., 2006).

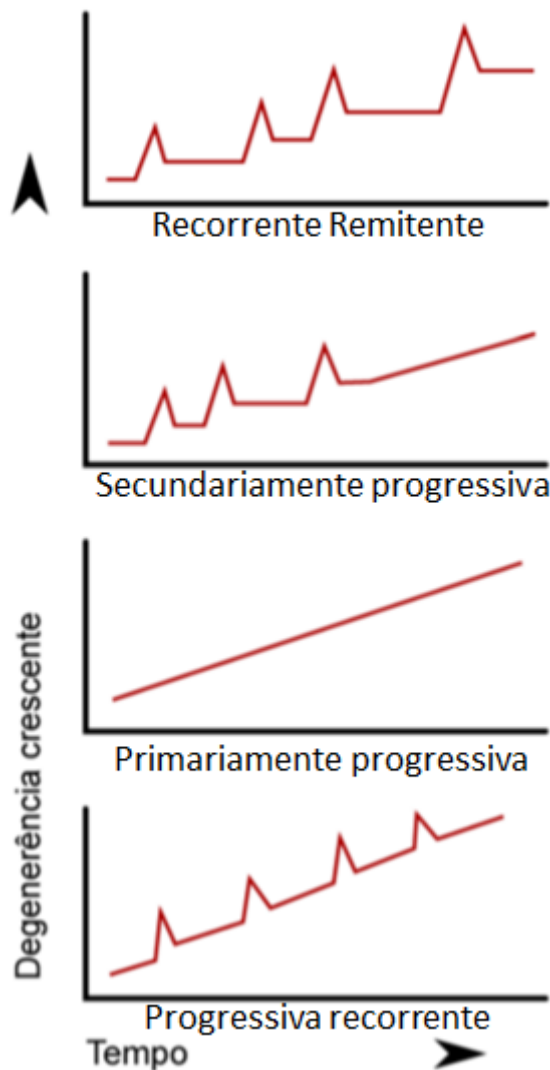
Os sintomas mais comuns da EM são paralisia, falta de coordenação, fraqueza de membros, distúrbios sensoriais, visuais, vesicais ou intestinais, vertigens ou desmaios e desordens cognitivas. A doença apresenta períodos de surto e de remissões que atingem necessariamente o SNC. O surto inicial pode durar dias ou semanas, seguido de uma remissão que pode ser de meses a anos (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008; STEINMAN, 2001).

Originalmente, em 1996, a EM foi categorizada em quatro principais subtipos: remitente-recorrente (EM-RR), primariamente progressiva (EM-PP), secundariamente progressiva (EM-SP) e progressiva-recidiva (EM-PR) (LUBLIN; REINGOLD, 1996). Mais recentemente, em 2014, a doença foi novamente descrita nos subtipos RR, SP, PP e em um novo subtipo denominado Síndrome Clinicamente Isolada (CIS), (LUBLIN et al., 2014). Além dos surtos neurológicos que duram, geralmente, em torno de 24 horas nos subtipos EM-RR, EM-PP e EM-SP, eventualmente surgem também sintomas agudos isolados no subtipo de CIS, como perdas sensoriais em partes do corpo, ataxia, diplopia, perda visual, neurite óptica, entre outros (STEINMAN, 2001).

A EM-RR é a mais prevalente e durante o curso deste subtipo de EM observam-se surtos e recaídas claramente definidos, com alteração de uma ou mais funções neurológicas, com posterior recuperação que pode ser completa ou deixar sequelas e déficits residuais, sem apresentar progressão da doença durante os períodos de recidivas (KOCH; MOSTERT; ARUTJUNYAN, 2007; CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008; LUBLIN et al., 2014). A CIS é a primeira manifestação clínica da doença, sem evidência de episódios prévios de desmielinização (LUBLIN et al., 2014). A forma EM-SP é responsável por causar uma deterioração das funções neurológicas e representa de 15 a 20% das formas de EM. Tem como característica um período inicial como a EM-RR, seguida de progressão com ou sem recaídas ocasionais. Já na forma EM-PP há uma progressão constante da doença desde o início dos sintomas, é uma forma não muito comum, porém a mais grave, representando 10 a 15% dos casos e se distinguindo das demais pelos critérios de disseminação no tempo e dificuldade no diagnóstico (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008).

A Figura 1, a seguir, representa as principais formas clínicas da EM.

**Figura 1 - Formas Clínicas da EM**



**Fonte:** Adaptado de Marques, (2010); ABEM, (2011).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

A EM não é igualmente distribuída pelo mundo e sua prevalência varia entre 5 casos a cada 100.000 pessoas em áreas tropicais e/ou na Ásia e de 100-200 casos por 100.000 habitantes em zonas temperadas (COMPSTON et al., 2006; ROSATI, 2001). Existem relatos de áreas com alta frequência de EM em regiões quentes como na Sardenha, no sul do Mediterrâneo e de baixa frequência como em algumas regiões do Canadá (MILO; KAHANA, 2010). Isso pode ser explicado pela susceptibilidade genética e distribuição das etnias pelo globo terrestre (GRANIERI et al., 2000). Estima-se que, mundialmente, 2,5 milhões de pessoas

vivam com EM (MILO; KAHANA, 2010), sendo em sua maioria mulheres, numa proporção estimada de 2:1, (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008). No Brasil, esse número é de 15 casos a cada 100.000 habitantes (FRAGOSO; PERES, 2007).

Na maioria dos casos, as manifestações ocorrem entre os 20 e 40 anos de idade, sendo mais frequentes em indivíduos caucasianos (CONFAVREUX et al., 2000).

Ao menos, 20% das pessoas afetadas pela EM possuem pelo menos um parente também com a doença. Estudos no Canadá sugerem que o risco de desenvolvimento da EM em parentes de primeiro grau de pessoas afetadas é de cerca de 3,4-5,1% maior do que em não parentes (DYMENT; SADOVNICK; EBERS, 1997) e outras pesquisas na Bélgica também encontraram essa associação por parentesco (CARTON et al., 1997) e na Escócia (SAWCER; GOODFELLOW; COMPSTON, 1997).

### 1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

Durante muitos anos tentou-se definir critérios para a EM. Em 1868, Jean- Martin Charcot descreveu características clínicas típicas para a doença e, mais tarde descobriu-se que a tríade sugerida por este médico era inespecífica e estava presente também em outras desordens neurológicas. Alguns anos depois, em 1906, Marburg definiu outros critérios para o diagnóstico da EM, que também apresentaram baixa especificidade para a doença. Já em 1954, Allison e Milliar apresentaram a primeira classificação clínica para o diagnóstico da EM na qual havia a descrição de sintomas em tempos diferentes e em várias regiões do SNC, diferentemente das descritas anteriormente. Em 1965, Schumacher desenvolveu os primeiros critérios modernos para o diagnóstico da EM, adaptando grupos já utilizados. Porém, com o passar os anos, esses critérios foram considerados muito restritos e, em 1983, Poser e Brinar descreveram novos critérios a partir de ensaios clínicos (PRZYBEK et al., 2015).

Em 1996 com a introdução de exames radiológicos como a ressonância nuclear magnética (RNM) e drogas como o interferon beta (IFN- $\beta$ ), necessitou-se de uma atualização dos critérios utilizados para o diagnóstico da EM. Então, em 2001, Ian MacDonald e colaboradores desenvolveram novos critérios,

conhecidos como “Critérios de McDonald” (MCDONALD; COMPSTON; EDAN, 2001) que foram posteriormente revisados em 2010 (PRZYBEK et al., 2015).

De acordo com os critérios de McDonald, o número de diagnósticos possíveis na investigação de indivíduos com suspeita de EM são três: possível EM, EM definida e ausência de EM. Para ser classificada como EM, a doença deve apresentar um curso clínico típico e apresentar todos os critérios exigidos. Para possível EM os pacientes devem apresentar sintomas que indiquem EM mas não preencherem todos os critérios exigidos, necessitando de maior observação. O não preenchimento dos critérios estabelecidos exclui o diagnóstico de EM. Para McDonald e colaboradores, os surtos e recaídas devem ter duração de 24 horas e não podem estar associadas a febre ou sintomas de infecções e há também a necessidade de um intervalo de 30 dias entre duas recidivas da doença (MCDONALD; COMPSTON; EDAN, 2001). O uso do Critério de McDonald tem resultado em diagnósticos precoces da doença com maior especificidade e sensibilidade e melhores chances de sucesso no tratamento (TINTORE; ROVIRA; MARTINEZ, 2000).

Considerada uma doença heterogênea sob as perspectivas clínica e epidemiológica, atualmente não existem biomarcadores laboratoriais para diagnosticar com precisão a EM, assim como exames de imagem que ajudem a diagnosticar com rigor, a forma clínica e a evolução dos pacientes acometidos pela EM (LUCCHINETTI et al., 2000).

A seguir, no Quadro 1, são apresentados os Critérios de Diagnóstico descritos por McDonald para EM.

