



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEDA MEZZAROBA

**AVALIAÇÃO DOS METAIS ESSENCIAIS E
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

LEDA MEZZAROBA

**AVALIAÇÃO DOS METAIS ESSENCIAIS E
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Londrina
2019

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

Mezzaroba, Leda.

Avaliação dos metais essenciais e biomarcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla / Leda Mezzaroba. - Londrina, 2019. 133 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Inclui bibliografia.

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

LEDA MEZZAROBA

**AVALIAÇÃO DOS METAIS ESSENCIAIS E BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO
EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Andréa Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. José Wander Breganó
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Sayonara Rangel Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 03 de julho de 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus pela infindável força diante de caminhos às vezes tortuosos, mas que me levaram ao crescimento pessoal, familiar, profissional e de dedicação ao aprender e ensinar;

A meus pais, exemplos fundamentais em minha formação que, com amor e dignidade, sempre me acolheram nos momentos difíceis e ajudaram a percorrer meu caminho com honestidade, fé e trabalho;

À minha filha, Ana Luiza, o melhor pedaço de mim, razão de minha existência e de toda luta em busca de dias melhores, sempre ao meu lado com amor, carinho e atenção, pelo incentivo à realização deste trabalho;

À minha linda neta, Maria Beatriz, meu renascer, benção de Deus em nossas vidas, nosso mundo ficou melhor depois que você chegou;

À Professora Dra Edna Maria Vissoci Reiche pela amizade e orientação na realização deste trabalho;

À Professora Dra Andréa Name Colado Simão pela amizade e incentivo na realização deste trabalho;

À Profa Dra Sayonara Rangel Oliveira e colegas do Laboratório de Toxicologia pela amizade, pela ajuda nas análises e em todo decorrer deste trabalho;

A todos meu reconhecimento e minha gratidão.

Quando abro a porta de uma nova descoberta já encontro Deus lá dentro.

Einstein

MEZZAROBA, Leda. **Avaliação dos metais essenciais e biomarcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla.** 2019. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Introdução: O desequilíbrio entre moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias e oxidantes e antioxidantes tem sido implicado na desmielinização e dano axonal na esclerose múltipla (EM). Além disso, a quebra da homeostase de metais essenciais no sistema nervoso central (deficiência ou acúmulo) pode estar envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas.

Objetivos: Revisar o papel do zinco, cobre, manganês e ferro em doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e EM e avaliar os biomarcadores imunoinflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo (IO&NS) em pacientes com EM. **Sujeitos e Métodos:** Na revisão, utilizou-se a base de dados *PubMed/US National Library of Medicine/USA*, de 2008 a 2018. Realizou-se, também, um estudo caso-controle com 174 pacientes com EM e 182 controles. Os biomarcadores IO&NS analisados no plasma foram fator de necrose tumoral (TNF)- α , receptores solúveis de TNF (sTNFR)1 e (sTNFR)2, adiponectina, hidroperóxidos lipídicos, metabólitos de óxido nítrico (NOx), TRAP, grupamentos sulfidríla (SH) e níveis séricos de zinco. Na análise estatística empregou-se técnicas de estudo de aprendizagem por máquina e modelos matemáticos como *Support Vector Machine* (SVM), cálculo da área sob a curva ROC (AU/ROC) e testes de rede neural.

Resultados: Com a revisão, concluiu-se que a diminuição de zinco compromete a resposta imune inata e adaptativa e reduz sua capacidade antioxidante, enquanto que o aumento de íons cobre, manganês e ferro gera estresse oxidativo, injúrias permanentes, apoptose e morte celular. No estudo caso-controle, os resultados mostraram associação entre EM e o perfil oxidante/antioxidante e que o diagnóstico de EM exerceu forte efeito sobre os biomarcadores avaliados, explicando 68,2% da suas variâncias, com forte efeito nos níveis de adiponectina (45,1%), zinco (36,8%), TRAP (36,8%) e efeito moderados nos níveis do sTNFR2 (16,7%) e TNF- α (14,7%). Níveis aumentados de zinco foram associados com menor probabilidade de desenvolvimento de EM [*odds ratio* (OR): 0,102, $p=0,009$], bem como de adiponectina (OR: 0,011, $p=0,003$), TRAP (OR: 0,019, $p=0,002$) e grupos SH (OR: 0,223, $p=0,025$). Por outro lado, níveis elevados de sTNFR2 foram associados com maior probabilidade de desenvolvimento de EM (OR: 5,60, $p=0,016$). A combinação de zinco, adiponectina, TRAP, grupos SH e sTNFR2 formou o melhor modelo de biomarcadores para auxiliar no diagnóstico de EM ($p<0,001$), no qual 97,4% dos sujeitos foram corretamente classificados com sensibilidade de 98,7% especificidade de 91,7%. Os biomarcadores TRAP e adiponectina foram os mais importantes neste modelo, seguidos à distância pelo zinco e sTNFR2.

Conclusões: O equilíbrio dos níveis de zinco, cobre, manganês e ferro exerce papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC. Os resultados do estudo caso-controle ressaltaram que a EM é caracterizada por níveis elevados de oxidantes e diminuídos de antioxidantes e que a capacidade antioxidante total do plasma, adiponectina, zinco, grupos SH e sTNFR2 desempenham um papel importante na fisiopatologia da EM. A combinação destes biomarcadores constitui um modelo que pode ser incorporado no diagnóstico da EM, com alta sensibilidade, especificidade e acurácia, assim como as vias envolvidas com esses biomarcadores podem ser avaliadas como potenciais alvos para uma terapia individualizada de pacientes com EM.

Palavras-chaves: Esclerose múltipla. Inflamação. TNF- α . Receptores de TNF. Adiponectina. Zinco. Estresse oxidativo. *Support vector machine*.

MEZZAROBA, Leda. **Evaluation of essential metals and inflammatory biomarkers and of oxidative and nitrosative stress in patients with multiple sclerosis.** 2019. 132 p. Thesis (Doctorate degree in Health Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Introduction: The imbalance between inflammatory and anti-inflammatory molecules and antioxidants and antioxidants has been implicated in demyelination and axonal damage in multiple sclerosis (MS). In addition, essential metals dyshomeostasis (deficiency or accumulation) may be involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Objectives:** To review the role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and MS and to evaluate the immunoinflammatory biomarkers and oxidative and nitrosative stress (IO & NS) in MS patients. **Subjects and Methods:** In the review, the PubMed / US National Library of Medicine / USA database was used from 2008 to 2018. A case-control study was conducted with 174 patients with MS and 182 controls. Plasma necrosis factor (TNF) α , soluble receptors of TNF (sTNFR) 1 and (sTNFR) 2, adiponectin, lipid hydroperoxides, nitric oxide (NOx) metabolites, TRAP, sulfhydryl groups and serum zinc levels (Zn). In the statistical analysis, we used machine learning and mathematical models such as Support Vector Machine (SVM), area calculation under the ROC curve (AU / ROC) and neural network tests. **Conclusions:** The balance of zinc, copper, manganese and iron levels plays a key role in the maintenance of CNS homeostasis. The results of the case-control study emphasize that MS is characterized by elevated levels of oxidants and decreased antioxidants and that the total antioxidant capacity of plasma, adiponectin, zinc, SH groups and sTNFR2 play an important role in the pathophysiology of MS. The combination of these biomarkers is a model that can be incorporated into the diagnosis of MS with high sensitivity, specificity and accuracy, as well as the pathways involved with these biomarkers can be evaluated as potential targets for individualized therapy of MS patients.

Keywords: Multiple sclerosis. Inflammation. TNF- α . TNF receptors. Adiponectin. Zinc. Oxidative stress. Support vector machine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
ADIPO R1	Receptor 1 de adiponectina
ADIPO R2	Receptor 2 de adiponectina
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Monofosfato de adenosina quinase)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOPP	<i>Advanced oxidatin protein products</i> (Produtos avançados de oxidação proteica)
APN HMW	<i>High molecular weight adiponectin</i> (Adiponectina de alto peso molecular)
APN LMW	<i>Low molecular weight adiponectin</i> (Adiponectina de baixo peso molecular)
AUC/ROC	<i>Area under the ROC curve</i> (Área sob a curva ROC)
BHE	Barreira hematoencefálica
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAT	Catalase
CCL	<i>Chemokine C ligant</i> (Ligante de quimiocina C)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEPE	Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos
CIS	<i>Clinicaly isolated syndrome</i> (Síndrome clinicamente isolada)
CL-LOOH	<i>T-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i> (quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido)
CTL	Linfócitos T citóxicos
CXCL	Ligante de quimiocina CXC
DA	Doença de Alzheimer
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
DP	Doença de Parkinson
EAE	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i> (Encefalomielite Experimental Autoimune)
EBV	Vírus Epstein Barr

EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (Escala Expandida do Estado de Incapacidade)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
EO&N	Estresse oxidativo e nitrosativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
fAPN	Adiponectina de comprimento completo
FDA	<i>Food and Drugs Administration/United States of America</i>
gAPN	Adiponectina globular
Gd	Gadolínio
GLM	<i>Generalized linear model</i> (Modelo linear geral)
Glu	Glutamato
GSH	Glutationa
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i> (Glutationa peroxidase)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC	<i>Healthy Controls</i> (Controles saudáveis)
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IO&NS	<i>Inflammatory, anti-inflammatory, oxidative and nitrosative stress</i> (Inflamatório, anti-inflamatório e do estresse oxidativo e nitrosativo)
LAC	Laboratório de Análises Clínicas

LB	Linfócitos B
LBreg	Linfócitos B reguladores
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated antigen 1</i> (Antígeno 1 associado à função leucocitária)
LIF	Fator inibidor da leucemia
Ln	Transformações logarítmicas
LT	Linfócitos T
LTCD4+	Linfócitos CD4 ativados
LTh	Linfócitos T <i>helper</i>
LT naïves	Linfócitos T virgens
LTreg	Linfócitos T reguladores
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i> (Glicoproteína associada com a mielina)
MeSH	<i>Medical subjects headings</i> (Títulos de assuntos médicos)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
miRNA	MicroRNA
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (Metaloproteinase de matriz)
MOG	<i>Myelin-oligodendrocyte glycoprotein</i> (Glicoproteína de oligodendrócito associada com a mielina)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato oxidase
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (fator de crescimento neural)
NFkB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
NK	<i>Natural killer cell</i> (Células matadoras naturais)
NfL	Neurônios com filamentos leves
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOx	<i>Nitric oxide metabolites</i> (Metabólitos do óxido nítrico)
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> - fator nuclear eritróide 2- fator relacionado 2
OH	Hidroxila

OPC	<i>Oligodendrocyte progenitor cells</i> (Células precursoras de oligodendrócitos)
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
PBM	Proteína Básica da Mielina
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes de Tratamento
PCR	Proteína C Reativa
PKB	Proteína quinase B
PLP	Proteína lipoproteica
QL	Quimioluminescência
RL	Radicais livres
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de operação do receptor)
S1P	Receptor da esfingosina-1-fosfato
SH	Grupos sulfidríla
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SMV	<i>Support Vector Machine</i>
sTNFR1	Receptor solúvel do TNF tipo 1
sTNFR2	Receptor solúvel do TNF tipo 2
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> (capacidade antioxidante equivalente ao trolox)
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
TNF- β	<i>Tumor necrosis factor β</i> (Fator de necrose tumoral beta)
TNF sol	<i>Soluble tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral solúvel)
TNF tm	<i>Transmembrane tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral transmembrana)
TRAP	<i>Total-Radical Trapping Antioxidant Parameter</i> (Potencial antioxidante total)

VLA-4	<i>Very late activation antigen 4</i> (Antígenos 4 de ativação muito tardia)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
URL	Unidades relativas de luz
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão celular vascular 1)
Vírus JC	Vírus John Cunningham

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epidemiologia da Esclerose Múltipla.....	16
1.2	Formas Clínicas da Esclerose Múltipla.....	17
1.3	Diagnóstico da Esclerose Múltipla.....	19
1.4	Etiologia e Imunopatogenia da Esclerose Múltipla.....	21
1.4.1	TNF- α , receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 e esclerose múltipla	25
1.4.2	Estresse oxidativo e nitrosativo e esclerose múltipla	27
1.4.3	Zinco e esclerose múltipla.....	33
1.4.4	Adiponectina e esclerose múltipla.....	35
1.5	Tratamento de pacientes com Esclerose Múltipla.....	37
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo Geral	44
3.2	Objetivos Específicos	44
4	SUJEITOS E MÉTODOS	45
5	RESULTADOS	51
5.1	Artigo 1: <i>The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases</i>	52
5.2	Artigo 2: <i>Antioxidant and anti-inflammatory diagnostic biomarkers in multiple sclerosis: a machine learning study</i>	85
6	CONCLUSÕES	116
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
	REFERÊNCIAS	119

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	130
APÊNDICE B: Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos.....	132

ANEXOS

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL	13
--	----

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que, muitas vezes, se apresenta como uma condição complexa, incapacitante e com evolução imprevisível (MSIF, 2018; YOUSEFIAN *et al.*, 2018). A EM é caracterizada por um alto grau de heterogeneidade nas características clínicas radiológicas, patológicas e de resposta à terapia. É mais comum em caucasianos, mulheres (em taxas que variam de 2:1 ou 3:1, provavelmente relacionadas aos hormônios femininos) e adultos jovens (em especial, na faixa de 20 a 40 anos). As áreas de lesões e desmielinização ocorrem, predominantemente, nas regiões de substância branca cerebral e levam a manifestações clínicas heterogêneas e déficits funcionais decorrentes de lesões de qualquer parte do neuroeixo (SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Os sintomas mais observados são neurite ótica, paresia ou parestesia de membros, descoordenação motora, falta de equilíbrio, mielites, disfunções esfínterianas e disfunções cognitivo-comportamentais, de forma isolada ou em combinação. Após o diagnóstico, a incapacidade clínica de pacientes com EM é avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Status Scale* - EDSS) que avalia oito áreas do SNC conhecidas como sistemas funcionais (funções piramidais, tronco cerebral, cerebelar, sensoriais, intestinais, vesicais, cerebrais e visuais) (KURTZKE, 1983). A EDSS compreende vinte itens com escores que variam de 0 a 10, com pontuação que aumenta meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente. Uma incapacidade discreta é representada por valores de EDSS menores que 3,0 enquanto valores entre 6,0 e 8,0 descrevem pacientes com relevante incapacidade (KURTZKE, 1983). A progressão da incapacidade é definida pelo aumento de pelo menos 1 ponto na EDSS ou um aumento de 0,5 ponto se a EDSS basal for maior ou igual a 5,5 (BRASIL, 2018).

A pesquisa de biomarcadores na EM tem sido muito intensa, com o objetivo de identificar biomarcadores que possam contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia da doença, auxiliar no diagnóstico e prognóstico, assim como prever o resultado da resposta à terapia e desenvolver novos medicamentos para o tratamento dos pacientes. No entanto, até o presente momento, não existe um marcador laboratorial específico para o diagnóstico da EM, apesar do grande número de candidatos biomarcadores moleculares propostos (COMABELLA; MONTALBAN, 2014).

1.1 Epidemiologia da Esclerose Múltipla

Estima-se que existam cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo com EM (NIH, 2018); porém, a doença é mais comum em latitudes setentrionais, refletindo provável associação com a menor exposição da população à luz solar e com deficiência de vitamina D (MONTI *et al.*, 2016).