**Quadro 1 - Critérios de Diagnóstico McDonald para Esclerose Múltipla**

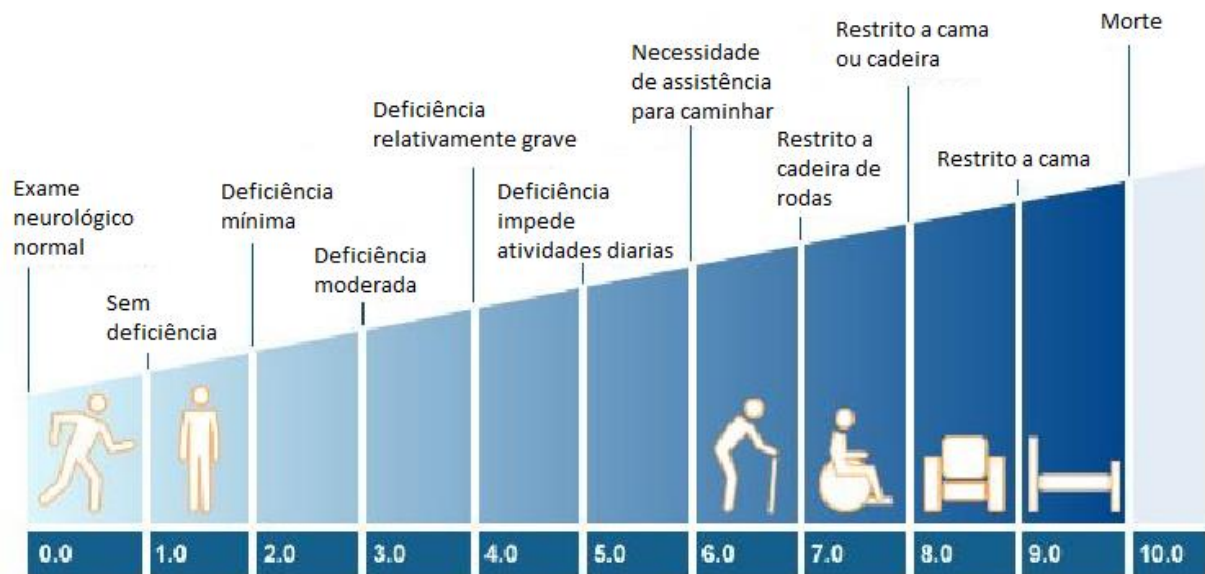
<b>Critérios de diagnósticos McDonald para Esclerose Múltipla (revisão de 2010)</b>	
<b>Sintomas Clínicos</b>	<b>Condições adicionais que devem ser cumpridos para fazer o diagnóstico de EM</b>
Duas ou mais recidivas e pelo menos dois sintomas clínicos diferentes	Não é necessário
Duas ou mais recidivas e só um sintoma clínico	Disseminação no espaço comprovada por exame de ressonância nuclear magnética ou aguardar até que a recaída com sintomatologia diferente
Uma recaída e pelo menos, dois diferentes sintomas clínicos	Disseminação em tempo comprovada por exame de ressonância nuclear magnética ou aguardar a segunda recaída
Uma recaída e apenas um sintoma clínico (síndrome clinicamente isolada)	Disseminação em tempo comprovada por exame de ressonância nuclear magnética ou aguardar a segunda recaída e; Disseminação no espaço comprovada por exame de ressonância nuclear magnética ou aguardar a segunda recaída com diferentes sintomatologias

**Fonte:** Adaptado de Przybek et al., (2015).

#### 1.4 AVALIAÇÃO DA INCAPACIDADE FUNCIONAL

A incapacidade funcional causada pela doença é atualmente avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Scale Status*, EDSS) que foi primeiramente descrita por Kurtzke, em 1961. Esta escala baseia-se em aferições de oito áreas do SNC conhecidas como sistemas funcionais, nos quais são avaliadas as funções piramidais, tronco cerebral, cerebelar, sensoriais, intestinais, vesicais, cerebrais e visuais (KURTKE, 1983), conforme mostra a Figura 2, abaixo.

**Figura 2:** Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)



**Fonte:** Kurtzke, (1983).

Uma avaliação de EDSS grau 0 define um paciente com EM que possui um exame neurológico normal, já o grau 1 se relaciona a pessoas com distúrbios de humor, depressão, euforia, entre outros. Assim, a escala EDSS vai aumentando seu grau conforme ocorre a progressão da doença, até atingir o grau 9 para pacientes acamados e 10 para óbito (KURTZKE, 1983).

### 1.5 FATORES DE RISCO E FISIOPATOLOGIA DA EM

Pacientes com EM apresentam uma desregulação intensa da resposta imune, de etiologia multifatorial e com diferentes fatores de risco como susceptibilidade genética, epigenética e fatores ambientais. Entre os fatores ambientais destacam-se a exposição a produtos químicos, tabagismo, dieta e níveis de exposição a raios solares ultra-violetas (UV), além dos níveis séricos de vitamina D (OKSENBERG; BARANGAZINI, 2010). Essa desregulação imune envolve os sistemas de imunidade inata, como células dendríticas (CD) e células apresentadoras de antígeno (APCs) e imunidade adaptativa com a participação das células B e T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (GRIGORIADISE; VAN PESCHB, 2015; SALOU et al., 2015).

Estudos do tipo caso-controle têm sido realizados para correlacionar a exposição das pessoas a radiações UV, através da luz solar com a incidência de

EM. Os efeitos da exposição ao sol são mediadas pela vitamina D que, como descrito, pode ter um papel protetor no aparecimento da EM (ASCHERIO; MUNGER; 2007).

Um estudo na Tasmânia indicou uma diminuição no risco de desenvolvimento da EM em pessoas que tiveram uma maior exposição a raios UV entre 6 e 15 anos de idade (GOLDACRE et al., 2004). Munger, Zhang e O'reilly publicaram em 2004, um estudo de segmento que realizaram no decorrer de 20 anos no qual estudaram dois grandes grupos de mulheres. Nos resultados, constatou-se que pacientes suplementadas com vitamina D tiveram menor risco de desenvolvimento da EM (MUNGER; ZHANG; O'REILLY, 2004). Ascherio, Munger e Simon (2010) também visualizaram esse papel protetor da vitamina D para o surgimento da EM (ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010).

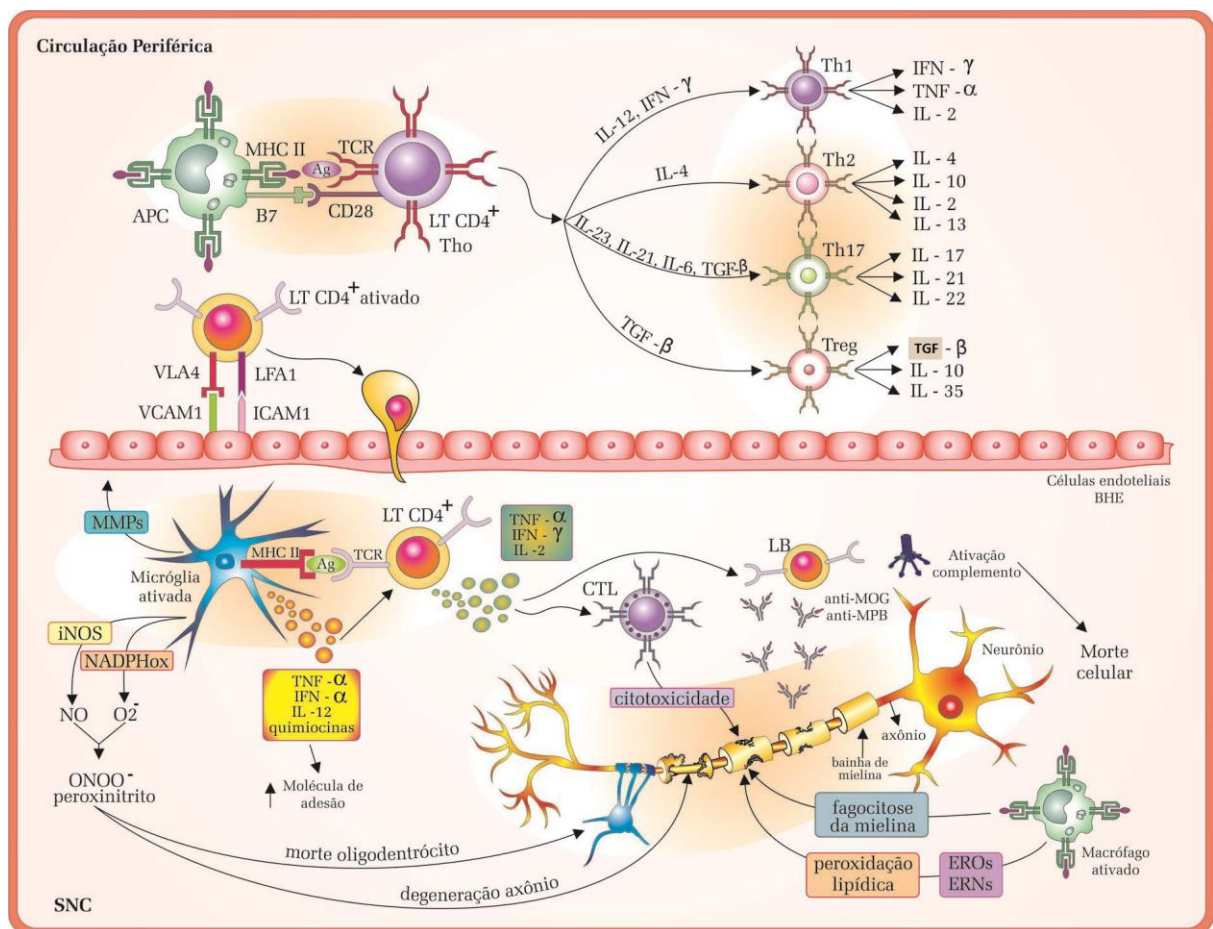
Um surto inicial na EM pode ser explicado pelo mimetismo molecular entre alguns epítomos microbianos e bainha de mielina humana. Algumas recidivas podem ocorrer após infecções virais, como o herpes-vírus tipo 6, influenza, sarampo, papiloma vírus e herpes-vírus humano tipo 4 (Epstein-Barr). Todos esses microrganismos possuem sequências semelhantes às encontradas nas proteínas estruturais da mielina. Em um processo infeccioso, estes microrganismos podem ativar linfócitos T (LT), linfócitos B (LB) e macrófagos que, posteriormente, penetrarão na barreira hematoencefálica, reconhecendo assim, essas sequências microbianas na bainha de mielina e causando sua degradação por um processo autoimune (WUCHERPFENNIG, et al., 1997; STEINMAN, 2001).

No SNC, a reposta inflamatória é dirigida pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) que induzem as células endoteliais a expressarem a molécula de adesão celular vascular (VCAM) e o complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). Os LT ativados expressam as integrinas e CD4 que podem se ligar a VCAM e MHC-II das células endoteliais, desencadeando o processo inflamatório (STEINMAN, 2001).

Na evolução da doença, tem sido demonstrado a ocorrência de duas fases distintas: uma inicial com predominância inflamatória, na qual ocorre a desmielinização, perda de oligodendrócitos e comprometimento axonal, e uma tardia com características degenerativas (STEINMAN, 2001; MILLER et al., 2012). Esta evolução bimodal evidencia diferentes processos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento e progressão da EM (MILLER et al., 2012).

Na Figura 3, abaixo, estão elucidados os mecanismos imunopatológicos e de estresse oxidativo (EO) envolvidos no dano ao SNC causados pela EM. Nesta figura, observa-se dois locais diferentes de ativação celular no organismo: a circulação periférica, na qual ocorre a ativação dos LT virgens pelas APC que apresentam através de MHC-II um antígeno desconhecido, ativando o linfócito Th0 em Th1, Th2, Th17 ou Treg dependendo do estímulo de citocinas secretados pela célula apresentadora. O LT, agora diferenciado e ativado, ultrapassa a BHE e ativa a micróglia no SNC, o segundo local de ativação celular. Com a ativação das células residentes, há subsequente aumento da produção de EROs e ERNs, ativação de macrófagos, presença de LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) e LB, com produção de anticorpos, ataque autoimune e consequente degradação da bainha de mielina (OLIVEIRA et al., 2014).

**Figura 3 – Fisiopatologia da Esclerose Múltipla**



**Fonte:** Oliveira et al., (2014).

A EM pode ser classificada por quatro padrões diferentes de desmielinização. O padrão tipo I é o mais encontrado em EM e está associado a presença de LT e macrófagos no infiltrado inflamatório, remielinização parcial e preservação de oligodendrócitos que são responsáveis pela síntese da mielina (IRANI, 2005; KANTARCI; MORALES; ZIEMER, 2005). O padrão de lesão tipo II é menos frequente que o tipo I e é caracterizado pela deposição de anticorpos e ativação do sistema complemento nos locais da lesão. Neste padrão também não é visualizado comprometimento dos oligodendrócitos. Já nos padrões III e IV quase não se observa remielinização, pois existe grande comprometimento dos oligodendrócitos (IRANI, 2005; LUCCHINETTI et al., 2000). LT ativados atacam normalmente proteínas encontradas na bainha de mielina, como a proteína básica da mielina, glicoproteína de mielina e proteína proteolipídica oligodendroglial. Essas células T produzem várias citocinas como o TNF- $\alpha$  e a linfotóxina-alfa (LT- $\alpha$ ) que induzem macrófagos, micróglia e astrócitos para a produção de óxido nítrico (NO) e osteopontina (STEINMAN, 2001).

O NO está ligado à morte de células oligodêndricas pela micróglia, e à óxido nítrico sintase (iNOS), que catalisa a síntese de NO e é encontrada em lesões desmielinizantes na EM. O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  induzem a transcrição de iNOS em astrócitos, micróglia e macrófagos e, este efeito juntamente com anticorpos, induzem a fagocitose de grandes fragmentos da bainha de mielina (STEINMAN, 2001).

Macrófagos e LT produzem osteopontina que induz LT *helper* do tipo 1 (Th1) a produzirem citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e interleucina (IL) 2 (IL-2), além de reduzir a ação de LT *helper* tipo 2 (Th2), que produzem citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. As citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células Th1 exacerbam a EM, enquanto que as do padrão Th2 reduzem as lesões por serem anti-inflamatórias (KAPPOS et al, 2000).

Estes ataques imunológicos mediados por LT, LB, complemento e mediadores inflamatórios como citocinas e NO, produzem vastas áreas de desmielinização que prejudicam a condução elétrica ao longo do axônio e gera a fisiopatologia da EM (STEINMAN, 2001).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> produzem também células da linhagem T *helper* 17 (Th17), que quando ativado produz citocinas IL-17, IL-6, IL-21 e IL-22 que são

pró-inflamatórias e estão presentes em grande número em doenças autoimunes (KRAKAUER; SORENSEN; KHADEMI, 2008).

Além das células T CD4<sup>+</sup>, sabe-se que as células T CD8<sup>+</sup> também têm importante papel na fisiopatologia da EM, porque podem se infiltrar nas lesões cerebrais e serem importantes efetores no processo da doença (SALOU et al., 2015). A presença e expressão do complexo de histocompatibilidade classe I (MHC-I), induzida pelas células T CD8<sup>+</sup>, é necessária para a citotoxicidade dessas células. Estudos têm demonstrado um aumento da presença deste tipo de MHC nos oligodendrócitos, neurônios, axônios e astrócitos, dependendo do tipo de EM e atividade da lesão neuronal (HÖFTBERGER et al., 2004; SALOU et al., 2015).

Steinman (2001) avaliou o sequenciamento genético em pacientes com EM incluiu a expressão TNF- $\alpha$ , imunoglobulinas, IL-6, componentes da cascata do sistema complemento e osteopontina como ponte da transição da forma EM-RR para formas progressivas da doença.

Um estudo realizado em 2014 avaliou a presença do polimorfismo Ncol de *Fator de necrose Tumoral Beta* (TNF- $\beta$ ) em pacientes com EM e concluiu que este está diretamente associado ao aumento de marcadores metabólicos e inflamatórios. Mulheres com esse polimorfismo apresentaram diminuição de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, e uma correlação positiva entre EDSS e glicose, EDSS e *Homeostasis Model Assessment* de resistência à insulina (HOMA-IR). Já homens portadores deste polimorfismo, além de apresentarem também diminuição de IL-4 e IL-10, tiveram um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 que são citocinas pró-inflamatórias, com uma correlação positiva entre EDSS e níveis de TNF- $\alpha$  (KALLAUR et al., 2014).

Outro estudo genético envolvendo polimorfismos foi realizado no Rio de Janeiro, Brasil, no ano de 2015. Neste trabalho, os autores estudaram mulheres com EMRR e mulheres saudáveis e constataram que o polimorfismo rs4774\*C no gene *CIITA* em conjunção com o alelo *HLA-DRB1\*15:01*, provocou um aumento a susceptibilidade de EM nessas pacientes, destacando uma origem poligênica para esta doença (PARADELA et al., 2015).

Pacientes com EMRR, mesmo na fase de remissão, exibem uma rede complexa de citocinas pró e anti-inflamatórias que interagem para modular a progressão e atividade da doença. Apresentam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias como, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 quando foram comparados com indivíduos

saudáveis. Essas pacientes com EM-RR, com incapacidade leve, tiveram maiores níveis de IL-4 quando comparados com pacientes com maior incapacidade verificada pelo EDSS (KALLAUR et al. 2013). Outro estudo associou a presença de lesões na RNM com valores mais altos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 e IL-12 diminuídas em pacientes com EM em progressão quando comparados a pacientes com EM em remissão, com correlação inversa de níveis de IL-10 com EDSS em pacientes com EM progressiva (KALLAUR et al., 2016).

## 1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E EM

Estudos apontam que o EO tem um importante papel na fisiopatologia de doenças do SNC, dentre elas a EM, devido ao elevado consumo de oxigênio e altos índices de ácidos graxos no SNC (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; BARNHAM; MASTERS; BUSH, 2004; FRIEDMAN, 2011). Um estudo *post-mortem* avaliou partes do tecido nervoso de oito pacientes com EM e seis pacientes controles. Realizou-se a pesquisa de anticorpos, imunohistoquímica, biologia celular, exames de imagens e estresse oxidativo por imunofluorescência pesquisando malonaldeído, 4-hidroxinonenal, superóxido dismutase 1 (SOD-1) e superóxido dismutase 2 (SOD-2), dentre outros. Foi demonstrado que o EO está diretamente ligado aos danos na matéria cinzenta do cérebro de indivíduos com EM (KEMP et al., 2016).

Outros trabalhos têm avaliado os produtos da peroxidação lipídica em pacientes com EM e encontraram um aumento significativo destes produtos (OLIVEIRA et al., 2016). A peroxidação proteica tem sido maior nesses casos (MILLER et al., 2012).

Dentre as ERNs, o radical livre NO é conhecido por seu envolvimento como mediador de doenças autoimunes e morte de células do SNC, como oligodendrócitos. O NO é responsável pela ativação da micróglia, sendo que a enzima que catalisa a síntese desse radical, a iNOS, vem sendo constantemente encontrada em lesões desmielinizantes (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004; VAN HORSSSEN, et al. 2008). A combinação de NO, anticorpos, sistema complemento e TNF- $\alpha$  induzem a fagocitose de grandes partes da bainha de mielina, prejudicando a condução elétrica ao longo do axônio, resultando assim na desmielinização (KAPPOS et al., 2000).

Vários estudos têm associado os níveis de metabólitos de NO (NOx) com EM, porém, os dados são discrepantes. Enquanto um estudo constatou uma diminuição deste metabólito nos fluídos biológicos (DE BUSTOS et al., 1999), dois trabalhos mostraram níveis elevados de NOx no líquido céfallo-raquidiano (LCR) e plasma de pacientes com EM (DANILOV; ANDERSSON; BAYAND, et al., 2003). Oliveira et al (2016) demonstraram que os níveis de NOx podem ser utilizados como preditores desta doença. Outra pesquisa envolvendo polimorfismo do gene *Nco1* do *TNF-β* e EO, relacionou positivamente o aumento dos níveis de NOx com o EDSS (KALLAUR et al., 2015).

Van Meeteren et al. (2005) relataram que pessoas com EM apresentam níveis diminuídos de antioxidantes, dentre eles o ácido úrico, que é um importante antioxidante endógeno bastante estudado na EM. Há tanto relato da diminuição dos níveis séricos de ácido úrico (TONCEV et al., 2002), quanto de níveis elevados desse antioxidante não enzimático em pacientes com EM (AMORINI; PETZOLD; TAVAZZI, 2009).

Tem sido demonstrado que a capacidade antioxidante total do plasma está reduzida em pacientes com EM, assim como também a atividade das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (BESLER; COMOGLU, 2003; OLIVEIRA et al., 2016).

Um estudo publicado em 2012, demonstrou que pacientes com EM apresentaram aumento significativo nos níveis plasmáticos de biomarcadores de EO quando comparados com indivíduos saudáveis. Avaliando marcadores de EO como hidroperóxidos lipídicos, NOx, capacidade antioxidante total do plasma (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*), grupamento sulfidril, dentre outros, foi demonstrado uma correlação positiva entre os níveis de hidroperóxidos lipídicos e o EDSS demonstrando que o aumento de estresse oxidativo está diretamente envolvido na incapacidade presente na EM (OLIVEIRA et al., 2012).

Alguns biomarcadores de EO têm sido descritos como preditores de diagnóstico para EM. Entre esses biomarcadores estão o hidroperóxido lipídico (CL-LOOH), AOPP, TRAP e NOx, além da ferritina e da albumina. Foi demonstrado também que os AOPP e a albumina auxiliam na diferenciação EMRR das formas progressivas da doença (OLIVEIRA et al., 2016). Os produtos avançados de oxidação proteica são originários do resultado da ação dos radicais livres em

proteínas e podem atuar como mediador inflamatório (ALDERMAN; SHAH; FOREMAN, 2002).