Segundo Leray *et al.* (2016), a EM é a doença desmielinizante mais comum observada em países de alta renda, mantendo sempre uma heterogeneidade de sua prevalência em todo o mundo: é mais alta na América do Norte (140/100.000 habitantes) e Europa (108/100.000 habitantes) e menor na Ásia Oriental (2,2/100.000 habitantes) e na África Subsaariana (2,1/100.000 habitantes). É provável que estes dados estejam subestimados dada a relativa falta de registros de grandes populações, incluindo a Índia e a China (THOMPSON *et al.*, 2018). Na Europa, em particular, um gradiente de prevalência Norte-Sul tem sido descrito para distribuição da doença, sendo maior no Norte e menor no Sul (LERAY *et al.*, 2016).

A América Latina e Caribe são consideradas regiões de baixa e média prevalências com, aproximadamente, 5,0 a 38,5 casos por 100.000 habitantes (CRISTIANO; ROJAS, 2017). A prevalência da EM na Argentina, considerado um país de risco médio para a EM, é estimada em 18,0 casos por 100.000 habitantes, o que é seis vezes mais alta o que a prevalência registrada no Equador, um país com risco baixo para EM (EVANS *et al.*, 2013).

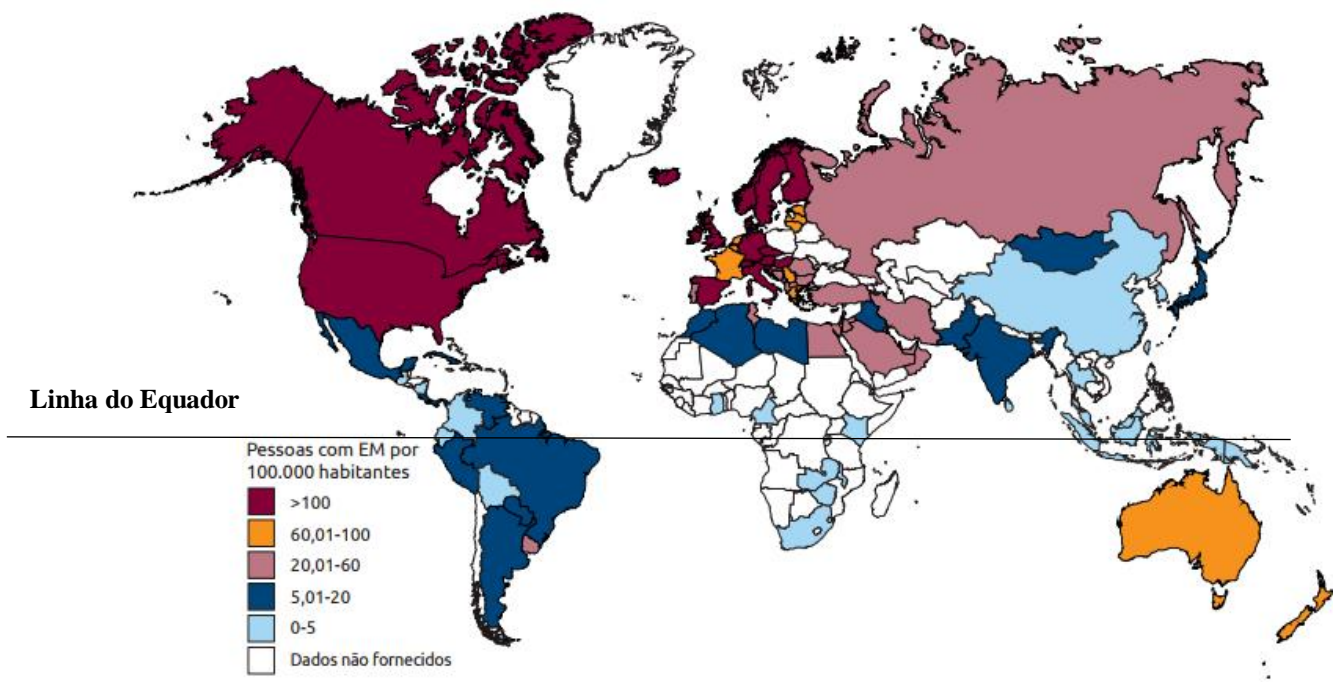
No Brasil, de acordo com uma revisão sistemática publicada por Pereira *et al.* (2015), a prevalência média encontrada foi de 8,69 casos em 100.000 habitantes. O primeiro estudo, na cidade de São Paulo, apresentou uma taxa de prevalência de 4,3 casos por 100.000 habitantes (CALLEGARO *et al.*, 1992). Posteriormente, uma reavaliação da epidemiologia de EM mostrou taxa de prevalência de 15,0 casos por 100.000 habitantes (CALLEGARO *et al.*, 2001). Outra investigação de prevalência, realizada em Botucatu, São Paulo, revelou uma taxa de prevalência de 17 casos por 100.000 habitantes (ROCHA *et al.*, 2002). No Estado de Minas Gerais, 2 outros estudos foram realizados e a taxa de prevalência foi de 12,5 casos por 100.000 habitantes em Uberaba (RIBEIRO, 2011) e de 18,2 casos por 100.000 habitantes em Belo Horizonte (LANA-PEIXOTO *et al.*, 2012). Em Santa Maria, Rio Grande do Sul, encontra-se a maior prevalência da EM no Brasil, de 27,2 casos por 100.000 habitantes (FINKELSZTEJN *et al.*, 2014).

Devido a aspectos geográficos, demográficos e históricos de cada região, observou-se uma grande variabilidade entre os valores máximos e mínimos, que oscilaram entre 27,2 casos em 100.000 habitantes na região Sul e 1,36 casos em 100.000 habitantes na região Nordeste.

Possivelmente esses resultados estejam associados à maior incidência solar em regiões mais próximas à linha do Equador, como os estados da região Nordeste do Brasil, fator que favorece a síntese de vitamina D (BRASIL, 2018). Em Londrina, cidade no norte do estado do Paraná, região sul do Brasil, embora não existam dados oficiais, estima-se que a prevalência atual seja de 12 a 15 casos por 100.00 habitantes (KAIMEN-MACIEL; MEDEIROS, 2003).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, 35 mil brasileiros convivem com a EM e, destes, 15 mil estão em tratamento pelo Sistema Único de Saúde e, para efeitos de projeções de políticas de saúde, a média de prevalência brasileira é de 15 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2018). A **Figura 1**, a seguir, mostra a prevalência mundial da EM em 2013, segundo a *Multiple Sclerosis International Federation* (MISF, 2019).

Figura 1 Prevalência mundial da esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de *Multiple Sclerosis International Federation* (2013).

1.2 Formas Clínicas da Esclerose Múltipla

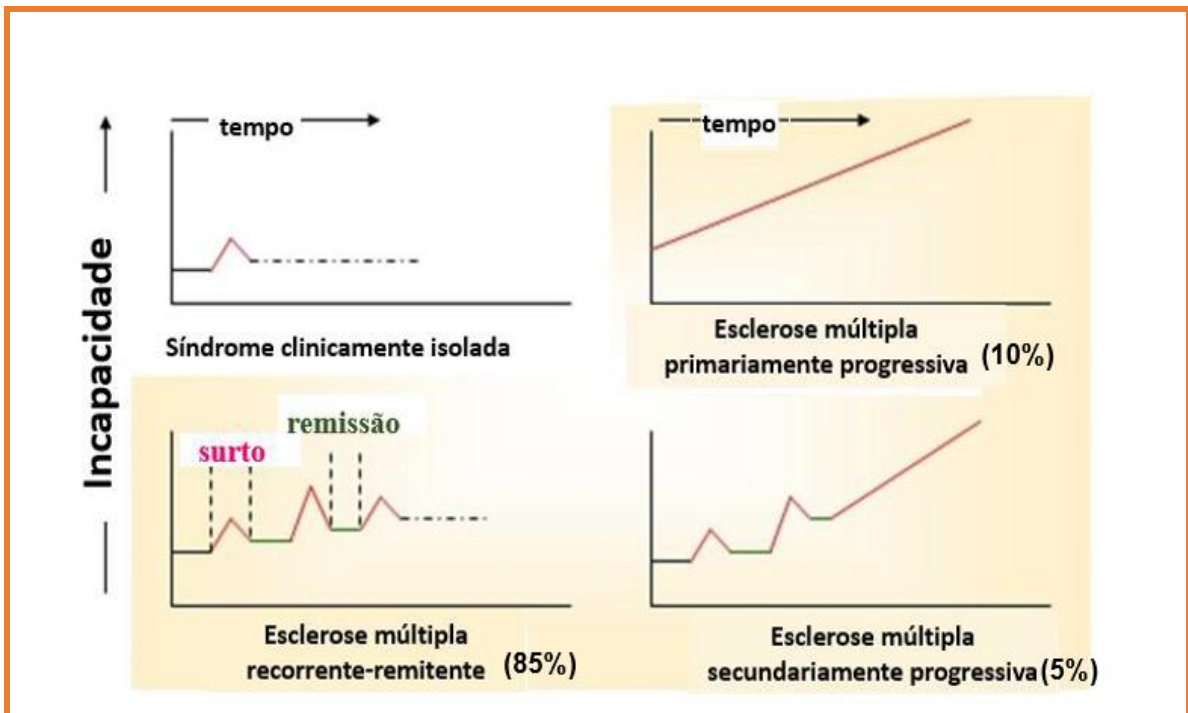
Ainda é muito difícil prever a progressão clínica da EM. Esta dificuldade reflete a grande heterogeneidade da doença do ponto de vista clínico e, atualmente, não existem biomarcadores laboratoriais ou de imagem que permitam caracterizar, com rigor, a forma clínica de evolução dos pacientes (DOMINGUES *et al.*, 2017; THOMPSON *et al.*, 2018).

De acordo com a classificação recentemente revisada do curso clínico da EM, há quatro fenótipos principais que incluem a Síndrome Clinicamente Isolada (CIS), EM remitente-recorrente (EMRR), EM secundariamente progressiva (EMSP) e EM primariamente progressiva (EMPP) (THOMPSON *et al.*, 2018). A forma CIS é definida como uma manifestação clínica causada por inflamação no SNC que pode ser o primeiro episódio neurológico do indivíduo, causado por inflamação ou desmielinização do tecido nervoso (THOMPSON *et al.*, 2018). Esta condição pode ser, também, a primeira manifestação de outras condições como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a doença de Behçet. Entretanto, mais comumente, a CIS é a primeira manifestação da EM, sendo seus sintomas, portanto, um surto de EM. A CIS tem os mesmos sintomas de um surto de EM como alterações visuais (visão turva ou dupla), adormecimento na face, braços ou pernas, tontura e alterações do equilíbrio, diminuição da força ou coordenação, e incontinência urinária. Estes sintomas podem aparecer isolados ou em combinação, e geralmente se instalam de forma gradual ao longo de alguns dias. Dois terços dos pacientes que apresentam a forma CIS poderão evoluir para a forma de EMRR (BROWNLEE; MILLER, 2014; BROWNLEE *et al.*, 2017; THOMPSON *et al.*, 2018).

A EMRR é a forma mais frequente da doença e representa, aproximadamente, 80% de todos os casos no início da doença. É caracterizada pela exacerbação dos sintomas neurológicos, com a presença de surtos bem definidos ou ataques imprevisíveis (chamados recaídas). Novos sintomas aparecem ou os sintomas existentes se tornam mais graves, com posterior recuperação parcial ou completa dos sintomas e ausência de progressão entre os episódios (THOMPSON *et al.*, 2018). As recaídas podem durar por períodos variados (dias ou meses), a recuperação pode ser parcial ou total (remissão) e a doença pode, então, ficar inativa por meses ou anos. A forma EMSP é uma evolução natural da EMRR em 30 a 40% dos casos após 10 anos do diagnóstico, em média. Nesta forma clínica, constata-se uma deterioração contínua das funções neurológicas e constitui, cerca de, 15 a 20% de todas as formas de EM num dado momento. Aproximadamente 10% dos pacientes com EM são diagnosticados com a forma EMPP e apresentam-se com o curso progressivo desde o início do aparecimento dos sintomas e evoluem de forma lenta e estável, sem surtos aparentes (THOMPSON *et al.*, 2018).

A **Figura 2** ilustra as formas clínicas da EM em relação à progressão da incapacidade *versus* tempo.

Figura 2 Progressão da doença para síndrome clinicamente isolada e tipos de esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de *Systems Biology Verifications* (2019)

1.3 Diagnóstico da Esclerose Múltipla

O diagnóstico de EM é possível somente após a confirmação da existência de lesões no cérebro pela ressonância magnética nuclear (RMN), o que normalmente acontece após o acometimento de diversas regiões cerebrais (no curso de eventos geralmente múltiplos). Surtos de sintomas neurológicos, que ocorrem em questão de horas a dias, seguidos por períodos de remissão completa ou parcial, em momentos e localizações variadas caracterizam a EMRR. Esta definição apresenta os três elementos essenciais para o diagnóstico da EM: a) disseminação espacial: os surtos clínicos expressam episódios inflamatórios agudos que acontecem em áreas diversas do SNC; b) disseminação temporal: estes episódios acontecem em momentos distintos na história da doença; e, c) a necessidade de um diagnóstico diferencial cuidadoso e sistemático, que afaste outros diagnósticos alternativos (BRASIL, 2018).

A aplicação destes critérios, que se baseava exclusivamente em sinais e sintomas e exigia, pelo menos, dois surtos clínicos para sua confirmação, foi impactada nos anos 90, por dois fatores. Primeiro, o advento das drogas imunomoduladoras, com propriedades

modificadoras da doença, que passaram a exigir um diagnóstico o mais precoce possível e, segundo, o desenvolvimento da RMN que permitiu, pela primeira vez, a visualização objetiva e *in vivo* das lesões agudas e crônicas, causadas pela doença, mesmo aquelas sem expressão clínica (FIGUEIRA; FIGUEIRA, 2012).

Uma consequência destes avanços tecnológicos foi a inclusão, a partir de 2001, das informações obtidas a partir da RMN nos critérios diagnósticos, para estabelecer a disseminação temporal e espacial mencionadas previamente e assim, juntamente com os dados do exame clínico, possibilitar o diagnóstico da EM já a partir do primeiro evento agudo. Estes critérios vêm sendo sucessivamente revistos a cada cinco anos, como forma de torná-los mais sensíveis, identificando novos pacientes sem perder a especificidade, ou seja, o risco de incluir indivíduos com um falso diagnóstico de EM.

Independente da metodologia empregada, sejam aquelas dos critérios originais de McDonald (2001), ou de suas revisões de 2005, 2010 e 2017 (THOMPSON *et al.*, 2018), é fundamental a correta interpretação do quadro clínico e da RMN. O aspecto de RMN da lesão aguda na EM correlaciona-se com o mecanismo da doença: um processo inflamatório em torno de um vaso sanguíneo, permitindo o aumento da passagem de fluidos dos vasos e consequente captação do contraste gadolínio (Gd). Obedecendo a anatomia, estas lesões guardam uma conformação ovóide, com seu maior eixo orientado perpendicularmente aos ventrículos laterais, bem peculiares. Em cerca de 10 a 15 dias, estas lesões agudas evoluem, desaparece a captação do contraste Gd, deixando cicatrizes (escleroses), sinais que guardam as mesmas características da lesão aguda que as originou, ou seja, ovaladas e em torno dos ventrículos laterais (FIGUEIRA; FIGUEIRA, 2012).

De acordo com os critérios revisados (THOMPSON *et al.*, 2018), com base nos achados da RMN, a EM pode ser diagnosticada após um único evento clínico, o que significa um confronto muito precoce de pacientes com uma doença crônica subclínica possivelmente não curável. É inegável que, usando esses critérios mais sensíveis, as taxas de conversão para EM clinicamente definida podem ser menores do que aquelas baseadas em critérios mais antigos. A precisão do diagnóstico, ou seja, a sensibilidade e especificidade da RMN, no entanto, permanece metodologicamente insatisfatória, no sentido de confirmar a EM com base em um único ataque de disfunção neurológica, o que pode levar ao excesso de diagnóstico e ao tratamento excessivo (BRAND *et al.*, 2014).

A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) também tem sido empregada para avaliação diagnóstica da EM e exclusão dos diagnósticos diferenciais. Os achados clássicos refletem a natureza inflamatória da doença, incluindo discreta pleocitose, leve

hiperproteínoorraquia, aumento da síntese intratecal de imunoglobulina G e, mais tipicamente, a presença de duas bandas proteicas oligoclonais no LCR (e não no soro). Mais recentemente, os biomarcadores estudados no LCR são citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-6, proteínas como a fetuína-A (alfa-2-HS-glicoproteína), fatores quimiotáticos como o ligante 13 de quimiocina CC (CXCL13) e componentes do citoesqueleto axonal dos neurônios como os neurofilamentos leves (NfL). Níveis elevados de NfL no LCR refletem lesão neuronal e, potencialmente, degeneração axonal, e estão associados com um escore maior de gravidade da EM, além de maior risco de conversão de EMRR para EMSP (DOMINGUES *et al.*, 2017).

1.4 Etiologia e Imunopatologia da Esclerose Múltipla

A EM representa, há décadas, um grande desafio para a investigação básica e clínica e os avanços terapêuticos requerem uma melhor compreensão da sua patogenia e, em especial, de sua imunopatogenia.

A causa específica da EM permanece desconhecida, mas sabe-se que envolve a interação de fatores genéticos, hormonais, epigenéticos e ambientais. A variação gênica é responsável por, aproximadamente, 30% do risco global de EM, com mais de 100 variantes genéticas consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento da EM. A maioria dessas variantes está localizada no cromossomo 6, na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), tais como os genes *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*), incluindo variantes nos alelos *HLA-DRB1*15:01*, *HLA-DRB1*0301* e *HLA-DRB1*1303* expressos nas células da resposta imune inata (BEECHAM *et al.*, 2013; SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Entre os fatores ambientais, os mais frequentes incluem o tabagismo, obesidade, dislipidemia, latitude geográfica (em geral a exposição ao sol e raios ultravioleta B tendem a diminuir com o aumento da latitude), deficiência de vitamina D e infecções bacterianas e virais (REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018). Patógenos associados com o desenvolvimento ou exacerbação da EM incluem bactérias como *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* produtores de enteroxinas que funcionam como superantígenos, assim como infecções virais pelo *Vírus Epstein Barr* (EBV), *Herpesvirus Humano tipo 6* e a família dos retrovírus endógenos humano. A presença dos microrganismos, por si só, não causaria a doença, uma vez que são patógenos amplamente distribuídos no ambiente e infectam praticamente todos os seres humanos em algum momento da vida. No entanto, os microrganismos podem atuar como gatilhos na indução da autoimunidade, resultando na

manifestação da doença em indivíduos geneticamente predispostos (MARRODAN *et al.*, 2019).

Existem vários mecanismos que buscam explicar a imunopatologia da EM: a) a presença de uma infecção viral persistente; b) um processo autoimune com perda da tolerância para os antígenos proteicos da mielina; e c) a mimetização molecular entre antígenos virais e proteínas da mielina. As lesões na EM podem começar com uma reação imune celular mediada por células T ativadas por algum evento ambiental, por exemplo, uma infecção viral fora do SNC, no sangue periférico e nos gânglios linfáticos. Além disso, alguns componentes proteicos da mielina, como a proteína básica da mielina (PBM), a proteína lipoproteica (PLP), a glicoproteína de oligodendrócito associada à mielina (MOG) e a glicoproteína associada à mielina (MAG), são considerados como autoantígenos responsáveis pela resposta autoimune observada na EM e têm sido reconhecidos como importantes na indução de células T autorreativas e de autoanticorpos (SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Desta forma, linfócitos T (LT) ativados apresentam uma expansão clonal, produzem diferentes citocinas e incrementam a expressão de selectinas, integrinas e outras moléculas de adesão em sua superfície, que facilitam a entrada dos LT no SNC. Exemplos destas moléculas de adesão incluem moléculas de adesão celular vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule 1* - VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1* - ICAM-1) (preferencialmente em células endoteliais) e integrinas como o antígeno 4 de ativação muito tardia (*very late activation antigen 4* (VLA-4) e o antígeno 1 associado à função leucocitária (*lymphocyte function associated antigen 1* (LFA-1). Essas moléculas se mostraram, no mínimo de 1,5 a 3 vezes mais expressas em pacientes com EMRR e EMSP (KAWAMOTO *et al.*, 2012).

As metaloproteinases de matriz (MMP), também, contribuem para a passagem de células inflamatórias para o SNC e ao desenvolvimento dos processos inflamatórios observados na EM, por diferentes ações, tais com a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), facilitando a passagem de LT e monócitos, e a clivagem de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e dano direto da bainha da mielina. No cérebro, os infiltrados perivasculares de células T autorreativas reconhecem e reagem contra autoantígenos, incluindo MBP, PLP, MOG e MAG. Os LT reconhecem o antígeno específico unido às moléculas do MHC presentes nos astrócitos e na micróglia e são, desta maneira, reativados (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Este fenômeno de reativação implica na produção de diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas, prostaglandinas, espécies reativas e oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (KAIMEN-MACIEL, 2016).

Durante os estágios iniciais da EM, a inflamação está associada à ruptura da BHE, com a passagem de células inflamatórias da circulação para o SNC da circulação. Ao contrário, nas fases progressivas, a inflamação é frequentemente vista em torno de vasos com a BHE intacta. Isso sugere que, com a cronicidade da doença, o processo inflamatório torna-se, pelo menos em parte, restrito ao compartimento do SNC. Nas meninges isso pode levar à formação de grandes agregados inflamatórios que mostram características estruturais dos folículos linfáticos secundários. Quando presentes, tais folículos meníngeos estão associados particularmente à desmielinização cortical grave e agressiva e lesão tecidual (SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Após a ativação por diferentes citocinas, linfócitos T *helper* naïves (Th0) se diferenciam em diferentes subpopulações como Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg), cada qual com a produção de um perfil de citocinas envolvidas na resposta imune observada na EM. Os LTh1 e seus produtos pró-inflamatórios, como IL-2, TNF- α e interferon (IFN)- γ , podem iniciar e perpetuar danos axonais (lesões mais precoces) e a desmielinização na EM, pela ativação da resposta citotóxica e humoral. Já os LTh1 citotóxicos exercerão citotoxicidade direta na bainha de mielina, enquanto que a imunidade humoral, mediada por linfócitos B (LB), produzirá anticorpos contra componentes da mielina, que ativam as proteínas do sistema complemento, contribuindo para a lesão da bainha de mielina (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Células Th2, por sua vez, secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e são associadas com inibição da resposta imune Th1. As citocinas e seus receptores são importantes na evolução das lesões de EM, e os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias são correlacionados com as mudanças na atividade da doença. As citocinas IL-10 e IL-4, que regulam negativamente as células Th1 e exercem funções anti-inflamatórias, mostram-se aumentadas durante as fases de remissão da EM (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Células Th17, por sua vez, constituem um subconjunto de células T que secretam a IL-17 (PERON *et al.*, 2010). A partir de 2003, a resposta final para o tradicional paradigma Th1/Th2 foi obtida quando, usando o modelo EAE, uma nova população de células Th17 que secretam quantidades elevadas das citocinas IL-17A, IL-17F e IL-21 foram consideradas os principais agentes na patogênese da EM (LI *et al.*, 2017). As células Th17 contribuem para degradação da BHE, induzem a infiltração de células imunes no compartimento do SNC, amplificam respostas inflamatórias e geram mediadores citotóxicos que resultam em desmielinização e dano neuronal (KOLBINGER *et al.*, 2016). As células Treg desenvolvem um importante papel imunoregulador das células T autorreativas pela produção das citocinas

imunossupressoras IL-10 e fator de transformação do crescimento (TGF)- β . Estudos relataram que pacientes com EM apresentaram significativa redução do número e da função das células Treg examinadas no sangue periférico em relação a indivíduos controles (VIGLIETTA *et al.*, 2004; HAAS *et al.*, 2005). Portanto, a desregulação aguda do equilíbrio de citocinas é um dos fatores-chave durante a recaída, levando a lesões inflamatórias agudas em pacientes com EM (WANG, 2018).

Historicamente, danos ao SNC eram predominantemente mediados por LT pró-inflamatórios ativados e o envolvimento de LB na patogênese da EM era atribuído exclusivamente à produção de autoanticorpos (LI *et al.*, 2017; STAUN-RAM; MILLER, 2017; DOBSON; GIOVANNONI, 2019). As primeiras pistas para o envolvimento de funções de LB independentes de anticorpos surgiram de resultados positivos em ensaios clínicos com rituximabe para a depleção de LB. LB expressam vários marcadores característicos (*cluster of differentiation*, CD) em sua superfície, como moléculas CD19 e CD20, que fornecem alvos seletivos para anticorpos monoclonais. Como consequência, várias terapias surgiram incluindo anticorpos monoclonal anti-CD20 (rituximabe, ocrelizumabe e fatumumabe) e anticorpos anti-CD19 (nebilizumabe) (RAHMANZADEH *et al.*, 2018).

LB podem estar envolvidos na EM por mecanismos diferentes, como apresentação de antígenos às células T, transporte de antígenos de órgãos linfóides secundários, secreção de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias e, em um subgrupo de pacientes, também com a produção de anticorpos autoimunes patogênicos (SOSPEDRA; MARTIN, 2016). Os infiltrados de células T e B correlacionaram-se com a atividade das lesões desmielinizantes (FRISCHER *et al.*, 2009).

Modelos experimentais comprovaram a existência de células com capacidade imunomoduladora no *pool* de LB que, em um ambiente cronicamente inflamado, se diferenciam em um fenótipo com alta expressão de antígeno CD1d, capacidade de produção de IL-10 e habilidade para suprimir a resposta inflamatória, chamados de LB reguladores (LBreg). Os LBreg dependem de interação antigênica e estimulação via moléculas de CD40L e B7 mas, uma vez ativados, produzem IL-10 e TGF- β suprimindo a ativação e diferenciação de LTh1 CD4⁺, CD8⁺ e células natural *killer* (NK), inibem a ativação de células dendríticas e estimulam a diferenciação de LTreg. Mediante contato dos LBreg com LT virgens (LT *naïves*), há inibição da ativação do LT e da diferenciação em linfócitos Th1 (MESQUITA JUNIOR, *et al.*, 2010).

1.4.1 TNF- α , receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 e esclerose múltipla

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica responsável por sinalizações essenciais para o sistema imune e que pode ser fortemente induzida após infecções ou outros danos celulares. A identificação de vias de sinalização distintas induzidas por TNF- α , homeostáticas ou patogênicas, introduziu o conceito de inibir seletivamente os efeitos prejudiciais do TNF- α e preservar suas atividades homeostáticas para fins terapêuticos (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

Os efeitos do TNF- α são mediados via ligação aos seus receptores de membrana TNFR1 (CD120a) e TNFR2 (CD120b). A ampla gama de funções do TNF- α pode ser explicada pela presença destes receptores em quase todos os tipos de células. O TNFR1 é encontrado na maioria das células e, por meio dele, ocorre a maioria dos efeitos pró-inflamatórios do TNF- α ; o TNFR2 é encontrado, principalmente, em células endoteliais vasculares, neurônios e células imunes e tem papéis pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Deste modo, a ligação do TNF- α ao TNFR1 promove, em especial, inflamação, proliferação celular e degeneração tecidual, enquanto que a ligação desta citocina com o TNFR2 promove regeneração celular e tecidual (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

A ligação do TNF- α ao TNFR1 pode induzir inflamação e neurodegeneração na EM pela ativação de duas vias principais de sinalização, a do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e de caspases. A ativação mediada por TNF solúvel (TNFsol) pela via de sinalização NF- κ B pode induzir, nas células da glia, em particular a micróglia e os astrócitos, a transcrição de genes que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e o próprio TNF- α , resultando em um ciclo de amplificação da sinalização pró-inflamatória do TNF- α (FISCHER; MAIER, 2015).

Enquanto os efeitos pró-inflamatórios e neurodegenerativos do TNF- α são mediados pelo TNFsol e, portanto, pelo TNFR1, a sinalização via TNF transmembrana (TNFtm) que ocorre predominantemente via TNFR2 é principalmente neuroprotetora e favorece a homeostase tecidual. A regeneração e a sinalização TNF/TNFR2 pode ocorrer pelas vias de ativação da proteína kinase B e NF- κ B (PROBERT, 2015). Alguns efeitos protetores e regenerativos da ativação do TNFR2 poderiam ser explicados pelo fato deste receptor promover a liberação de fatores anti-inflamatórios e neurotróficos dos astrócitos e micróglia. Em particular, os fatores derivados de astrócitos, ou seja, a quimiocina CXCL12 e o fator inibidor da leucemia (LIF), promovem a diferenciação de oligodendrócitos e podem, assim, favorecer a remielinização (PATEL *et al.*, 2012).

Em comparação com outras populações de células T, o TNFR2 é predominantemente expresso por células Treg que são importantes na regulação e supressão das funções efetoras das células Th1 e Th17. O TNFR2 é expresso especialmente em um subgrupo Treg com máximo efeito supressor (Treg FoxP3⁺CD4⁺ CD25⁺) e a ativação do TNFR2 é importante para a proliferação e função destas células, indicando um papel importante do TNFR2 na regulação e supressão da resposta imune (FISCHER; KONTERMANN; MAIER, 2015). Por outro lado, um estudo mostrou que o TNFR2 tem função dicotômica e que o TNFR2 expresso em macrófagos e monócitos periféricos dirige a ativação imune via ativação de células T e desencadeia a transmigração de leucócitos através da BHE, enquanto o TNFR2 da micróglia fornece sinais de proteção promovendo vias anti-inflamatórias (GAO *et al.*, 2017).

A EM frequentemente apresenta déficits de memória e foi demonstrado que a sinalização TNF/TNFR1 nos astrócitos é responsável por esses distúrbios cognitivos (HABBAS, 2015). Junto aos efeitos neurodegenerativos indiretos do TNF- α , promovendo a neuroinflamação e o estresse oxidativo mediados pelas células da glia, estudos *in vitro* mostraram que o TNF- α , via TNFR1, também pode mediar a apoptose direta dos neurônios pela ativação da caspase 8 (BADIOLA *et al.*, 2009). Níveis elevados de TNF- α e caspase 8 ativada em modelos de lesão medular apoiam ainda mais a noção de morte celular neuronal direta mediada por TNF- α *in vivo* (CHEN *et al.*, 2011).