### 1.7 FERRITINA E EM

O excesso de ferro no organismo pode causar um aumento das EROs causando danos oxidativos com base na reação de Fenton. Essa reação é caracterizada pela ação do oxidante peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no  $Fe^{2+}$ , transformando-o em  $Fe^{3+}$  mais grupo hidroxila (OH) (FENTON, 1894). No entanto, este excesso pode ser regulado pelos níveis de ferritina, que tem alta capacidade de armazenamento desse metal (HARRISON; AROSIO, 1996). Desta forma, a ferritina pode ser considerada um antioxidante natural por sequestrar o ferro e inibir o EO e, conseqüentemente, a apoptose celular (ZHAO; AROSIO.; CHASTEEN, 2006).

A ferritina é uma proteína com alto grau de armazenamento de ferro, composta por 24 de cadeias de polipeptídeos de 2 distintas subunidades, leves (L) e pesadas (H), que são capazes de se ligar a até 4500 átomos de ferro, que é um metal crítico para o funcionamento normal do cérebro humano além de ser responsável também pela síntese de DNA e pela fosforilação oxidativa (HARRISON e AROSIO, 1996; DA COSTA et al., 2011; STANKIEWICZ; NEEMA; CECCARELLI, 2014). A síntese desta proteína é regulada pelos níveis celulares de ferro e fornecimento de oxigênio (SAMMARCO et al., 2008) e sua meia vida é de cerca de 3,5 horas (MEHLHASE et al., 2005). No entanto, o metabolismo irregular dos níveis de ferro pode causar diversos distúrbios neurológicos, como por exemplo, a EM (STANKIEWICZ; NEEMA; CECCARELLI, 2014).

A cadeia pesada da ferritina é responsável pela atividade da ferroxidase dessa proteína e essa atividade é essencial para a absorção de ferro livre. Já a cadeia leve da ferritina facilita o armazenamento do metal em seu núcleo. Portanto, para o armazenamento correto e eficiente do ferro na ferritina é necessário um equilíbrio de ambas as cadeias dessa proteína (ZHAO et al., 2001). O EO está envolvido na modulação transcricional da ferritina, que pode atuar diretamente ou indiretamente sobre a expressão de seu gene. As citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  (Interleucina 1-alfa) e IL-6, regulam positivamente a síntese de ferritina

em células mesenquimais, hepatócitos e monócitos-macrófagos (MILLER et al., 1991).

Estudos relataram um aumento significativo de ferritina em doenças inflamatórias crônicas e autoimunes neurodegenerativas (ZANDMAN-GODDARD e SHOENFELD, 2007; DA COSTA et al., 2011; DWYER et al., 2015). KHALIL et al., 2014 evidenciaram que a homeostase do ferro é alterada no SNC durante fases precoces da EM, sugerindo que a ferritina pode desempenhar um papel fundamental no aumento da deposição de ferro no cérebro de pessoas com a doença. No SNC, a ferritina encontra-se em níveis elevados e estes níveis, porém, podem sofrer alterações durante o envelhecimento ou doenças degenerativas como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson.

Diversos estudos descreveram a ferritina como pró oxidante, mostrando que o radical superóxido pode mobilizar o ferro da ferritina, e que sua exposição exacerbada a radicais de oxigênio, pode aumentar a quantidade de ferro reativo, levando assim, a uma maior lesão oxidante no indivíduo. Além disso, o ferro é catalisador da formação de radicais OH, que são potentes oxidantes e que atacam lipídios da membrana celular, proteínas e ácidos nucleicos (AROSIO; LEVI, 2002; SALVADOR, 2010; KHALIL et al., 2014). No entanto, outros estudos caracterizaram a ferritina como antioxidante, descrevendo que ela possui um importante papel protetor, mediado pelo oxigênio, contra os danos causados pelos radicais livres (BALLA et al., 1992; OBERLE et al., 1999; AROSIO; INGRASSIA; CAVADINI, 2009; DRWYER et al., 2015).

As células residentes no cérebro humano, como oligodendrócitos e micróglia, apresentam elevados níveis de ferritina e conseqüentemente de ferro, visualizados em tecidos vivos por RNM ou em tecidos de autópsia. Níveis excessivos deste metal no SNC são capazes de produzir EROs e ERNs que, portanto, podem prejudicar a ligação de ferritina, como dano pela oxidação de ferro (HAN et al., 2002; ZECCA et al., 2004; MEHTA et al., 2013). Mehrlase (2005) demonstraram que o aumento de ferro, decorrente de aumento de radicais livres, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estimula agentes quelantes deste metal, e inibe assim a expressão de ferritina. O aumento de peróxido de oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) também eleva em 25% a taxa de degradação da ferritina. Uma deposição aumentada de ferro na EM foi descrita por alguns pesquisadores, que visualizaram a presença deste metal circundante às placas de desmielinização na substância branca e dentro das lesões nos vasos

sanguíneos da substância cinzenta no cérebro de pessoas com EM (PETZOLD et al., 2002; STANKIEWICZ et al., 2007). Outro estudo realizado em 2008, concluiu que a sobrecarga de ferro no SNC, contribui para a patogênese da EM, e um desequilíbrio deste metal é verdadeiramente associado com uma atividade pró-oxidante e pró-inflamatória da doença, podendo assim o ferro ser um alvo para terapias futuras de controle da EM (ABO-KRYSHA; RASHED, 2008).

Os radicais livres resultantes da ativação da micróglia pelo excesso de ferro e conseqüentemente ferritina, induzem um aumento significativo do EO e da peroxidação lipídica, pelo excesso de ácidos graxos presentes no cérebro, levando a uma disfunção mitocondrial que pode levar à morte dessas células residentes do SNC humano em pacientes com EM (HALLIWELL, 2006; SALVADOR, 2010).

Um estudo que avaliou duas outras doenças neurodegenerativas, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, constatou aumento significativo de ferro e ferritina na substância negra do cérebro de pacientes o que, segundo os autores, está diretamente ligado ao aumento de EROs e EO (JELLIMNGER et al., 1990). Outro estudo mais recente com pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico descreveu a ferritina como pró-oxidante e observou que o excesso de ferritina também auxilia na formação de EO (LOZOVYOY et al., 2013).

No entanto, Dwyer e colaboradores (2015) estudaram um grupo de pacientes com EMRR durante 24 semanas que faziam uso de IFN- $\beta$ 1a três vezes por semana, e descreveram que esses pacientes tinham um aumento a curto prazo dos níveis de ferritina sérica e diminuições das lesões no SNC verificadas por RNM, e que o aumento dessa proteína não aumentou os níveis de ferro no cérebro, não causando assim danos aos pacientes.

Embora a maior parte dos relatos tenham demonstrado os efeitos deletérios da ferritina, também tem sido demonstrado que a cadeia pesada da ferritina pode sequestrar o Fe  $2^+$  em solução e reduzir a peroxidação lipídica induzida pela reação de Fenton, e que a ligação ferro-ferritina pode ligar-se a grandes quantidades de moléculas de NO em diferentes locais da estrutura desempenhando uma ação antioxidante (AROSIO; LEVI, 2002).

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando que:

- O aumento de ferritina é um preditor de EM e está associada com as formas progressivas da doença;
- Estudos prévios demonstraram que a ferritina apresenta efeito antioxidante em doenças inflamatórias crônicas e autoimunes;
- Há alteração do estado redox em pacientes com EM e este está correlacionado ao aumento de EDSS;
- Não há estudos que tenham investigado o envolvimento da ferritinemia no EO em pacientes com EM;

Este estudo tem como hipótese que a ferritinemia está associada há alteração do estado redox e a progressão da doença em pacientes com EM.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a influência dos níveis séricos de ferritina nos parâmetros de EO e na progressão da doença em pacientes com EM.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis séricos de ferritina em indivíduos saudáveis (grupo controle) e pacientes com EM;
- Verificar se altos níveis de ferritina estão associados os marcadores de EO em pacientes com EM;
- Verificar se há associação entre altos níveis de ferritina e as formas clínicas de EM;
- Avaliar se o aumento sérico de ferritina está associado com a progressão da doença.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO E ASPECTOS ÉTICOS

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

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).

### 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

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.

Foram avaliados 164 pacientes com EM diagnosticados segundo os critérios de McDonald (POLMAN; REINGOLD; BANWELL, 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 obtidas na avaliação clínica.

O grupo controle foi composto de 167 indivíduos saudáveis selecionados, consecutivamente, entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e da população em geral. 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.

Posteriormente, o grupo de pacientes com EM foi dividido em 2 subgrupos, de acordo com a mediana e interquartil (IQR, 25-75%) para valores séricos de ferritina sendo mediana de 125,6 ng/mL e IQR 65,5-221,6 ng/mL: grupo 1 – ferritina < 125,6 ng/mL; grupo 2: ferritina ≥ 125,6 ng/mL)

#### 4.3 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.

#### 4.4 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<sup>2</sup>. 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.

#### 4.5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Para a análise dos marcadores do EO, 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 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.

#### 4.6 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

##### 4.6.1 Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos por Quimioluminescência Iniciados Por t-butil (CL-LOOH)

A avaliação da formação de lipoperóxidos por quimioluminescência (QL) foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzales-Flecha, Llesuy e Boveris (1991). A metodologia de 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 EO 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).

#### 4.6.2 Determinação Dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

Os AOPP foram determinados no plasma usando um método semiautomático descrito por Witko-Sarsat et al. (1996). AOPP resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos, como a tirosina, e detectados espectrofotometricamente. As concentrações foram expressas em micromol/L (umol/L) de equivalente de cloramina T.

#### 4.6.3 Determinação de Proteínas Carbonílicas

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de EO (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 e Paccker (1994). Os resultados foram expressos em nmol mL<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteínas totais.

#### 4.6.4 Determinação de nitrito para estimativa do NO

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez, Garcia-Benayas e Arenas (1998), com adaptações. 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 cadmio-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  $\mu\text{M}$ .

#### 4.6.5 Capacidade Antioxidante Total do Plasma

Determinou-se a capacidade antioxidante total do plasma por meio da metodologia do TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*). 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.