As formas solúveis destes receptores, sTNFR1 e sTNFR2, são produzidas após a clivagem dos mesmos da superfície celular pela ação da enzima conversora de TNF- α , conhecida como desintegrina ou metaloproteinase 17 (ARROYO *et al.*, 2017). TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2 podem ser mensurados em amostras de plasma, soro, LCR e em lesões dos pacientes com EM. Estudos prévios têm mostrado níveis elevados de TNF- α no soro de pacientes com EM quando comparados aos controles (ALATAB *et al.*, 2011; KALLAUR *et al.*, 2017a), assim como níveis séricos e líquóricos destes biomarcadores foram correlacionados com a atividade da doença (HAUSER *et al.*, 1990; SHARIEF; HENTGES, 1991).

Níveis séricos mais elevados de sTNFR2 foram observados em pacientes com EMPP comparados com os pacientes com outras formas clínicas de EM e controles saudáveis (FISSOLO *et al.*, 2014). Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram níveis elevados de TNF- α e sTNFR2 em plasma de pacientes com EM quando comparados aos controles (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

1.4.2 Estresse oxidativo e nitrosativo e esclerose múltipla

Nos últimos anos, grandes avanços na compreensão da EM sugeriram que mecanismos do estresse oxidativo e nitrosativo (EO&N) induzem perda de mielina, degeneração axonal e uma relação inversa entre tratamento com antioxidante e lesões do SNC. EROs e ERNs geradas em excesso pela micróglia ativada têm sido implicadas como mediadores da desmielinização e podem contribuir para a formação e persistência das lesões características da EM (HALLIWELL, 2012). As evidências indicam tanto a peroxidação lipídica (MOREL *et al.*, 2017) quanto a formação de carbonilas (LUBLIN, 2014) e de nitrotirosina (marcador da ação do peroxinitrito) podem atuar como marcadores do EO&N na EMRR. A tendência para presença aumentada de marcadores oxidativos e nitrosativos é também observada nos tecidos corticais e no LCR (PAVELEK *et al.*, 2016), já que composição do LCR humano é considerada como reflexo do metabolismo cerebral (STOOP, 2010). No entanto, o plasma também pode ser uma boa amostra para a avaliação de marcadores de EO&N (KATARINA *et al.*, 2018).

O aumento das EROs pode ser resultado de concentrações mais baixas de antioxidantes plasmáticos e da atividade reduzida de enzimas antioxidantes no plasma (MILLER; WACHOWICZ; MAJSTEREK, 2013; IBITOYE *et al.*, 2016). Lukáč, Kalnovičová e Muchová (2013) avaliaram o estado antioxidante total (medido pelo método *trolox equivalent antioxidant capacity* – TEAC), que incluiu antioxidantes de baixo peso molecular advindos da dieta como vitamina D, vitamina E, carotenoides e flavonoides, e os autores observaram diminuição do estado antioxidante total no plasma de pacientes com EMRR e EMSP em comparação com controles saudáveis, o que pode estar relacionado ao aumento de seu *status* pró-inflamatório devido a processos microinflamatórios persistentes no SNC, que são intensificados por EO&N (LUKÁČ; KALNOVIČOVÁ; MUCHOVÁ, 2013).

O SNC é particularmente suscetível ao EO&N devido ao elevado consumo de oxigênio (que resulta em produção excessiva de EROs) e da alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são particularmente vulneráveis ao ataque de peroxidação lipídica (FERRETI; BACCHETTI, 2011). Processos inflamatórios ativos predominantes na fase de recaída da EM levam à geração de EO&N e liberação de grande número de mediadores inflamatórios e citocinas. As EROs e ERNs danificam os componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos o que resulta em morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O desequilíbrio redox está associado com disfunção mitocondrial, desregulação da bioenergia axonal, acúmulo de ferro no cérebro e

equilíbrio sistemas oxidante/antioxidante prejudicado. Altos níveis de ferro agem como pró-oxidantes sob condições patológicas e há ocorrência de reações envolvendo oxidação de dopamina e Glu no tecido cerebral (ADAMCZYK; ADAMCZYK-SOWA, 2016).

Mecanismos mediados pelo EO&N iniciam processos inflamatórios na fase aguda da EM e sustentam a neurodegeneração na fase crônica da doença. A inflamação pronunciada no cérebro não está presente apenas na EMRR, mas também nas formas EMPP e EMSP, quando foram demonstrados infiltrados mais pronunciados de células como monócitos, macrófagos, astrócitos e células da micróglia. Devido à expressão elevada de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) na micróglia ativada e macrófagos infiltrados, a produção de óxido nítrico (NO) é significativamente aumentada na região da inflamação. Evidências sugerem que o NO e peroxinitritos citotóxicos contribuem para a lesão tecidual, ruptura da BHE, axodegeneração final e formação de placas na EM (SEVEN *et al.*, 2013).

O SNC é muito sensível à ação das ERO e ERN por vários fatores, tais como o número considerável de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) nas membranas celulares que são muito vulneráveis à oxidação lipídica; pela presença significativa de mitocôndrias e, conseqüentemente, sua alta demanda pelo oxigênio; o cérebro consome 20% do total de O₂ inspirado por alta necessidade de energia, resultando em produção excessiva de EROs; morte neuronal ou colapso de gradientes de íons normais em neurônios causam liberação maciça de Glu e este neurotransmissor excitotóxico é o principal fator que causa estresse oxidativo no cérebro, principalmente pela ativação de seus receptores ionotrópicos; o alto tráfego de cálcio através das membranas neuronais e a interferência do transporte iônico aumentam o cálcio intracelular, frequentemente levando ao estresse oxidativo pela ativação da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e fosfolipase A2; pelo alto conteúdo de ferro no tecido cerebral que é liberado em formas capazes de catalisar reações de radicais livres quando o cérebro está danificado. Por outro lado, o SNC possui menor defesa antioxidante comparado a outros órgãos, com baixos níveis das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona (GSH), glutathiona peroxidase (GPx) e vitamina E (FRIEDMAN, 2011; ADAMCZYK; ADAMCZYK-SOWA, 2016).

Diferentes grupos de biomoléculas são modificadas por reações oxidativas e nitrosativas, tais como os lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Entre os biomarcadores da peroxidação lipídica, os hidroperóxidos lipídicos determinados por método de quimioluminescência (QL), por isto denominados CL-LOOH, têm sido associados com a fisiopatologia da EM. Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), referidos, há

décadas, são considerados marcadores estáveis de danos por oxidação proteica (WITKO-SARSAT *et al.*, 1996).

Os AOPP e proteínas carbonílicas são alguns dos biomarcadores de oxidação de proteínas e têm sido estudados em pacientes com diferentes doenças, incluindo EM (ADAMCZYK; ADAMCZYK-SOWA *et al.*, 2016). A formação de AOPP é correlacionada com a concentração de oxidantes clorados, indicando que AOPP resulta da interação entre oxidantes e proteínas plasmáticas (LJUBISAVLJEVIC *et al.*, 2016).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram um desequilíbrio do estado redox de pacientes com EM, revelado pelo aumento dos níveis séricos de parâmetros pró-oxidantes e pelas reduzidas defesas antioxidantes quando comparados com indivíduos saudáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2012; KALLAUR *et al.*, 2017a). Aumento de AOPP e menor capacidade antioxidante total no plasma (avaliada pelo método de *Total-Radical Antioxidant Parameter* - TRAP) foram observados em pacientes com EM, em comparação a controles, assim como uma correlação positiva com a incapacidade dos pacientes com EM, reforçando que o EO&N poderia ter um importante papel na fisiopatologia da progressão da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Sadowska-Bartosz *et al.* (2013) também avaliaram os biomarcadores de oxidação proteica em pacientes com EMRR sem tratamento com imunomoduladores, pacientes com surtos e pacientes tratados com interferon (IFN)- β e acetato de glatirâmer e relataram que os níveis de AOPP foram maiores em pacientes EMRR sem tratamento e em pacientes com surto. Além disso, este estudo mostrou que biomarcadores de oxidação proteica estão correlacionados com os níveis de proteína C reativa, sugerindo que as modificações de proteínas estão relacionadas com o processo inflamatório. Seus resultados indicaram, ainda, que ocorre oxidação de proteínas na EM e que marcadores do dano proteico, especialmente, a AOPP, podem ser úteis no monitoramento do estresse oxidativo em pacientes com EM (SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2013).

Em um estudo posterior, demonstramos que os biomarcadores da IO&NS, tais como níveis séricos de IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, albumina e níveis plasmáticos de CL-LOOH, AOPP, proteínas carbonílicas, metabólitos do óxido nítrico (NO $_x$) e capacidade total antioxidante do plasma, avaliada pelo TRAP, associados à variante genética rs909253 do TNF β (TNF β NcoI +252G>A) podem ser considerados potenciais biomarcadores preditivos de maior incapacidade em pacientes com EM (KALLAUR *et al.*, 2017b).

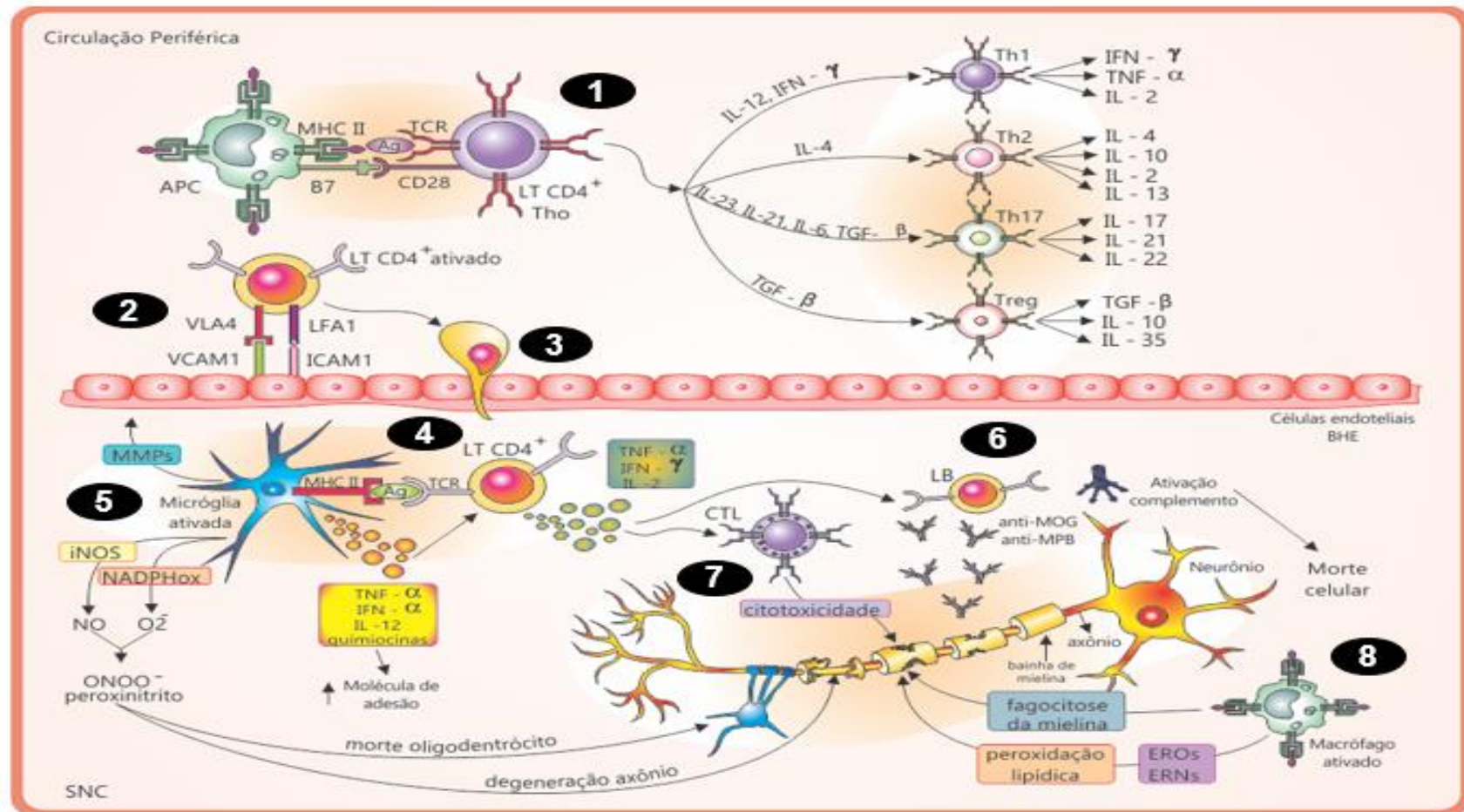
Recentemente, nosso de pesquisa demonstrou que, além de albumina e biomarcadores de EO&N como CL-LOOH, AOPP, TRAP e NO $_x$, os níveis de ferritina também poderiam ser

preditores de EM (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Esses resultados foram consistentes com outros estudos que descreveram uma importante diminuição na capacidade antioxidante total no plasma em pacientes com EM (MOREL *et al.*, 2017; MORRIS *et al.*, 2018). A metodologia TRAP envolve a ação cumulativa de todas as moléculas antioxidantes, como ácido úrico, albumina, vitamina C e vitamina E. Assim, este método fornece uma avaliação integrada de todos os parâmetros, em vez da simples soma de antioxidantes mensuráveis (ADAMCZYK; ADAMCZYK-SOWA, 2016). De fato, uma diminuição na capacidade antioxidante total medida pelo método TRAP em pacientes com EM pode ser devida a alterações em outras moléculas antioxidantes de baixo peso molecular no plasma, como a diminuição dos grupos sulfidril (SH). A diminuição de grupos SH em pacientes com EM no plasma e no LCR também pode ser atribuída a alterações excessivas do estado redox nestes pacientes, afetando também uma atividade complexa da cadeia respiratória (LJUBISAVLJEVIC, 2016).

O aumento dos níveis de NO_x refletem a produção do óxido nítrico (NO) via iNOS e tem sido associado com a patogênese da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Em condições de inflamação e aumento do estresse oxidativo como ocorre na EM, é consumido em uma reação com o ânion superóxido, resultando na produção de peroxinitrito, uma molécula oxidante forte que, por sua vez, acelera a reação de peroxidação lipídica e diminui a biodisponibilidade do NO (NAGY *et al.*, 2010).

A **Figura 3** resume os principais mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo (IO&NS) envolvidos na imunopatogenia da EM. Em conjunto, esses mecanismos contribuem para o processo de degeneração e desmielinização em pacientes com EM.

Figura 3 Mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo envolvidos no sistema nervoso central em pacientes com esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.* (2014)

Mecanismos de estresse oxidativo e nitrosativo no sistema nervoso central em pacientes com esclerose múltipla: 1) macrófagos da circulação periférica apresentam antígenos com epítomos semelhantes à mielina aos linfócitos T CD4⁺ *naïves* (Th0) que, após ativados, podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e linfócitos T reguladores (Treg); 2) os Th1 ativados ligam-se às células endoteliais por meio das moléculas de adesão (VLA4 se liga à VCAM-1 e LFA1 se liga à ICAM-1), facilitando a entrada destas células no SNC através da BHE; 3) no parênquima nervoso, ocorre um novo contato ocorre entre as células T CD4⁺ e macrófagos ou com a micróglia em descanso; 4) nesta fase de reativação, a micróglia torna-se ativada e produz grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IFN- α , IL-12, quimiocinas, metaloproteinases de matriz (MMP) e aumenta a expressão de moléculas de adesão; 5) ocorre aumento da expressão das iNOS e da nicotinamida dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) responsáveis pela produção de NO e ânion superóxido, respectivamente. Estas duas moléculas levam à formação de peroxinitrito que é um potente oxidante envolvido na lesão dos oligodendrócitos e axônios na EM; 6) LT CD4⁺ ativados produzem IL-2 e IFN- γ que estimulam linfócitos B (LB) na produção de anticorpos contra a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (anti-MOG) e anticorpo contra a proteína básica de mielina (anti-MBP), que fixam o complemento levando à morte celular; 7) estas citocinas também estimulam linfócitos T citotóxicos (CTL) que agem diretamente nas lesões desmielinizantes; 8) os macrófagos perivasculares ativados também produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que reagem com lipídeos polinsaturados causando peroxidação lipídica e fagocitose da mielina.

1.4.3 Zinco e esclerose múltipla

Dentre os metais essenciais presentes na dieta e associados à EM, uma posição especial é ocupada pelo zinco, componente essencial de inúmeras enzimas envolvidas na defesa contra o EO&N. Este oligoelemento tem sido extensamente estudado por ser essencial para o funcionamento normal do sistema imunológico, tanto na imunidade inata como na adaptativa, respondendo ao dano tecidual causado pelo patógeno e exercendo funções antioxidantes e anti-inflamatórias (SZEWCZYK, 2013; GAMMOH; RINK, 2017; GAO *et al.*, 2017; LEE, 2018).

O importante impacto do zinco no sistema imunológico tem sido ressaltado em função de suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras (CHOI *et al.*, 2017). O zinco atua como antioxidante por diferentes mecanismos: 1) compete com os íons ferro e cobre que se ligam às membranas e proteínas celulares, deslocando esses metais ativos que catalisam a produção de hidroxila (OH) a partir de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); 2) liga-se a grupos SH de biomoléculas que os protegem da oxidação; 3) aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, como a GSH, CAT e SOD, reduz a atividade de enzimas oxidantes como a iNOS e NADPH e inibe a geração de produtos de peroxidação lipídica; 4) induz a expressão de uma metalotioneína de proteína ligante de metal, que é muito rica em cisteína e é um excelente *scavenger* de íons ·OH (BAO *et al.*, 2013; PRASAD, 2014; CHOI *et al.*, 2017).

A quebra da homeostase do zinco está diretamente associada com alterações no sistema imunológico, entre elas, o prejuízo nas funções dos linfócitos, influência na maturação incorreta das células B e T e alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias (SANNA *et al.*, 2018). Evidências têm demonstrado que a exposição de células a citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e o TNF- α , pode aumentar a expressão de proteínas transportadoras do zinco resultando no aumento da captação do metal para o meio intracelular, aumentando a inflamação e a produção de IL-6. Experimentos demonstraram a relação inversa entre a disponibilidade de zinco e os marcadores inflamatórios de E&ON (PAN, 2017; CHOI *et al.*, 2017). A deficiência de zinco aumenta a produção de ERO em várias células como fibroblastos humanos, células neurais e epiteliais, e também em células de glioma em ratos (EIDE, 2011).

A ação antioxidante do zinco pode ser explicada, também, por mecanismos indiretos visto que atua como cofator em enzimas antioxidantes como a SOD1 e na remoção de ânions superóxidos celulares (CHOI *et al.*, 2017). Prasad (2014) demonstrou que os marcadores de

EO&N estavam diminuídos pela suplementação de zinco em idosos e adultos humanos jovens, incluindo doenças inflamatórias crônicas. Este efeito resultou na diminuição da ativação do NF- κ B em células mononucleares com diminuição da produção do TNF- α por macrófagos

O zinco é um cofator para mais de 300 enzimas e metaloproteínas, incluindo a PBM e as MMP, proteínas com importante envolvimento na patogênese da EM, já discutidas neste documento. No SNC, o zinco ocorre em duas formas: a primeira está fortemente ligada às proteínas e, na segunda, está na forma livre, citoplasmática ou extracelular encontrada nas vesículas pré-sinápticas. Em condições normais, o zinco liberado pelas vesículas sinápticas modula os receptores pós-sinápticos ionotrópicos e metabotrópicos. Para que o zinco desempenhe seus diversos papéis bioativos, são necessários vários sistemas específicos para seu transporte através da membrana biológica (SZEWCZYK, 2013).

Com relação ao sistema imune adaptativo, a deficiência de zinco pode levar à atrofia do timo, redução da atividade da timulina, diminuição da proliferação de células T e mudança no equilíbrio de células Th1 e Th2 em direção a uma resposta Th2. Assim, especialmente as respostas imunes celulares mediadas por células T são afetadas por níveis diminuídos de zinco (ROSEKLANZ *et al.*, 2016). A deficiência deste metal leva ao aumento da suscetibilidade a infecções e eleva o risco de alergias e autoimunidade. Por conseguinte, a terapia e suplementação com zinco podem normalizar as funções imunes debilitadas pela sua deficiência, levando à diminuição da incidência de infecções *in vivo* (CHOI *et al.*, 2017; SANNA *et al.*, 2018). Por outro lado, altas concentrações de zinco diminuem funções celulares tanto quanto a deficiência de zinco e produzem neurotoxicidade, o que implica na importância da ingestão adequada de zinco e adequada homeostase do metal.

Níveis baixos de zinco foram associados à autoimunidade mediada por células T (PAWLITZKI, 2018). A deficiência dietética ou aumento da absorção do metal mostrou serem associados ao risco de EM e ao desenvolvimento de células T pró-inflamatórias patogênicas em células autoimunes experimentais (ROSENKLANZ *et al.*, 2016). Vários estudos relataram que a deficiência de zinco induz um desequilíbrio entre as funções Th1 e Th2 e uma falha na regulação negativa das células Th17, que têm sido sugeridos como os principais mecanismos que contribuem para a patogênese da autoimunidade da EM (LI, 2017; ROSTAMI E CIRIC, 2013; ROSENKLANZ *et al.*, 2016; PAWLITZKI, 2018).

A associação entre a deficiência de zinco e o desenvolvimento da EM tem sido apoiada por diversos estudos, especialmente em pacientes com EMRR (GHAZAVI *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2017; SOCHA, 2017; SAPKOTA; KNOELL, 2018). Esses resultados foram corroborados por estudo de meta-análise que revelou o possível papel da deficiência de zinco em pacientes com EM (BREDHOLT; FREDERIKSEN, 2016; SANNA *et al.*, 2018). Diante destas evidências, a monitorização dos níveis séricos de zinco em pacientes com EM é de grande importância (PAWLITZKI *et al.*, 2018).

1.4.4 Adiponectina e esclerose múltipla

A adiponectina, também denominada Acrp30, adipoQ, ApM1 e GBP28, é uma adipocina do tipo colágeno de 28 a 30 kDa, predominantemente secretada pelos adipócitos. É uma proteína multimérica que existe em cinco configurações, sendo a adiponectina globular (gAPN) e a adiponectina de comprimento completo (fAPN) as principais isoformas de interesse clínico. A adiponectina é detectada em duas formas, incluindo as de baixo peso molecular (APN LMW), e as de elevado peso molecular (APN HMW) em soro humano. A isoforma APN LMW é a forma predominante na circulação, enquanto a APN HMW é a forma predominante no ambiente intracelular, considerada fisiologicamente mais relevante e útil como marcador para disfunções associadas a diferentes doenças, inclusive a EM (LIU; LUO; LI, 2015).

A adiponectina secretada se liga a duas isoformas distintas de receptores, AdipoR1 e AdipoR2. O AdipoR1 tem alta afinidade pela gAPN, mas tem fraca interação com fAPN, enquanto que AdipoR2 tem maior afinidade para a gAPN e fAPN. Ambas as isoformas são expressas em diferentes tipos de células como monócitos, adipócitos e células do músculo esquelético. O AdipoR1 é mais expresso nas células do músculo esquelético e ativa a proteína 5' monofosfato de adenosina quinase (AMPK). O receptor AdipoR2 é predominantemente expresso no fígado, que regula os lípidos e metabolismo da glicose, estresse oxidativo e inflamação (GHADGE; KHAIRE; KUVALEKAR, 2018).

A biossíntese da adiponectina é regulada por vários fatores. Em particular, o receptor gama ativado pelo proliferador de perioxoma (PPAR- γ), um regulador principal da diferenciação de adipócitos, bem como um mediador de sensibilização à insulina, demonstrou regular positivamente a expressão e a secreção de adiponectina em humanos. Além disso, moléculas pró-

inflamatórias como TNF- α , IL-6 e proteína C reativa regulam negativamente a expressão da adiponectina; do mesmo modo, a inflamação *in vivo* foi confirmada como um regulador negativo da expressão e secreção de adiponectina em humanos (ANTONOPOULOS, 2015).

Em seu papel anti-inflamatório, a adiponectina diminui a expressão de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IFN- γ , aumenta a expressão de moléculas anti-inflamatórias, como a IL-10, e diminui a ativação da via do sinal pró-inflamatório, como a via do NF-kB (YOKOTA, 2000). Na célula endotelial do cérebro, a adiponectina reduz a secreção de IL-6, uma citocina pró-inflamatória. Além disso, suprime a ativação e a proliferação de LT e LB, mostrando função protetora contra o desenvolvimento de numerosas condições inflamatórias, como a EM (BARANOWSKA-BIK *et al.*, 2017; DÜZEL *et al.*, 2019). A adiponectina também exerce seu papel anti-inflamatório sobre as células Th17 patogênicas, levando à diminuição da inflamação autoimune do SNC mediada por células Th17 (DARGAHI *et al.*, 2017).

Um modelo experimental demonstrou que a deficiência de adiponectina promoveu inflamação e desmielinização do SNC, exacerbou a EAE e aumentou as citocinas produzidas pelas células Th1 e Th17 do sistema imunológico periférico e do SNC em ratos (ZHANG *et al.*, 2016). Níveis plasmáticos mais baixos de adiponectina foram observados em pacientes com EM comparados aos controles saudáveis (GUERRERO-GARCÍA *et al.*, 2016). Sugere-se que níveis mais baixos de adiponectina entre os pacientes com EM do que os controles possam refletir o desequilíbrio da resposta inflamatória/anti-inflamatória, em especial do perfil de citocinas Th1 e Th17 (ÇOBAN *et al.*, 2017; MATVEEVA *et al.*, 2018). Evidências indicam que adiponectina exerce, também, um papel antioxidante por diferentes mecanismos, como a inibição da geração de ERO, redução da citotoxicidade e a apoptose de mioblastos induzidas por H₂O₂ e restauração do potencial de membrana mitocondrial inibido por H₂O₂ (REN *et al.*, 2017). Além disso, a adiponectina promove redução acentuada da expressão de iNOS e NO (WOODWARD *et al.*, 2017).

Os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina sobre as respostas inata e adaptativa são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 Efeitos anti-inflamatórios da adiponectina sobre as respostas imune e adaptativa

Efeito anti-inflamatório sobre a resposta imune	
Inata	Adaptativa
↓ Molécula de adesão	↓Linfopoiese de células T e B
↓Fator nuclear k B	↓Resposta de células Th1 e Th17
↓Interleucina 6	
↓Interferon γ	
↓Fagocitose	
↑Interleucina 10	
↑IL-1ra	

↓: diminuição; ↑: aumento

IL-1ra: antagonista do receptor de interleucina 1; Th1: T *helper* 1; Th17: T *helper* 17

Fonte: adaptado de Tilg; Moschen (2006)

1.5 Tratamento de Pacientes com Esclerose Múltipla

O início precoce do tratamento após o diagnóstico de EM é de grande importância, assim como do monitoramento clínico-laboratorial e as alterações neurológicas pela RMN (como análise do número e volume de novas lesões), para avaliar a resposta e a segurança do tratamento de pacientes com EM. Essas decisões devem considerar, principalmente, o fenótipo da doença, fatores prognósticos, comorbidades e as preferências do paciente e da família em termos de aceitação de risco (TINTORE; VIDAL-JORDANA; SATRE-GARRIGA, 2019).

A década de 1980 caracterizou-se por investigações importantes indicando que a imunoterapia intensiva poderia alterar o curso da EM e que as exacerbações da EM poderiam ser tratadas com metilprednisolona intravenosa. A era moderna do tratamento da EM começou em 1993, com a aprovação pela *Food and Drugs Administration (FDA/USA)* do IFN- β 1b para tratar formas recorrentes da EM, tornando, assim, uma doença tratável (CASTRO-BORRERO *et al.*, 2012). Além disso, a aprovação do IFN- β 1b dependeu, em parte, dos avanços nos exames de imagem como RMN, abrindo a era do monitoramento radiológico da doença (WINGERCHUK; WEINSHENKER, 2016).

Outro marco importante para o tratamento da EM foi a aprovação de novos medicamentos, como o natalizumabe (2004) e fingolimode (2010). A teriflunomida foi incorporada, em 2017, como opção na primeira linha de tratamento, juntamente com o IFN- β e o acetato de glatiramer. Em 2018, dois novos medicamentos, fumarato de dimetila e cladribina, foram incorporados no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) da EM no Brasil (BRASIL, 2018), assim como houve avanço no tratamento dos pacientes com EM, com a aprovação do ocrelizumabe para o tratamento dos que apresentam a forma EMPP (BALDASSARI; FOX, 2018).

No Brasil, entre as opções terapêuticas com potencial modificador da EMRR (com aprovação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), recomendado pelo PCDT da EM (BRASIL, 2018) estão IFN- β , acetato de glatirâmer, teriflunomida, fumarato de dimetila, fingolimode e natalizumabe. Outros medicamentos também fazem parte da linha de cuidado, como a metilprednisolona, recomendada para o tratamento de surto de EM, podendo ser utilizada por 3-5 dias, devendo-se suspender nesse período o uso de outros medicamentos. A azatioprina pode ser utilizada em casos de pouca adesão às demais opções, sendo menos eficaz e utilizada em monoterapia.

Em linhas gerais, o IFN- β promove a produção de citocinas anti-inflamatórias redirecionando a resposta pró-inflamatória Th1 para Th2, pode aumentar as células Treg e diminuir a produção de substâncias pró-inflamatórias, reduzindo as células inflamatórias no interior do SNC. O acetato de glatirâmer, por sua vez, é um polímero de aminoácido sintético assemelhando-se à proteína básica de mielina e atua promovendo uma mudança do perfil pró-inflamatório para um perfil anti-inflamatório do sistema imunológico, reduz o número de lesões ativas visualizadas na RMN e a taxa de recaída (TAVAZZI; ROVARIS; LA MANTIA, 2014).