#### 4.7 FERRITINEMIA

Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por ensaio de quimioluminescência em micropartículas (CMIA) (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) e expressos em ng/mL.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados categóricos foram analisados pelo teste de  $\chi^2$  ou exato de Fisher, conforme apropriado. Os resultados foram expressos como número absoluto e porcentagem. 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 havia heterogeneidade da variância, conforme avaliado com o teste de Levene. Comparações entre grupos foram realizadas utilizando o teste t de Student e os dados foram expressos como  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$ SEM). Os resultados obtidos na análise univariada que apresentaram  $p < 0,1$  foram incluídos na análise de regressão logística binária

multivariada. 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 um artigo científico, que foi submetido à revista *Journal of the Neurological Sciences*, com fator de impacto 2,126.

## **DISEASE PROGRESSION AND OXIDATIVE STRESS ARE ASSOCIATED WITH HIGHER SERUM FERRITIN LEVELS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS**

Katerine Panichi Zanin Ferreira<sup>1\*</sup>, Sayonara R Oliveira<sup>2</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>1</sup>, Damacio R Kaimen-Maciel<sup>3</sup>, Marcell Alysson B Lozovoy<sup>2</sup>, Elaine Regina Delicato de Almeida<sup>2</sup>, Helena Kaminami Morimoto<sup>2</sup>, Leda Mezzaroba<sup>2</sup>, Isaias Dichi<sup>3</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program, Biological Sciences Center, University of Londrina, Paraná, Brazil.

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

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

**Corresponding author:** Dra. Andrea Name Colado Simão, 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; E-mail: deianame@yahoo.com.br, Tel: 55 (43) 33712321; Fax: 55 43 3371 2619

**Abstract**

Hyperferritinemia and oxidative stress have been implicated in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). The aim of the present study was to evaluate the serum levels of ferritin and to verify their association with oxidative stress markers and MS progression. This study included 164 MS patients, which were divided in two groups according to their levels of ferritin (cut off 125.6 µg/L). Oxidative stress was evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH), advanced oxidation protein products (AOPP), carbonyl protein, nitric oxide metabolites (NOx), sulfhydryl groups of protein and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). MS patients with elevated levels of ferritin showed higher disease progression ( $p=0.030$ ), AOPP ( $p= 0.001$ ), and lower plasma NOx levels ( $p= 0.031$ ) and TRAP ( $p= 0.006$ ) than MS patients with lower ferritin levels. The multivariate logistic regression analysis showed that increased AOPP and progression of disease were significantly and positively associated with increase of ferritin. The combination of serum ferritin levels and oxidative stress markers were responsible for 13,9% in the disease progression. In conclusion, our results suggest that ferritin could aggravate oxidative stress in patients with MS and contribute to progression of disease.

**Keywords:** Ferritin, multiple sclerosis, oxidative stress, disease progression, hyperferritinemia

## 1 INTRODUCTION

MS is a chronic disease of the central nervous system and is associated with the formation of focal myelin loss and progressive neurodegeneration that is present in all phases of the disease and is closely associated with inflammation and oxidative stress [1]. Oxidized DNA molecules, lipids, and protein adducts are frequently found in active MS lesions and are associated spatially and quantitatively with apoptotic oligodendrocytes and neurodegeneration in the brain of patients with MS [2].

Hyperferritinemia is associated with inflammation, infections, and malignancies. In many aspects, ferritin can be viewed as a member of the group of proteins that respond to oxidative and nitrosative stress and inflammation [3]. Inflammatory cytokines, particularly tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\alpha$  (IL-1- $\alpha$ ), upregulate ferritin synthesis in various mammalian cells, including mesenchymal cells, hepatocytes, and monocyte-macrophage [4]. Controversy exists whether ferritin has pro- or antioxidant properties. Oligodendrocytes have high concentrations of ferritin and iron [5,6], 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 [4]. Therefore, ferritin has an ambiguous role and depends on various circumstances to be considered as pro or antioxidant.

Hyperferritinemia has been observed in patients with MS and higher levels were associated with inflammatory process and oxidative stress [6,7,8]. A previous study reported that ferritin levels were significantly elevated in the serum and the cerebrospinal fluid only in chronic progressive active MS patients [7].

In addition, a recent study of our group, which aimed to evaluate inflammatory and oxidative stress blood markers as possible predictors of MS, demonstrated that besides albumin and biomarkers of oxidative and nitrosative stress, such as, CL-LOOH, AOPP, TRAP and NOx, ferritin levels could be also a predictor of MS [8].

Although there is a body of evidence to support a role of hyperferritinemia in several issues related to MS, we are not aware of any study which has reported the likely involvement of oxidative stress in this process.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the serum levels of ferritin and to verify their association with oxidative stress markers and progression of the disease.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 SUBJECTS

The study evaluated 164 patients with MS who were recruited from the Outpatient of Demyelinating Diseases at the University of Londrina, Londrina, Paraná, Southern Brazil and 167 healthy controls. MS and the control group were controlled by sex, age, ethnicity and body mass index (BMI). None of the participants in the study presented with anemia, heart, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal or oncological diseases and none was receiving antioxidant supplements. All of the individuals enrolled in the study did not drink alcohol or practiced physical activity regularly.

The MS diagnosis was established according to the McDonald criteria [9] and the patients were classified as with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) or with MS progressive clinical forms, including primarily-progressive and secondary-progressive (PPMS and SPMS, respectively). The patients were clinically evaluated for disability using the Extended Disability Status Scale [10]. The disease progression was evaluated by EDSS 5-year follow-up less EDSS baseline and a relevant worsening of disability was defined as worsening of the EDSS score by at least one full point for patients with baseline score of <6.0, and worsening by at least one-half point for patients with baseline score of 6.0 or higher [11].

The group of patients with MS was divided in accordance with median and interquartile range (IQR) as follows: low ferritin levels (ferritin < 126.0 µg/L), which corresponded to the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> IQR and high ferritin levels (ferritin 126.0 ≥ µg/L), which corresponded to the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> IQR.

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.

### 2.2 DETERMINATION OF BODY MASS INDEX

The anthropometric measurements evaluated were body weight (measured to the nearest 0.1 kg using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes) and height (measured to the nearest 0.1 cm using a stadiometer). BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

### 2.3 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  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.4 OXIDATIVE STRESS MARKERS

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

Lipid hydroperoxides in plasma were evaluated by CL-LOOH as described previously [12], a method with higher sensitivity and specificity than the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement, the usual method to determine lipid oxidation [12]. The results were expressed in counts per minute (cpm).

#### 2.4.2 Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

AOPP was determined in the plasma samples using the method described by Witko-Sarsat et al. (1998) [27]. 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.

#### 2.4.3 Carbonyl Protein Content

Carbonyl content was measured as an estimate of protein oxidative injury and was determined as described previously [13]. The results were expressed in nmol/mL/mg total proteins.

#### 2.4.4 Nitric Oxide Metabolites (NO<sub>x</sub>)

Serum NO<sub>x</sub> levels were assessed by nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration according to the Griess reaction, supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [13]. The values were expressed as μM.

#### 2.4.5 Determination of sulphhydryl groups

The sulfhydryl groups of protein were evaluated in the plasma samples by a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), as reported previously [14], and the results were expressed in μM.

#### 2.4.6 Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

The TRAP was determined as reported previously [15]. 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/ uric acid mg/dL (UA).

### 2.5 LABORATORIAL ANALYSES

#### 2.5.1 Serum Levels of Ferritin

Ferritin levels were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA; Architect, Abbott Laboratory Abbott Park, IL, USA).

### 2.6 STATISTICAL ANALYSES

Categorical data were analyzed with Fisher's exact test or chi-square test when appropriate. The results were expressed by absolute number. Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Natural logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analyses when the variables were not normally distributed. Comparisons between groups were performed using t Student test. Data were expressed as the mean ( $\pm$ SEM). The results of these univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables to be used as determinants of independent association with the higher ferritin levels in subsequent binary logistic regression analyses. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also demonstrated. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. All analyses were conducted with SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

### 3 RESULTS

Serum levels of ferritin were matched in relation to gender, ethnicity, age and BMI in controls and MS patients. MS patients had higher ferritin levels when compared with controls ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1).

Table 1 shows the demographic, anthropometric and clinical characteristics of MS patients categorized in two groups, according to their ferritin levels. There were no significant differences in sex ( $p = 0.074$ ), ethnicity ( $p = 0.575$ ), age ( $p = 0.820$ ), BMI (0.169), tabagism ( $p = 0.626$ ), clinical forms (0.297), duration of the disease ( $p = 0.619$ ), and EDSS ( $p = 0.198$ ). However, MS patients with high ferritin levels showed higher disease progression ( $p = 0.030$ ) than those with low ferritin levels. Both groups did not differ in therapies utilization for MS, such as interferon- $\beta$ , glatiramer acetate, and natalizumab ( $p = 0.3066$ ).

Table 2 shows the oxidative stress markers in MS patients categorized by serum ferritin levels. We found no significant differences in CL-LOOH ( $p = 0.566$ ), carbonyl protein (0.760), and SH ( $p = 0.264$ ). MS patients with high ferritin levels showed higher AOPP ( $p = 0.001$ ), whereas NOx levels and TRAP had lower serum levels ( $p = 0.031$  and  $p = 0.006$ , respectively) in this group when compared to MS patients with low ferritin levels.

Table 3 shows the outcome of the binary logistic regression analysis. AOPP (OR=8.759, 95% CI=1.606-47.799,  $p = 0.012$ ) and disease progression

(OR=1.447, 95% CI=1.031-2.032,  $p=0.033$ ) were directly associated with high ferritin levels, independently of gender. In addition, there was a trend of inverse association between TRAP (OR=0.188, 95% CI=0.027-1.307,  $p=0.091$ ) and ferritin levels.

AOPP ( $p=0.006$ ) and progression index ( $p<0.001$ ) were directly correlated while TRAP ( $p=0.009$ ) and NOx ( $p=0.022$ ) were inversely correlated with ferritin levels (Figure 2). The linear regression model 1 demonstrated that ferritin was responsible for 6% variation of disease progression. However, in model 2, association between ferritin and AOPP, NO and TRAP were responsible for 13.9% variation of disease progression (table 4).

## 4 DISCUSSION

The main findings of the present study were that high ferritin levels are associated with disease progression and oxidative stress markers in MS patients. MS patients with higher ferritin levels had increased oxidative stress shown by elevated serum AOPP levels and reduced NOx and TRAP levels.

Ferritin and iron homeostasis have been implicated in the pathogenesis of MS [8,16,17]. Ferritin is an acute-phase reactant that represents the major intracellular iron storage protein essential for various metabolic processes including myelin formation and oxidative phosphorylation [18]. The expression of ferritin is under delicate control, and is regulated by oxidative stress, hormones (thyroid hormone), growth factors, second messengers, and hypoxia-ischemia and hyperoxia [19].

Several possible causes of abnormal iron deposition in MS have been postulated including blood-brain barrier dysfunction, decreased iron clearance because of axonal dysfunction and inflammation, or dysregulation of iron transport proteins because of inflammation [20].

Our results demonstrated that hyperferritinemia was associated with a redox imbalance. In the present study, MS patients with high ferritin levels showed increased AOPP compared with controls. AOPP has been used to measure damage done to proteins by oxidative stress in different neurological diseases, including MS [21]. Our data showed that AOPP was associated with elevated serum levels of ferritin and there is a positive correlation between ferritin and AOPP levels.

A role for extracellular ferritin as a pro-inflammatory signaling molecule in hepatic stellate cells has been proposed, as well as a link between NO and iron metabolism [22]. Ferritin acts as a cytokine regulating pro inflammatory function via nuclear factor kappa B, which contributes to a markedly enhanced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) with increased NO levels. However, our study observed a significant decrease in NO<sub>x</sub> levels in MS patients with higher ferritin levels. This results could be explained by higher NO consumption in this condition. NO is consumed when it reacts with superoxide anion, producing the strong oxidant species peroxynitrite (ONOOH<sup>-</sup>) [21,23] that is toxic for oligodendrocytes and axons and seems to be a key molecule of oxidative and nitrosative stress which are involved in the pathophysiological mechanisms of MS [8]. Probably, the high ferritin levels in these patients lead to increased oxidative stress, which in turn decrease NO to form peroxynitrite.

MS patients with high levels of ferritin also showed decreased plasma total antioxidant capacity evaluated by TRAP. Our group has already demonstrated significant decrease in TRAP in MS patients [8,21]. Antioxidant deficiencies may occur during the clinical course of MS as result of chronic inflammation that is accompanied by increased oxidative stress [24].

Controversy still remains whether ferritin has pro-or antioxidant properties. Some hypotheses were assumed to explain ferritin antioxidant properties, as follows: first, high ferritin concentrations in oligodendrocytes and, iron and serum elevated ferritin levels could be a defense mechanism against iron-induced oxidative injury [5]; second, ferritin is considered a natural antioxidant due to the iron sequestration by ferritin with consequent inhibition of oxidative stress and apoptosis [25]. However, ferritin can have pro-oxidant activity due to iron release under non-physiological conditions and, with the production of strong reductants, ferritin iron can be released to catalyze the production of free radicals [4]. 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 [4]. In the course of myelin and oligodendrocyte destruction in MS, iron is liberated into the extracellular space and in part converted into the potentially toxic ferrous form [26]. A recent study published by our group reported that ferritin and CL-LOOH showed positive association with MS and were predictors of MS development and is in agreement with the latter hypothesis [8].

Previous studies reported that serum ferritin levels were elevated in the cerebrospinal fluid of chronic progressive active MS patients compared to levels found in normal individuals [6] and relapsing remitting MS [7]. In the present study, there were no significant differences between clinical forms in both groups. However, we observed that MS patients with high ferritin levels showed increased disease progression. Our data are in agreement with a previous study that demonstrated that hyperferritinemia was associated with a more progressive type of MS [16]. The mechanism increased ferritin in the progression of MS is still not completely understood, but some possible explanations may be considered. The pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, TNF- $\alpha$ , and IL-6 have been found to increase the production and secretion of ferritin [6], thus the elevated level of ferritin is likely related to the underlying inflammation and progression of the disease. In addition, it has been suggested that the association of elevated ferritin levels in MS patients and progression of the disease may be due to the release of ferritin from damaged or dying oligodendrocytes [6].

In the present study, a linear regression model was proposed to predict the progression of MS. The combination of serum ferritin levels and oxidative markers were responsible for around 14% in the disease progression.

In conclusion, although the design of the current study cannot infer causality, our data allow to suggest that serum levels of ferritin are directly associated with oxidative stress and with the disease progression in patients with MS. In addition, oxidative stress may be suggested as one of the molecular mechanisms by which ferritin is associated with disease progression. More studies are warranted to have better understanding of the complex mechanisms involved in the progression of MS.

## REFERENCES

- [1] D. H. Mahad, B. D. Trapp, H. Lassmann. Athological mechanisms in progressive multiple sclerosis, *The Lancet Neurology*. 14, (2015) 183–193.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70256-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70256-X).
- [2] L. Haider, M. T. Fischer, J. M. Frischer, et al., Oxidative damage in multiple sclerosis lesions, *Brain*. 134, (2011) 1914–1924.  
<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awr128>.
- [3] G. Zandman-Goddard, Y. Shoenfeld. Ferritin in autoimmune diseases, *Autoimmun*. 6, (2007) 457-463. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2007.01.016>.
- [4] P. Arosio, S. Levi. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage, *Free Radic Biol* 33, (2002) 457–463.
- [5] J. R. Connor, K. L. Boeshore, S. A. Benkovic, et al. Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain, *J Neurosci* 37, (1994) 461–465.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jnr.490370405>.
- [6] S. M. LeVine, S. G. Lynch, C. N. Ou, et al. Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients, *Brain Res* 821, (1999) 511–515.
- [7] C. Sfagos, A. C. Makes, A. Chaidos, et al. Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients, *Mult Scler* 11 (2005) 272–275.
- [8] S. R. Oliveira, A. P. Kallaur, E. M. Reiche, et al. Albumin and Protein Oxidation are Predictors that Differentiate Relapsing-Remitting from Progressive Clinical Forms of Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* (2016) 1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9860-z>
- [9] C. H. Polman, S. C. Reingold, B. Banwell, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69 (2011) 292–302.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.22366>.
- [10] J. F. Kurtzke. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33 (1983) 1444–1452.
- [11] M. Koch, J. Mostert, A. V. Arutjunyan. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 14 (2007) 529-533.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2007.01739.x>.
- [12] B. G. Gonzales-Flecha, S. Llesuy, A. Boveris. Hydroperoxideinitiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle, *Free Radic Biol Med*, 10 (1991) 93–100.
- [13] C. Panis, A. C. Herrera, V. J. Victorino, F. C. Campos, L. F. Freitas, T. De Rossi, A. N. Colado Simão, A. L. Cecchini. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin

chemotherapy, *Breast Cancer Res Treat*, 133 (2012) 89–97.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1693-x>.

[14] M. L. Hu. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI, editors. *Methods Enzymol*. California: Academic Press, (1994) 380-382.

[15] M. Repetto, C. Reides, M. L. Gomez Carretero, et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta*, 255 (1996) 107–117.

[16] R. Da Costa, M. Szyper-Kravitz, Z. Szekanecz, et al. Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis, *Isr Med Assoc J*, 13 (2011) 91-95.

[17] S. Hametner, I. Wimmer, L. Haider, et al. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Ann Neurol*, 74 (2013) 848-861.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.23974>

[18] G. Zandman-Goddard, Y. Shoenfeld. Hyperferritinemia in autoimmunity. *Isr Med Assoc J*, 10 (2008) 83-84.

[19] C. Rosário, G. Zandman-Goddard, E. G. Meyron-Holtz, et al. The Hyperferritinemic Syndrome: macrophage activation syndrome, Still's disease, septic shock and catastrophic antiphospholipid syndrome, 11 (2013) 185.  
<http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-11-185>

[20] J. Stankiewicz, S. S. Panter, M. Neema, et al. Iron in chronic brain disorders: imaging and neurotherapeutic implications, *Neurotherapeutics*, 4 (2007) 371-386.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.006>.

[21] S. R. Oliveira, A. P. Kallaur, A. N. C. Simão, et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale, *J Neurol Sci*, 321 (2012) 49-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.07.045>

[22] R. G. Ruddell, D. Hoang-Le, J. M. Barwood, et al. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells, *Hepatology*, 49 (2009) 887-900. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22716>.

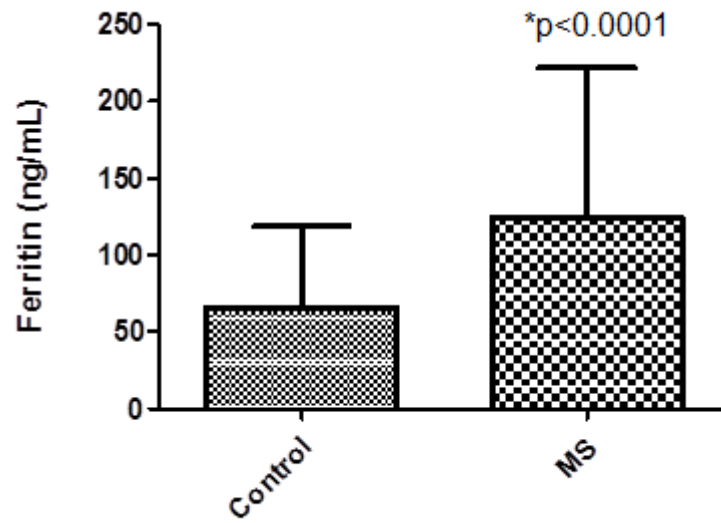
[23] A. N. C. Simão, M. A. Lozovoy, T. N. Simão, et al. Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress, *Braz J Med Biol Res*, 44 (2011) 707-712.