O natalizumabe, primeiro anticorpo monoclonal humanizado administrado via intravenosa, é um inibidor seletivo das integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, alvo de ligação das moléculas de adesão que medeiam a adesão e a transmigração de leucócitos para o parênquima cerebral. O natalizumabe promove o bloqueio das interações moleculares de $\alpha 4\beta 1$ com os respectivos alvos e reduz a atividade inflamatória presente no cérebro na EM e inibe a progressão do recrutamento de células imunes para os tecidos inflamados, reduzindo, assim, a formação ou o aumento das lesões resultantes da EM. A principal complicação do tratamento com natalizumabe é o risco de leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), uma doença grave e potencialmente fatal que

leva à inflamação do SNC, causada pela reativação do vírus John Cunningham (vírus JC) (TAVAZZI; ROVARIS; LA MANTIA, 2014).

O cloridrato de fingolimode é recomendado para o tratamento de pacientes adultos com EMRR, após falha terapêutica de IFN- β ou acetato de glatiramer. Sua atividade é mediada pelo bloqueio do receptor da esfingosina-1-fosfato (S1P) nos LT, o que limita saída dessas células dos gânglios linfáticos para o cérebro e medula, convergindo na redução da atividade inflamatória (CHUN et al., 2010). É um modulador que sequestra linfócitos nos gânglios linfáticos, exercendo efeitos diretos no SNC (CHUN *et al.*, 2019).

A teriflunomida é um agente imunomodulador e anti-inflamatório que atua no bloqueio da proliferação de linfócitos ativados, diminuindo a inflamação e dano à mielina no SNC (BRASIL, 2018). Já o fumarato de dimetila atua regulando positivamente os genes antioxidantes dependentes do fator nuclear eritróide 2- fator relacionado 2 (Nrf2), o maior fator de transcrição para genes envolvidos na resposta antioxidante, tais como hemoxigenase 1 (HMOX1) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (CHEN et al., 2014). Assim como a teriflunomida, está aprovado para o tratamento da esclerose múltipla recidivante (forma surto-remissão), mas foi posicionado como fármaco de 2ª linha para o tratamento (BRASIL, 2018).

Ocrelizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado de segunda geração, antagonista seletivo de LB que expressam o antígeno de superfície CD20, reduzindo a atividade da resposta humoral nos pacientes com EM. Atua na depleção de LB CD20⁺ periféricas, enquanto preserva a capacidade de reconstituição de LB da imunidade humoral pré-existente (SORENSEN; BLINKENBERG, 2016).

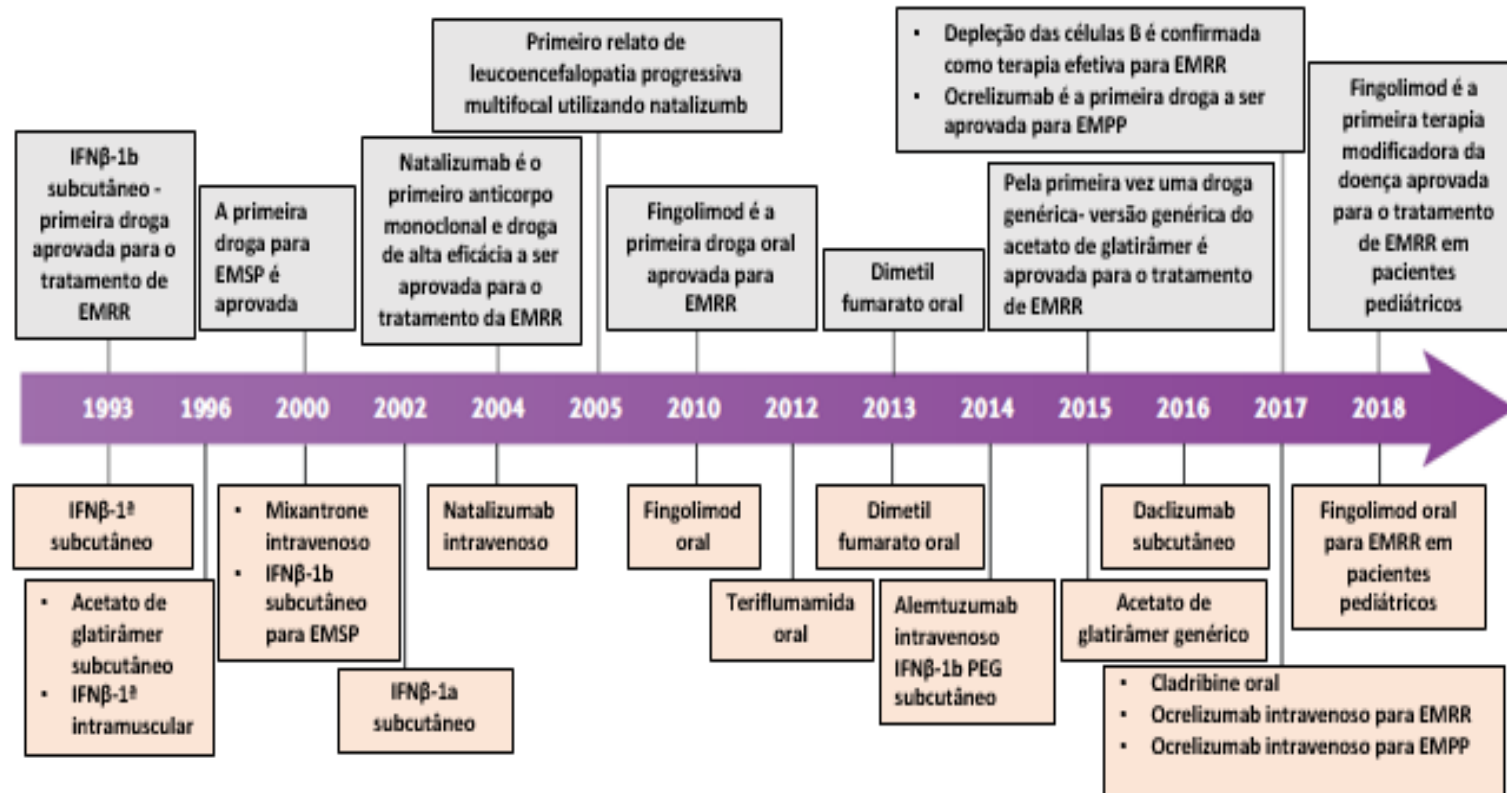
Entre as terapias emergentes para tratamento da EM, destacam-se o uso de células-tronco hematopoiéticas multipotentes em pacientes com EMRR ativa, que reduziu a progressão em cerca de 70% dos doentes, diminuiu as recaídas de forma dramática e suprimiu a atividade da doença avaliada pela RMN. Estudos de vacinas de DNA, uso de nanopartículas como método de entrega de autoantígenos para reduzir citocinas pró-inflamatórias, ligantes de peptídeos alterados, entre outros, também são estratégias terapêuticas promissoras no tratamento da EM (DARGAHI *et al.*, 2017).

Além dos tratamentos específicos para evitar o surgimento de lesões e dos surtos, recomenda-se a utilização de medicamentos para alívio de sintomas como fadiga, descontrole esfinteriano e da espasticidade ou rigidez muscular. No momento do surto, os corticosteróides

em altas doses proporcionam uma recuperação mais rápida ao paciente, mas, em casos mais graves pode ser usada a plasmaférese (técnica de filtração do plasma para retirar anticorpos). A decisão para o melhor tratamento a seguir deve ser tomada pelo seu médico em conjunto com o paciente, sua família e equipe multidisciplinar. Associado ao tratamento farmacológico específico deve-se estimular a reabilitação global, abrangendo várias necessidades do paciente como fisioterapia, fonoaudiologia, terapia ocupacional, neuropsicologia e apoio psicológico (LEONE *et al.*, 2018).

A **Figura 5** resume a linha do tempo de desenvolvimento no tratamento de pacientes com EM, com os principais marcos terapêuticos e drogas aprovadas pela *FDA*, até 2018.

Figura 5 – Linha do tempo de desenvolvimento no tratamento de pacientes com esclerose múltipla



Linha do tempo de desenvolvimento no tratamento de pacientes com esclerose múltipla. Importantes marcos no desenvolvimento são mostrados nas caixas cinza e drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* ou Agência Europeia de Medicamentos para IFNβ para esclerose múltipla secundariamente progressiva (EMSP) e cladribine oral são mostradas nas caixas rosa. EM: esclerose múltipla; PEG: polietileno glicol; EMPP: esclerose múltipla primariamente progressiva; EMRR: esclerose múltipla recorrente-remitente; EMSP: esclerose múltipla secundariamente progressiva. Fonte: adaptado de Tintore; Vidal-Jordana; Sastre-Garriga (2019)

JUSTIFICATIVA

A grande heterogeneidade dos fatores envolvidos na etiopatogenia da EM, como etnia, idade, sexo, região e variação latitudinal, fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e nutricionais, pode ser responsável pela variabilidade dos fenótipos clínicos, grau de incapacidade, progressão da incapacidade e resposta ao tratamento à doença. Por isto, constituem os aspectos mais estudados em pacientes com EM em diferentes populações.

No presente, não existe um método de diagnóstico laboratorial específico para a EM, sendo necessário recorrer a um conjunto de testes que incluem exames neurológicos, RMN e análise do LCR. Ainda assim, nem sempre este conjunto de testes permite diagnosticar a doença com segurança. Por isso, é de grande interesse encontrar novos biomarcadores diagnósticos que permitam distinguir a EM de outras doenças com sintomas semelhantes, assim como biomarcadores para monitorar a atividade e a progressão da doença e avaliar a resposta dos pacientes à terapia.

No entanto, estes biomarcadores têm sido avaliados, na sua maioria, de forma isolada, o que limita sua acurácia, sensibilidade e especificidade para o auxílio no diagnóstico da EM. Do mesmo modo, a avaliação de um biomarcador isoladamente não reflete as possíveis correlações entre os diferentes biomarcadores, que poderia, em parte, contribuir para melhor entendimento das alterações inflamatórias e de O&NS presentes na EM. Até o presente momento, não há estudos com base em modelo estatístico que tenham avaliado um conjunto de biomarcadores inflamatórios e de EO&N, que incluíssem zinco e adiponectina em pacientes com EM.

Portanto, justificamos, com este estudo, a importância da avaliação dos biomarcadores inflamatórios TNF- α e seus receptores solúveis, em conjunto com biomarcadores anti-inflamatórios e antioxidantes como zinco, adiponectina, capacidade antioxidante total do plasma e grupos SH em pacientes com EM comparados a indivíduos saudáveis, na tentativa de identificar um modelo de biomarcadores que poderá auxiliar no diagnóstico da doença.

JUSTIFICATIVA

A grande heterogeneidade dos fatores envolvidos na etiopatogenia da EM, como etnia, idade, sexo, região e variação latitudinal, fatores genéticos, epigenéticos, hormonais, ambientais e nutricionais, pode ser responsável pela variabilidade dos fenótipos clínicos, grau de incapacidade, progressão da incapacidade e resposta ao tratamento à doença. Por isto, constituem os aspectos mais estudados em pacientes com EM em diferentes populações.

No presente, não existe um método de diagnóstico laboratorial específico para a EM, sendo necessário recorrer a um conjunto de testes que incluem exames neurológicos, RMN e análise do LCR. Ainda assim, nem sempre este conjunto de testes permite diagnosticar a doença com segurança. Por isso, é de grande interesse encontrar biomarcadores diagnósticos que permitam distinguir a EM de outras doenças com sintomas semelhantes.

Os principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da EM, como variantes genéticas, resposta inflamatória, metabolismo e E&ON, têm sido objeto de estudos pelo nosso grupo de pesquisa. Em estudos prévios, demonstramos a complexa rede de citocinas inflamatórias (como TNF- α e seus receptores solúveis, IL-6 e IL-17) e anti-inflamatórias (como IL-10), além do desequilíbrio do estado redox em pacientes com EM, em associação com a incapacidade e progressão da doença. Outros estudos descritos na literatura demonstraram que pacientes com EM apresentam diminuição de adiponectina, zinco, capacidade antioxidante total do plasma e de grupos SH quando comparados a grupo de indivíduos saudáveis.

No entanto, estes biomarcadores têm sido avaliados, na sua maioria, de forma isolada, o que limita sua sensibilidade, especificidade e acurácia. Do mesmo modo, a avaliação de um biomarcador isoladamente não reflete as possíveis correlações entre os diferentes biomarcadores, que poderiam, em parte, contribuir para melhor entendimento das alterações IO&NS na EM. Até o presente momento, não há estudos, com base em modelo estatístico, que tenham avaliado um conjunto de biomarcadores IO&N que incluíssem zinco e adiponectina em pacientes com EM.

Portanto, justificamos, neste estudo, a importância da validação dos biomarcadores inflamatórios TNF- α e seus receptores solúveis, em conjunto com biomarcadores anti-inflamatórios e antioxidantes como zinco, adiponectina, capacidade antioxidante total do plasma e grupos SH em pacientes com EM comparados a indivíduos saudáveis, na tentativa de identificar um modelo de biomarcadores que poderá auxiliar no diagnóstico da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os metais essenciais e biomarcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Revisar o papel dos metais essenciais zinco, cobre, ferro e manganês em doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e EM;
- b) Comparar os níveis plasmáticos de biomarcadores IO&NS em pacientes com EM e indivíduos saudáveis;
- c) Determinar o tamanho do efeito do diagnóstico de EM nos níveis dos biomarcadores IO&NS;
- d) Determinar a importância relativa de cada biomarcador IO&NS avaliado na fisiopatologia da EM;
- e) Propor um modelo de biomarcadores IO&NS que possam auxiliar no diagnóstico da EM.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Inicialmente, realizou-se um estudo de revisão da literatura, com busca de artigos de revisão, originais e de metanálise na base de dados bibliográficos de acesso público *PubMed/US National Library of Medicine/National Institutes of Health/USA*, em língua inglesa, no período de 10 anos (2008 a 2018). Na busca foram utilizados os seguintes *Medical Subject Headings (MeSH)*: *multiple sclerosis; multiple sclerosis relapsing remitting; multiple sclerosis primary progressive; multiple sclerosis secondary progressive; zinc; copper; manganese; iron; oxidative stress; nitrosative stress; adiponectin; toxicity*.

Simultaneamente, realizou-se um estudo observacional, tipo caso-controle, para contemplar objetivos propostos nesta tese.

4.2 Aspectos Éticos

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEPE) 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 participar voluntariamente da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNCIDE A).

4.3 Amostras

As amostras foram obtidas por conveniência de tempo e local. Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes adultos com diagnóstico de EM, de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, Paraná. O convite foi realizado de forma prospectiva, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015. Foram inseridos no estudo 174 pacientes com EM, diagnosticados segundo os critérios de McDonald (POLMAN et al., 2011) e classificados, de acordo com as formas clínicas, como CIS, EMRR, EMSP e EMPP.

O grupo controle foi composto de 182 indivíduos saudáveis selecionados, consecutivamente, entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina. Os indivíduos deste grupo não apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, renais, cardíacas, hepáticas ou infecciosas e reportaram não fazer uso de medicamentos anti-inflamatórios e suplementos antioxidantes.

Foram coletados dados demográficos (sexo, idade e etnia), epidemiológicos, antropométricos (peso, altura e índice de massa corporal - IMC) e clínicos (formas clínicas e terapia para EM), além do uso de medicamentos utilizando-se um questionário padronizado (Apêndice B).

As medidas antropométricas avaliadas nos pacientes foram peso corporal (Kg) e altura (m), obtidas durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (Kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em kg/m^2 .