[24] M. E. Van Meeteren, C. E. Teunissen, C. D. Dijkstra, E. A. van Tol. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis, *Eur J Clin Nutr*, 59 (2005) 1347–1361. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602255>

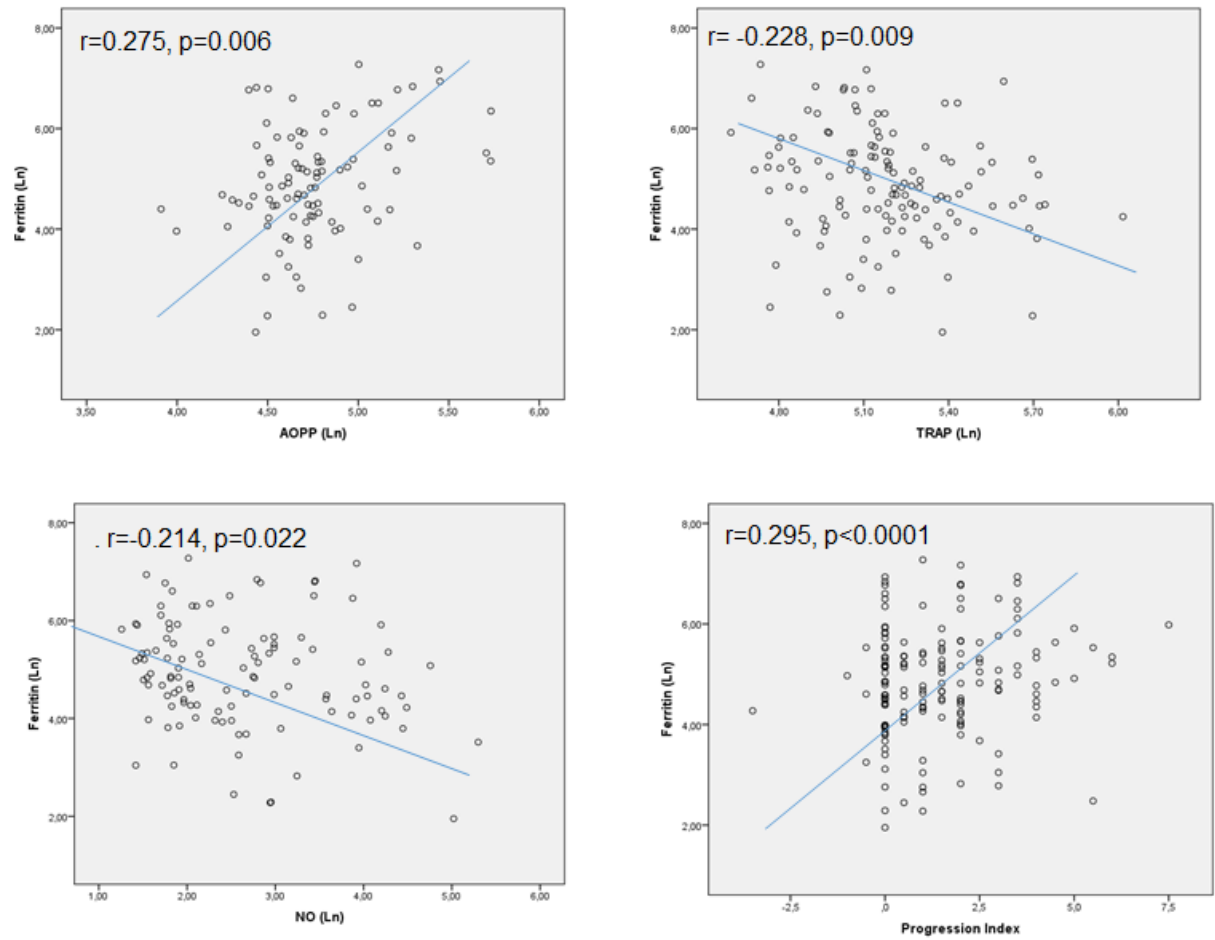
[25] G. Zhao, P. Arosio, N. D. CHASTEEN. Iron(II) and hydrogen peroxide detoxification by human H-chain ferritin: an EPR spin-trapping study, *Biochemistry*, 45 (2006) 3429–3436. <http://dx.doi.org/10.1021/bi052443r>

[26] L. Haider, C. Simeonidou, G. Steinberger, et al. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85 (2014) 1386-1395.  
<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2014-307712>

[27] V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, T. Nguyen Khoa, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure, *J Immunol*, 161 (1998) 2524–2532.



**Figure 1** – Serum ferritin levels in healthy controls and multiple sclerosis (MS) patients. Groups were controlled by sex, age and ethnicity.



**Figure 2:** Pearson correlation between serum ferritin levels with oxidative stress biomarkers and progression index. AOPP, advanced oxidation protein product; NOx, nitric oxide metabolites; TRAP, total radical-trapping antioxidant parameter.

**Table 1: Demographic, anthropometric and clinical characteristics of multiple sclerosis patients categorized in two groups, according to their serum ferritin levels (median).**

Parameters	Ferritin <125.6 (ng/mL) n=82	Ferritin ≥125,6 (ng/mL) n=82	p value
Sex n (%)			
Female	66 ( 80.5)	56 (68.3)	0.074
Male	16 (19.5)	26 (31.7)	
Ethnicity n(%)			
Caucasian	65 (79.3)	62 (75.6)	0.575
Non Caucasian	17 (20.7)	20 (24.4)	
Age (years)	42.15 (1.53)	41.65 (1.57)	0.820
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 (0.54)	25.7 (0.66)	0.169
Smoking n(%)			
No	71 (86.6)	74 (90.2)	0.6256
Yes	11 (13.4)	8 (9.8)	
MS Clinical Forms n(%)			
RRMS	62 (75.6)	56 (68.3)	0.297
Progressive forms	20 (24.4)	26 (31.7)	
Progression n(%)			
Yes	37 (45.1)	35 (42.7)	0.753
No	45 (54.9)	47 (57.3)	
<b>Index Progression (2006-2011)</b>	<b>1.16 (0.16)</b>	<b>1.72 (0.20)</b>	<b>0.030</b>
Disease duration (years)	7.51 (0.93)	6.91 (0.76)	0.619
EDSS n (%)			
<3.5	40 (48.8)	46 (56.1)	
≥3.5	42 (51.2)	36 (43.9)	
EDSS score	3.15 (0.24)	2.72 (0.23)	0.198
Therapy n (%)			
Interferon-β (1a and b)	52 (63.4)	60 (73.1)	0.3066
Glatiramer acetate	16 (19.5)	8 (9.8)	
Natalizumab	1 (1.2)	2 (2.5)	
Treatment naive	13 (15.9)	12 (14.6)	

Categorical data were analyzed by chi-square test and expressed in absolute numbers (n). Continuous data were analysed by t Student test. Data are expressed as mean (±SEM). MS, multiple sclerosis; RRMS, relapsing-remitting multiple sclerosis; EDSS, Expanded Disability Status Scale.

**Tabela 2: Oxidative stress markers in multiple sclerosis patients categorized according to their serum levels of ferritin.**

Parameters	Ferritin <125,6 (ng/mL) n=82	Ferritin ≥125,6 (ng/mL) n=82	p value
CL-LOOH (cpm)	25,514 (1,638)	26,165 (2,113)	0.566
AOPP (µmol/L of chloramine-T equivalents)	114.69 (5.78)	132.34 (7.65)	<b>0.001</b>
Carbonyl proteins (nmol mL <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> total protein)	77.93 (2.85)	78.42 (2.24)	0.760
NOx (µM)	29.63 (5.00)	17.07 (2.61)	<b>0.031</b>
SH protein (µM)	0.275 (0.021)	0.312 (0.023)	0.264
TRAP (uM trolox/UA mg/dL)	192.65 (6.13)	167.38 (6.42)	<b>0.006</b>

Continuous data were analysed by t Student test. Data are expressed as mean (±SEM). CL-LOOH, tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; AOPP, advanced oxidation protein product; NOx, nitric oxide metabolites; TRAP, total radical-trapping antioxidant parameter.

**Tabela 3: Binary logistic regression between high ferritin levels (3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> interquartile range) and normal ferritin levels (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> interquartile range) as the reference group) and explanatory variables**

Parameters	Wald	df	P value	OR (95% CI)
TRAP (TRAP/AU)	2.854	1	0.091	0.188 (0.027-1.307)
AOPP ( $\mu\text{mol/L}$ )	6.289	1	<b>0.012</b>	8.759 (1.606-47.799)
NOx ( $\mu\text{m}$ )	1.955	1	0.162	0.699 (0.423-1.155)
Disease Progression	4.555	1	<b>0.033</b>	1.447 (1.031 – 2.032)
Sex	0.733	1	0.392	1.606 (0.543-4.748)

IQR, interquartile range; TRAP, total radical-trapping antioxidante parameter; AOPP, advanced oxidation protein product; NOx, nitric oxide metabolites.

**Table 4: Results of 2 different model of linear regression analyses with the index progression as dependent variables.**

<b>Dependent variable</b>	<b>Explanatory variable</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>F</b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>
Model 1	Ln Ferritin	3.083	0.002	9.503	1/82	0.002	6.4
Model 2	Ln Ferritin	3.439	0.001	3.196	4/82	0.017	13.9
	Ln AOPP	-	0.269	0.789			
	Ln NOx	-	0.140	0.889			
	Ln TRAP	0.342	0.734				

AOPP, advanced oxidation protein product; NOx, nitric oxide metabolites; TRAP, total radical-trapping antioxidante parameter;

## 6 CONCLUSÕES

- Pacientes com EM apresentam aumento nos níveis de ferritina e estão associados com a alteração do estado redox;
- Não houve associação entre as formas clínicas de EM (RR e formas progressiva) e níveis séricos aumentados de ferritina;
- Níveis aumentados de ferritinemia foram diretamente associados com o índice de progressão da doença.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram um aumento dos níveis de ferritina sérica em pacientes com EM. Níveis aumentados de ferritina foram associados ao desequilíbrio redox e a progressão da doença. Esses dados sugerem que o EO pode ser um dos mecanismos moleculares associados à progressão da doença verificada em pacientes com altos níveis de ferritina.

## REFERÊNCIAS

- ABEM – Associação Brasileira de Esclerose Múltipla. Disponível em: <<http://abem.org.br/esclerose/diagnostico/>>. Acesso em: 27 out. 2016.
- ABO-KRYSHA, N.; RASHED, L. The role of iron dysregulation in the pathogenesis of multiple sclerosis: an Egyptian study. **Multipe Sclerosis Journal**, v.14, p.602-608, 2008.
- ALDERMAN, C. J. J.; SHAH, S.; FOREMAN, J. C. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. **Free Radical Biological Medicine**, v.32, p.377–385, 2002.
- AMORINI, A.M.; PETZOLD, A.; TAVAZZI, B. et al. Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p.1001-1006, 2009.
- AROSIO, P.; LEVI, S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. **Free Radical and Biological Medicine**, v.33, p.457-462, 2002.
- AROSIO, P.; INGRASSIA, R.; CAVADINI, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.589-599, 2009.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. **Annals of Neurology**, v.61, p.504-513, 2007.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; SIMON, K. C. Vitamin D and Multiple Sclerosis. **The Lancet Neurology**, v.9, p.599-612, 2010.
- BALLA, G, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.18148-18153, 1992.
- BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews**, v.3, p.205-214, 2004.
- BASTOS, R. M. R. et al. Hiperuricemia: Um Marcador para Doença Renal Crônica Pré-Clínica?. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.31, p.32-38, 2009.
- BESLER, H.T.; COMOGLU, S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, p.189-196, 2003.
- CARTON, H., et al. Risk of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 62, p.329-333, 1997.
- CICCARELLI, Olga; THOMPSON, Alan. Managing the complexity of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v.12. 2016.
- COMPSTON, A., et al. McAlpine's multiple sclerosis. **Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier**; 2006.

CONFAVREUX, C., et al. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v.343, p. 1430-1438, 2000.

CONFAVREUX, C; VUKUSIC, S. The clinical, epidemiology of multiple sclerosis. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 18, p.589-622, 2008.

DA COSTA, R., et al. Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. **The Israel Medical Association Journal**, v.13, p.91–95, 2011.

DANILOV, A. I.; ANDERSSON, M.; BAYAND, N.; et al. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.136, p.112-118, 2003.

DE BUSTUS, F., et al. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. **European Neurology**, v.41, p.44-47, 1999.

DRWYER, M. G., et al. Associations between changes in ferritin levels and susceptibility-weighted imaging filtered phase in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis over 24 weeks of therapy with subcutaneous interferon beta-1a three times weekly. **Journal of Neuroimmunology**, v.281, p.44–50, 2015.

DYMENT, D. A.; SADOVNICK, D.; EBERS, G. C. Genetics of multiple sclerosis. **Human Molecular Genetics**, v.6, p.1693-1698, 1997.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v.65, p.899-910, 1894.

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

FRIEDMAN, J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? **Oxidative stress and free radical damage in Neurology**, v.1, p.19-21, New York: Humana Press, 2011.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v.40, p.959-975, 2001.

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

GOLDACRE, M. J., et al. Skin cancer in people with multiple sclerosis: a record linkage study. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v.58, p.142-144, 2004.

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

GRANIERI, E., et al. The increasing incidence and prevalence of MS in a Sardinian province. **Neurology**, v.55, p.842–848, 2000.

GRIGORIADISE, N; VAN PESCHB, V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **European Journal of Neurology**, v.22, p.3-13, 2015.

HAFLE, D. A, et al. Multiple sclerosis. **Immunology Review**, v. 204, 208-231. 2005.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97,p.1634–1658, 2006.

HAN, J., et al. L ferritin subunit mRNA expression differs in brains of control and iron-efficient rats. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2769–2774, 2002.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1275, p.161–203; 1996.

HÖFTBERGER, R., et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. **Brain Pathology**, v.14, p.43-50, 2004.

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

JELLIMNGER, K., et al. B. H. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Journal of Neural Transmission**, v.2, 327-340, 1990

KALLAUR, A. P., et al. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. **Molecular Medicine Reports**, v.7, p.1010-1020, 2013.

KALLAUR, A. P., et al. Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism is associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. **Journal of the Neurological Sciences**, v.346, p.156–163, 2014.

KALLAUR, A. P., et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. **Molecular Neurobiology**, 2015.

KALLAUR, A. P, et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. **Molecular Neurobiology**, p.1-14, 2016.

KANEDA, H.; TAGUCHI, J.; OGASAWARA, K. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis** v.162, p.221–225, 2002.

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

KAPPOS, L., et al. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide

ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. **Nature Medicine**, v.6, p.1176-1182, 2000.

KEMP, K., et al. Oxidative injury in multiple sclerosis cerebellar grey matter. **Brain Research**, v.1642, p.452–460, 2016.

KHALIL, M., et al. Cerebrospinal fluid transferrin levels are reduced in patients with early multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v.20, p.1569-1577, 2014.

KOCH, M.; MOSTERT, J.; ARUTJUNYAN, A.V. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**, v.14, p.529-533, 2007.

KRAKAUER, M.; SORENSEN, P.; KHADEMI, M. et al. Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. **Multiple Sclerosis**, v.14, p.622-630, 2008.

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

LASSMANN, H. Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 274, p. 45-47, 2008.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v.443, p.787-795, 2006.

LOZOVYOY, M. A. B., et al. Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.42, p.303-310, 2013.

LUBLIN, F. D.; REINGOLD, S.C. 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**, v.46, p.907–911, 1996.

LUBLIN, F.D., et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology** v.83, p.278–286. 2014.

LUCCHINETTI, C., et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. **Annals of Neurology**, v.47, p.707-717, 2000.

MANDEL, B. F. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.7, p.5-8, 2008.

MCDONALD, W. I.; COMPSTON, A.; EDAN, G. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v.50, p.121-127, 2001.

MEHLHASE, J., et al. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. **Free Radical Biology & Medicine**, v.38, p.276-285, 2005.

- MEHTA, V., et al. Iron Is a Sensitive Biomarker for Inflammation in Multiple Sclerosis Lesions. **Plos One**, 2013.
- MILLER, L.L., et al. Iron independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.4946-4950, 1991.
- MILLER, E., et al. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v.45, p.26-30, 2012.
- MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p.A387-A394, 2010.
- MUNGER, K. L.; ZHANG, S. M.; O'REILLY, E.; et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. **Neurology**, v.62, p.60-65, 2004.
- NAIDOO, R.; KNAPP, M. L. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. **Clinical Chemistry**, v. 38, n.12, p. 2449-2454, 1992.
- NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 679-681, 1998.
- NIELSEN, J.; UITDEHAAG, B. M.; POLMAN, C. H. Long-term follow-up of suspected though unconfirmed MS. **Multiple Sclerosis Journal**, v.14, p.985-987. 2008.
- OBERLE, S., et al. The Antioxidant Defense Protein Ferritin Is a Novel and Specific Target for Pentaerythryl Tetranitrate in Endothelial Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.261, p.28-34, 1999.
- OKSENBERG, J. R.; BARANZINI, S. E. Multiple sclerosis genetics – is the glass half full, or half empty? **Nature Reviews Neurology**, v.6, p.429-437. 2010.
- OLIVEIRA, S. R., et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. **Journal of the Neurological Sciences**, v.321, p.49–53, 2012.
- OLIVEIRA, S. R., et al. Immunopathological Mechanisms and Oxidative Stress Damage in Multiple Sclerosis. **Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases**. 1ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014 ,p.549-588.
- OLIVEIRA, S. R., et al. Albumin and Protein Oxidation are Predictors that Differentiate Relapsing-Remitting from Progressive Clinical Forms of Multiple Sclerosis. **Molecular Neurobiology**, p.1-8, 2016.
- PARADELA, E. R, et al. The *CIITA* genetic polymorphism rs4774\*C in combination with the *HLA-DRB1\*15:01* allele as a putative susceptibility factor to multiple sclerosis in Brazilian females. **Arquivos de Neurologia-Psiquiatria**, v.73, São Paulo, 2015.

- PATZOLD, A.; EIKELENBOOM, M. J.; GVERIC, D.; et al. Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. **Brain**, v.125, p.1462–1473, 2002.
- POSE, C. M; BRINAR, V. V. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. **Clinical Neurology And Neurosurgery**, v. 106, n. 3, p.147-158, jun. 2004.
- POLMAN, C.H.; REINGOLD, S. C.; BANWELL, B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurologic**, v.69 p.292-302, 2011.
- PRZYBEK, J., et al. Evolution of diagnostic criteria for multiple sclerosis. **Neurologia Neurochirurgia Polska**, v.49, p.313-321, 2015.
- REZNICK, A. Z.; PACCKER, L. Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v.233, p.357-363, 1994.
- REPETTO, M., et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin Chim Acta**, v. 255, p. 107-117, 1996.
- ROSATI, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: update. **Neurologic Science**. v.22, p.117-139, 2001.
- SALOU, M., et al. Involvement of CD8+ T Cells in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v.6, p.604, 2015.
- SALVADOR, G. A. Iron in neuronal function and dysfunction. **BioFactors**, v.36, p.103–110, 2010.
- SAMMARCO, M. C., et al. Ferritin L and H subunits are differentially regulated on a post-transcriptional level. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.283, p.4578–4587, 2008.
- SAWCER, S.; GOODFELLOW, P. N.; COMPSTON, A. The genetic analysis of multiple sclerosis. **Trends and Genetics**, v.13, p.234-239, 1997.
- STANKIEWICZ, J, et al. Iron in chronic brain disorders. **Imaging and Neurotherapeutics**, v. 4, p.371–386, 2007.
- STANKIEWICZ, J. M.; NEEMA, M.; CECCARELLI, A. Iron and multiple sclerosis. **Neurobiology of Aging**, v.35, p.51-58, 2014.
- STEINMAN, Lawrence. Multiple sclerosis: a two-stage disease. **Nature Immunology**, v.2, 2001.
- TINTORE´, M.; ROVIRA, A.; MARTINE´Z, M. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. **American Journal of Neuroradiology**, v.21, p.702-706. 2003.
- TONCEV, G., et al. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis increases serum uric acid levels. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 505-508, 2002.

VAN HORSSSEN, J., et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesion coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 1729-737, 2008.

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

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

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

ZAMBONI, P., et al. Intracranial venous haemodynamics in multiple sclerosis. **Current Neurovascular Research Journal**, v.4, p.252,258, 2007.

ZAMBONI, P., et al. Venous collateral circulation of the extracranial cerebrospinal outflow routes. **Current Neurovascular Research Journal**, v.6, p.204-212, 2009.

ZANDMAN-GODDARD, G.; SHOENFELD, Y. Ferritin in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v.6, p.457–463, 2007.

ZECCA, L., et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, p.863–873, 2004.

ZHAO, G., et al. Is hydrogen peroxide produced during iron (ii) oxidation in mammalian apoferritins? **Biochemistry**, v.40, p.10832-10838, 2001.

ZHAO, G.; AROSIO, P.; CHASTEEN, N. D. Iron(II) and hydrogen peroxide detoxification by human H-chain ferritin: an EPR spin-trapping study. **Biochemistry**, v.45, p.3429–3436; 2006.

WITKO-SARSAT, V., et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v.49, p.1304-1311, 1996.

WUCHERPFENNING, K. W., et al. Recognition of the Immunodominant Myelin Basic Protein Peptide by Autoantibodies and HLA-DR2-restricted T Cell Clones from Multiple Sclerosis Patients. **Journal of Clinical Investigation**, v.100, p.1114-1122, 1997.

## APÊNDICES

## 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      N° de surtos/ ano:		
RMN	N° 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:	

**ANEXOS**

## 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

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