4.4 Coleta de Material Biológico

Após jejum de 12 horas, amostras de sangue periférico foram coletadas com e sem anticoagulantes e encaminhadas ao laboratório para registro, processamento e armazenamento. As amostras não analisadas no dia da coleta do material foram aliquotadas e armazenadas em *freezer* a -80°C até o momento de uso. Todas as amostras de casos e controles foram identificadas por números e letras para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

4.5 Determinação dos biomarcadores IO&NS

4.5.1 Determinação dos níveis plasmáticos de TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2

Os níveis plasmáticos de TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 foram determinados por imunofluorimetria utilizando kit multiplex (*Novex Life Technologies, Frederick, MD, USA*) para plataforma Luminex® (MAGPIX®, Luminex Corp, Austin, TX, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL .

4.5.2 Determinação dos níveis plasmáticos de adiponectina

Os níveis plasmáticos de adiponectina foram mensurados por ensaio de imunoabsorção enzimática em sanduíche (*sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) usando um ensaio comercial (*Ready-Set Go! Set, e-Bioscience, San Diego, CA, USA*). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (CL-LOOH)

A avaliação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por quimioluminescência (QL) foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzales-Flecha *et al.* (1991). A reação estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e os níveis de hidroperóxidos lipídicos presentes no plasma. O teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, como vitamina E, com formação de hidroperóxidos lipídicos, resultando em um aumento da emissão de fótons. O método de QL foi realizado em luminômetro (*GloMAX 20/20 Single Tube Luminometer, Promega Corporation, WI, USA*). Foram realizadas 3900 leituras em cerca de 1 hora de reação, e a média destes valores foi expressa em unidades relativas de luz (URL) (LOZOVYOY *et al.*, 2011).

4.5.4 Determinação dos produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

AOPP foram determinados no plasma usando o método semiautomático descrito por Witko-Sarsat *et al.* (1996). AOPP resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, que são detectados espectrofotometricamente. As concentrações foram expressas em $\mu\text{mol/L}$ de equivalente de cloramina T.

4.5.5 Determinação de metabólitos de NO (NOx)

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela determinação dos metabólitos do NO (NOx) descrita por Navarro-Gonzalvez *et al.* (1998). O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de oxirredução utilizando grânulos de cádmio, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550nm. Os resultados foram expressos em μM .

4.5.6 Determinação dos níveis plasmáticos de grupamentos SH

O grupos SH das proteínas plasmáticas pode ter ação antioxidante, contribuindo para neutralizar o excesso de radicais livres e foram avaliados no plasma por um ensaio espectrofotométrico baseado no ácido 2,2-ditiobisnitrobenzóico (DTNB) (HU, 1994). Os resultados foram expressos em μM .

4.5.7 Capacidade Antioxidante Total do Plasma

A capacidade antioxidante total no plasma foi avaliada por meio do método de TRAP. Neste método, avalia-se a ação cumulativa de todos os antioxidantes (hidrossolúveis e lipossolúveis) presentes no meio que resulta em um parâmetro integrado capaz de revelar alterações no delicado equilíbrio redox existente *in vivo*. Baseia-se no princípio da adição de um azoiniciador ao plasma, substância capaz de gerar espécies reativas, que por sua vez, são neutralizados pelos antioxidantes presentes no plasma. O tempo no qual a oxidação é inibida e, conseqüentemente não aumenta a emissão de f'tons da reação, é comparada ao do Trolox® (*New Jersey, USA*). O Trolox®, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, é usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado à capacidade antioxidante total do plasma (REPETTO *et al.*, 1996).

4.6 Dosagem de zinco sérico

Os níveis séricos de zinco foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica-chama (EAA-chama). Todas as medidas foram realizadas com um EAA Varian® SpectrAA 50 (*Palo Alto, USA*) e a chama de ar sintético-acetileno foi usada para atomização das amostras. Neste método, uma lâmpada de cátodo oco impregnada de zinco emite luz monocromática no comprimento de onda de 213,9 nm, sob as condições ideais de leituras de comprimento de onda, largura de fenda e altura do queimador, recomendadas pelo fabricante e resultados expressos em μg de zinco/dL de sangue.

4.7 Análise Estatística

As variáveis categóricas foram expressas como valores absolutos (n) e relativos (%) e analisadas pelo teste de qui-quadrado (ou teste Exato de Fisher, quando apropriado). Variáveis contínuas foram expressas como média e \pm desvio padrão (\pm DP). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para verificar as diferenças intergrupos nas variáveis contínuas. Empregamos o teste de adequação de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição. Transformações logarítmicas (Ln) de dados contínuos foram realizadas para normalizar a distribuição de dados ou para ajustar a heterogeneidade da variância entre os grupos de estudo (conforme avaliado pelo teste de Levene).

Os coeficientes de correlação de Pearson foram usados para examinar as associações entre duas variáveis contínuas. Usamos a análise multivariada de modelo linear geral (GLM) para determinar os efeitos de variáveis independentes, como o diagnóstico, sobre biomarcadores, enquanto controlamos possíveis fatores de confusão, incluindo idade, sexo e IMC. Consequentemente, foram utilizados testes para efeitos entre indivíduos para verificar os efeitos de variáveis explicativas sobre os biomarcadores separados e os valores médios marginais estimados pelo modelo foram computados. Resultados de comparações múltiplas foram corrigidos para taxa de descoberta falsa (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

A análise de regressão logística binária foi empregada para avaliar as variáveis significativas que predizem EM versus controles saudáveis usando biomarcadores como variáveis explicativas. Calculamos o *odds ratio* (OR) e os intervalos de confiança de 95% (IC) de

preditores significativos e usamos a análise da curva de operação do receptor (ROC) para calcular a área sob a curva ROC (AUC/ROC). As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* IBM SPSS Windows versão 24.

Como técnicas de aprendizado supervisionadas, usamos o modelo matemático *Support Vector Machine* (SVM). O SVM com função de base radial foi empregado para calcular o treinamento e 10 vezes a precisão de validação de uma segregação de 2 classes (pacientes *versus* controles com os biomarcadores como variáveis explicativas. O SVM foi realizado usando o Unscrambler® (CAMO®). Atualmente, o modelo matemático SVM é considerado um dos melhores modelos para prever biomarcadores candidatos ao diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento de doenças, incluindo as doenças neurológicas (GROLLEMUND et al., 2019).

Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 foi utilizado para indicar um efeito estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

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

O primeiro artigo com o título “*The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases*” revisa o papel dos metais essenciais zinco, cobre, ferro e manganês na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e EM. Este artigo foi submetido ao *Neurotoxicology Journal* (ISSN: 0161-813X), com fator de impacto 3.076, em fevereiro de 2019 e está em fase de avaliação pelos revisores.

O segundo artigo (artigo original) com o título “*Antioxidant and anti-inflammatory diagnostic biomarkers in multiple sclerosis: a machine learning study*” será submetido à revista *Molecular Neurobiology* com fator de impacto de 5,076.

Artigo 1

The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases

Leda Mezzaroba^{1,2}, Daniela Frizon Alfieri¹, Andrea Name Colado Simão^{1,2}, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,2}

¹Laboratory of Applied Immunology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; Zip Code 86.038-440;

²Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; Zip Code 86.038-440

Corresponding author: Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, 86038-440 Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail address: reiche@sercomtel.com.br

ORCID: 0000-0001/6507-2839

Highlights

- Excessive metal levels induce neurodegeneration by oxidative stress, disrupting mitochondrial function, and cell death
- The role of zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), and iron (Fe) in Alzheimer disease, Parkinson disease, and multiple sclerosis was reviewed.
- Zn deficiency and high levels of Cu, Mn, and Fe participate in the activation of nuclear factor kappa B and induce inflammatory and oxidative stress
- High levels of Cu, Mn and Fe participate in the formation α -synuclein aggregates in intracellular inclusions, called Lewy Body, a marker of Parkinson disease;
- Zn deficiency induces an imbalance of Th1 and Th2 cell functions and a failure of Th17 down-regulation, contributing to the pathogenesis of multiple sclerosis

ABSTRACT

Metals are involved in different pathophysiological mechanisms associated with neurodegenerative diseases (NDDs), including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and multiple sclerosis (MS). The aim of this study was to review the effects of the essential metals zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn) and iron (Fe) on the central nervous system (CNS), as well as the mechanisms involved in their neurotoxicity. Low levels of Zn as well as high levels of Cu, Mn, and Fe participate in the activation of signaling pathways of the inflammatory, oxidative and nitrosative stress (IO&NS) response, including nuclear factor kappa B and activator protein-1. The imbalance of these metals impairs the structural, regulatory, and catalytic functions of different enzymes, proteins, receptors, and transporters. Neurodegeneration occurs via association of metals with proteins and subsequent induction of aggregate formation creating a vicious cycle by disrupting mitochondrial function, which depletes adenosine triphosphate and induces IO&NS, cell death by apoptotic and/or necrotic mechanisms. In AD, at low levels, Zn suppresses β -amyloid-induced neurotoxicity by selectively precipitating aggregation intermediates; however, at high levels, the binding of Zn to β -amyloid may enhance formation of fibrillar β -amyloid aggregation, leading to neurodegeneration. High levels of Cu, Mn and Fe participate in the formation α -synuclein aggregates in intracellular inclusions, called Lewy Body, that result in synaptic dysfunction and interruption of axonal transport. In PD, there is focal accumulation of Fe in the substantia nigra, while in AD a diffuse accumulation of Fe occurs in various regions, such as cortex and hippocampus, with Fe marginally increased in the senile plaques. Zn deficiency induces an imbalance between T helper (Th)1 and Th2 cell functions and a failure of Th17 down-regulation, contributing to the pathogenesis of MS. In MS, elevated levels of Fe occur in certain brain regions, such as thalamus and striatum, which may be due to inflammatory processes disrupting the blood-brain barrier and attracting Fe-rich macrophages. Delineating the specific mechanisms by which metals alter redox homeostasis is essential to understand the pathophysiology of AD, PD, and MS and may provide possible new targets for their prevention and treatment of the patients affected by these NDDs.

Keywords: Alzheimer disease; Parkinson disease, multiple sclerosis; essentials metals; oxidative stress.

List of abbreviations

A β : amyloid beta; AD: Alzheimer's disease; Al: aluminum; AP-1: activator protein-1; APP: amyloid precursor protein; ATP7A: adenylyl pyrophosphatase copper transporting alpha; ATP: adenosine triphosphate; BBB: blood brain barrier; CAT: catalase; Cd: cadmium; CNS: central nervous system; Co: cobalt; Cr: chromium; Cu: copper; COX-2: cyclooxygenase 2; CRT1: copper transport protein; CSF: cerebrospinal fluid; DA: dopamine; DCYTB: duodenal cytochrome B. DNA: deoxyribonucleic acid; DMT1: divalent metal transporter-1; Fe: iron; GABA: aminobutyric-acid; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; H₂O₂: hydrogen peroxide; GS: glutamine synthetase; IFN- γ : interferon gamma; IL: interleukin; iNOS: inducible nitric oxide synthase; IO&NS: inflammatory, oxidative and nitrosative stress; Pb: lead; Mn: manganese; MnSOD: manganese superoxide dismutase; MBP: myelin basic protein; MMP: matrix metalloproteinase; Mo: molybdenum; MS: multiple sclerosis; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NDDs: neurodegenerative diseases; NK: natural killers; NF- κ B: nuclear factor kappa B; NMDA: N-methyl-D-aspartate receptor; PD: Parkinson's disease; PKC- δ : protein kinase C δ ; RNS: reactive nitrogen species; ROS: reactive oxygen species; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis; SH: sulfhydryl groups; SOD: superoxide dismutase; STEAP2: six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-2 metalloredutase; Th: T helper; Tf: transferrin; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; TrF: transferrin receptor; V: vanadium; Zn: zinc; ZIP: Zrt-and-Irt-related *protein* ; ZnT: Zn transporter; Zrt: *Zn* transporter proteins.

1. Introduction

Trace metals are defined as essential elements to life and, in general, are present in low concentration in human organism. Essential metals, such as zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn) and iron (Fe) play a role as cofactors in the activity of a wide range of physiological processes involved in cellular homeostasis and survival, as well as during organ and tissue development [1,2].

It is well recognized that alterations in the homeostasis of oligoelements may result in damage of the central nervous system (CNS), with neurodegeneration, disability and neuroinflammation, contributing to the development of several neurodegenerative diseases (NDDs) [3]. NDDs are characterized by progressive dysfunction and loss of neurons with involvement of different functional systems and a wide spectrum of clinical presentations. There are several pathways which contribute to the damage of neurons. A fundamental phenomenon in most NDDs is the deposition of proteins with altered physicochemical properties, as has been shown for Alzheimer disease (AD), Parkinson disease (PD), prion disease, tauopathies, and other forms of proteinopathies. Chronic excitotoxicity has been discussed for progressive long-term NDDs, including AD [4].

Moreover, microglia activation, neuroinflammation, formation of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), mitochondrial dysfunctions, autoimmunity and demyelination are other mechanisms involved in the neurodegeneration [5]. Both the components of immune system (innate and adaptative immunity) play important role in the generation of neuroinflammation in different NDDs [6]. These different pathways interact with others, such as those of energetic dysregulation, molecular damage, metabolic changes, dysregulation of ion homeostasis, and adaptation [7].

The large majority of the NDDs has a multifactorial etiology with interactions between genetic, lifestyle and environmental factors [8]. Among environmental risk factors of NDDs, xenobiotic metals are gaining increasing attention because a larger percentage of population is exposed to industrial pollution through food, air and water [9,10].

Neurotoxicity of metals has been demonstrated *in vitro*, as well as *in vivo* experimental and epidemiological studies carried out on different populations exposed to trace elements and it is likely that each metal could be toxic through specific mechanisms [11]. Excessive metal

accumulation in the CNS may be toxic, inducing oxidative stress, disrupting mitochondrial function, and impairing the activity of numerous enzymes with important structural, regulatory, and catalytic functions in different types of proteins, receptors, and transporters. Moreover, alteration in essential metal homeostasis has been suggested to cause neurodegeneration, e.g. in AD via association of metals with proteins and subsequent induction of aggregate formation. Metals can cause neurodegeneration in PD, AD and MS through a vicious cycle by disrupting mitochondrial function, which depletes adenosine triphosphate (ATP) and induces ROS production. Through these mechanisms, metals cause cell death by apoptotic and/or necrotic mechanisms [3].

In this review, we discuss the role of these essential metals (Zn, Cu, Mn and Fe) on the pathophysiology of some NDDs, including AD, PD and MS, as well as the mechanisms involved in their neurotoxicity.

2. Essential Metals Responsible for Neurodegenerative Diseases

The inflammatory immune response and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) are the main pathways of ROS and RNS production, which are responsible for a serious and persistent imbalance between the production of highly oxidative compounds and antioxidant defenses that leads to tissue damage, including CNS [12]. The antioxidant defense system has the function of inhibiting and/or reducing the damage caused by the deleterious free radicals and/or non-radical ROS. The antioxidant defense is divided into enzymatic system, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), as well as nonenzymatic system through a variety of antioxidant substances, which may be endogenous or dietary, such as ascorbic acid (vitamin C), alpha-tocopherol (vitamin E), carotenoids, and flavonoids. As an integral part of their active sites, two major antioxidant enzymes, SOD and CAT, contain metal ions to battle against toxic effects of metal-induced free radicals [13].

Some NDD, including AD, PD and MS, as well as the aging process show that the blood brain barrier (BBB) is more vulnerable than it seems [14] and protects the CNS against chemical insults through different complementary mechanisms. Toxic metal molecules can either bypass these mechanisms or be sequestered in and, therefore, potentially be deleterious to BBB.

Supportive evidence suggests that damage to blood–brain interfaces can lead to chemical-induced neurotoxicity induced by metals [15].

The **Figure 1** shows the role of Zn, Cu, Mn and Fe in the mechanisms of IO&NS in the CNS.

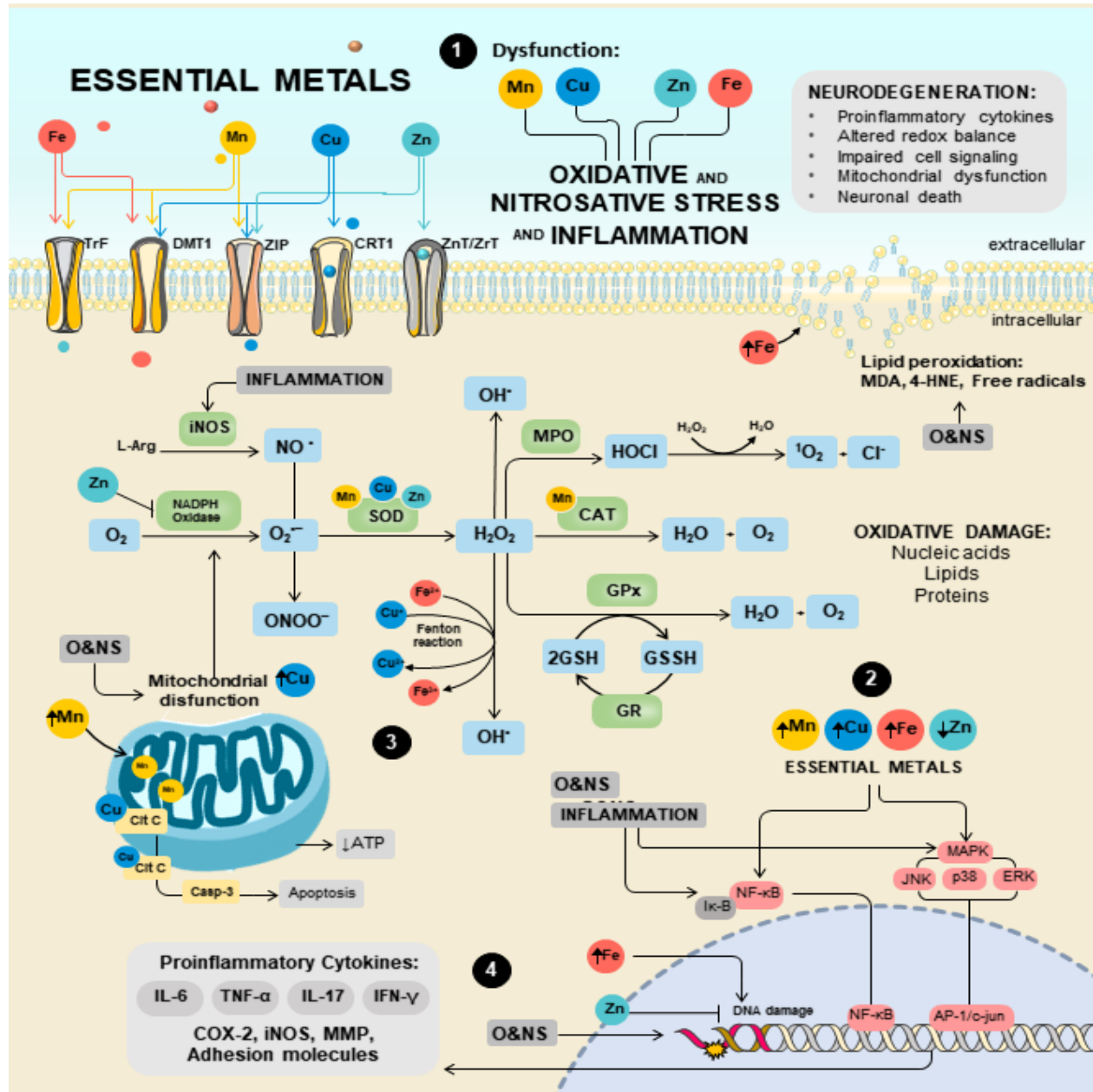


Figure 1 The role of zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), and iron (Fe) in the mechanisms of inflammation, oxidative and nitrosative stress (IO&NS) in the central nervous system (CNS). The role of Zn, Cu, Mn and Fe in the mechanisms of IO&NS in the CNS is visualized in the following sequence: 1) the essential metals interact with different cell membrane receptors, such as the divalent metal transporter-1 (DMT-1), transferrin receptor (TrF), Zn transporter (ZnT) and Zrt/Irt-related proteins (ZIP), Cu transport protein 1 (CRT-1), to participate in a wide array of physiological and cellular functions; 2) changes in the essential metal levels, including low levels of Zn, as well as high levels of Mn, Cu and Fe participate

in the activation of signaling pathways involved in the IO&NS, including the nuclear factor Kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1). With the activation of the NF- κ B and AP-1/c-jun transcriptional factors, the deleterious effects of these metals are through the induction of proinflammatory cytokines interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-17, and interferon (IFN)- γ , as well as cyclooxygenase 2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinases (MMP), and adhesion molecules that are key molecules in the brain damage; 3) Fe and Cu participate in the Fenton reaction to generate free radicals for the innate immune response; on the other hand, high levels of Fe contribute to the blood-brain-barrier (BBB) breakdown and deoxyribonucleic acid (DNA) damage; 4) Zn participates in the modulation of the deleterious effects of these molecular and cellular events on CNS, inhibits the DNA damage, inhibits the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase, as well as Mn is for the catalase (CAT), Mn, Cu and Zn for the superoxide dismutase (SOD), important enzymes of the antioxidant enzymatic system defense against toxic effects of metal-induced free radicals.

2.1 Mechanisms of Zn Neurotoxicity on AD, PD and MS

Zn is the second most abundant transition metal after Fe and is required for humans and many other living organisms. Dietary Zn is absorbed in the small intestine (duodenum and jejunum) and then distributed to peripheral tissues. The Zn excess is excreted through gastrointestinal secretion, sloughing mucosal cells, and in tegument [16].

Zn has an impact on the immune system and possesses neuroprotective properties and changes in plasma levels have consequences, particularly, on the CNS and the immune systems [17]. Zn is a cofactor for over 300 enzymes and metalloproteins, including matrix metalloproteinases (MMP). MMP are a group of proteases dependent of Zn for their proteolytic activity and involved in remodeling of the extracellular matrix and modifying cell–matrix interactions. Zn is a component of an even greater amount of proteins including myelin basic protein (MBP), regulating gene transcription and the antioxidant response. The redox inert metal Zn is an essential component of numerous proteins involved in the defense against oxidative stress and depletion of its metal may enhance DNA damage via impairments of DNA repair mechanisms [16].

Zn is widely used as a structural element in proteins than any other transition metal ion, is a catalytic component of many enzymes, and acts as a cellular signaling mediator. The majority of Zn is in the testes, muscle, liver, and brain [18]. Following the uptake of Zn by cells, it is distributed within the cytoplasm (50%), nucleus (30%–40%), and cell membrane (10%). Cellular Zn is then available as four pools. First, it can bind tightly to metalloproteins, as a structural component or to metalloenzymes as a cofactor; second, Zn binds to metallothioneins with a low affinity, which can occupy 5%–15% of the total cellular Zn pool; third, it can be

compartmentalized into intracellular organelles and vesicles for Zn storage and as a supply for Zn-dependent proteins, which is mediated by Zn transporters; and fourth, a pool of cytosolic free Zn is maintained at a very low concentration [19].

The importance of Zn to the function of the CNS is increasingly being established and has been suggested as a key factor in the development of several NDDs, such as AD, PD and MS. In the CNS, Zn occurs in two forms: the first being tightly bound to proteins and, secondly, the free, cytoplasmic, or extracellular form found in presynaptic vesicles. Under normal conditions, Zn released from the synaptic vesicles modulates both ionotropic and metabotropic post-synaptic receptors. For Zn to perform its diverse bioactive roles, a number of specific systems to transport Zn across the biological membrane are required [20].

Thus, Zn transport proteins are indispensable for the physiology of Zn. In particular, Zn transporter (ZnT) and Zrt/Irt-related proteins (ZIP) contribute to a wide array of physiological and cellular functions (e.g., immune, endocrine, reproductive, skeletal, and neuronal) by tightly controlling Zn homeostasis. The mobilization of Zn into or out of the cytosol, therefore, is directed through ZIP and ZnT and in the cytosol, MT bind Zn to reserve, buffer, and chelate. The physiological importance of Zn homeostasis in humans, as well as ZIP and ZnT transporters mutation in human genetic are demonstrated by the deleterious consequences of NDDs [21]. Excess levels of Zn, for example, suppresses Cu and Fe absorption, promoting ROS production in the mitochondria, disrupting activities of metabolic enzymes, and activating apoptotic processes [18].

Zn can influence the production and signaling of numerous inflammatory cytokines in a variety of cell types. Plasma Zn concentrations rapidly decline during acute phase response to different stimuli, such as stress, infection and trauma. Consequently, Zn is shuttled into cellular compartments, where it is utilized for protein synthesis, neutralization of free radicals and to prevent microbial invasion. The Zn redistribution during inflammatory events seems to be mediated by cytokines. Therefore, patients with acute illnesses show hypozincemia along with elevated cytokine production [22]. On the other hand, patients with chronic inflammation, which is characterized by increased levels of inflammatory cytokine production, the Zn intake may influence the cytokine production. Patients with lower Zn dietary intake present with lower plasma and intracellular Zn concentrations along with upregulated gene expression of

inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , and IL-6, compared to patients with higher Zn intake [23].

Zn has been well known to be essential for the normal function of both innate and adaptive immunity responding to pathogen or tissue damage and exerting anti-inflammatory and antioxidant functions [19]. Zn exerts its antioxidant function through four different mechanisms. First, by competition with Fe and Cu ions for binding to cell membranes and proteins, displacing these redox active metals, which catalyze the production of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) from H_2O_2 ; second, Zn binds to sulfhydryl (SH) groups of biomolecules protecting them from oxidation; third, by increasing the activation of antioxidant enzymes, such as GSH, CAT, and SOD and also for reducing the activities of oxidant-promoting enzymes, including inducible nitric oxide synthetase (iNOS) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, as well as inhibiting the generation of lipid peroxidation products; and fourth, Zn induces the expression of metallothioneins, which are very rich in cysteine and an excellent scavenger of $\cdot\text{OH}$ ions [24].

Moreover, Zn acts as anti-inflammatory element influencing major pro-inflammatory signaling pathways. Zn prevents the dissociation of NF- κ B from its corresponding inhibitory protein, thus preventing the nuclear translocation of NF- κ B and inhibiting subsequent inflammation. Zn also inhibits IL-6-mediated activation of STAT3 [22].

Homeostasis of Zn is essential for proper brain function (Zn and Fe are prevalent cerebral metals) and changes in its levels are associated with AD, PD, and MS [25]. In these diseases, Zn deficiency decreases the activity of serum thymulin (a thymic hormone), which is required for maturation and differentiation of T helper (Th) cells. Th1 cytokine profile is decreased but Th2 cytokine profile is not affected by Zn deficiency in humans. This shift of Th1 to Th2 function results in cell-mediated immune dysfunction and, because IL-2 production (a Th1 cytokine) is decreased, this leads to decreased activities of natural killer (NK) cells and T cytotoxic cells, which are involved in host defense mechanisms. Zn deficiency may also decrease the generation of new CD41⁺ T cells from the thymus. On the other hand, Zn supplementation to patients with AD, PD, and MS decreased the gene expression and production of pro-inflammatory cytokines and decreased oxidative stress biomarkers [17].

AD and PD are the primary NDDs and, particularly, are two NDD that occur in an age-related manner. For example, serum Zn levels were found to be significantly decreased in older AD patients compared to control subjects. AD is characterized by the abnormal intracellular

accumulation of the amyloid beta ($A\beta$) protein and/or its assembly into paired helical filaments and extracellular accumulation in plaques. Possible causes of AD include increased levels of oxidative stress in the brain, as well as the sequestration of Zn ions within amyloid plaques. Zn can induce $A\beta$ monomers to aggregate in different forms and is known to bind $A\beta$ via its histidine imidazole rings and accumulate within senile plaques. So, at low concentrations (a few micromolar), Zn suppresses β -amyloid-induced neurotoxicity by selectively precipitating aggregation intermediates. However, at high levels, the binding of Zn to β -amyloid may enhance formation of fibrillar β -amyloid aggregation, leading to neurodegeneration [26].

The incidence of AD is increasing and major risk factors for AD are advancing age, family history, heredity, besides modifiable factors as type 2 diabetes mellitus and obesity [27]. These factors, in turn, have been associated with an increased risk of dementia. In the brain, Zn co-localizes with glutamate in synaptic vesicles, and modulates N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) receptor activity [28]. Intracellular Zn is involved in apoptosis and fluctuations in cytoplasmic Zn affect modulation of intracellular signaling [29].

Both increased and reduced levels of cytoplasmic Zn have been implicated in AD pathophysiology. Intracellular Zn depletion destabilizes microtubules, hereby starting a cascade of tau release, hyper-phosphorylation and formation of neurofibrillary tangles. Intracellular Zn excess, occurring as consequence of $A\beta$ aggregation and ROS generation, releases Zn from metallothioneins and may affect mitochondrial function and induce apoptosis. One way to reconcile these seemingly contradictory findings is to suggest that intracellular Zn must be tightly regulated to avoid adverse molecular consequences reducing the amount of Zn available for crucial intracellular processes [29].

In PD, in turn, α -synuclein aggregates in intracellular inclusions called Lewy Bodies, which are associated with the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Patients with PD show significant decrease in Zn levels compared to control subjects and oxidative stress is also implicated as a major causative factor for this NDDs [30].

In both AD and PD, disorders in Zn^{2+} and Cu^{2+} homeostasis play a pivotal role in the mechanisms of their pathogenesis. The interactions of Zn^{2+} and Cu^{2+} with amyloid precursor protein (APP), β -amyloid and Tau proteins are considered, as well as the role of these interactions in the generation of free radicals in AD and PD. The main factors of AD and PD pathogenesis, such as oxidative stress, structural disorders and aggregation of proteins,

mitochondrial dysfunction, energy deficiency that initiate a cascade of events resulting finally in the dysfunction of neuronal networks, are mediated by the disbalance of Zn^{2+} and Cu^{2+} [31].

In its turn, MS is a prototypic chronic inflammatory immune-mediated disease of the CNS, which is characterized by inflammation, oligodendrocyte depletion, reactive astrogliosis and demyelination in the brain, optic nerve and spinal cord. Usually, occurs in adults and is more common in women than men [32]. A disrupted Zn homeostasis affects the immune cells, leading to impaired activation and maturation of lymphocytes, disturbed intercellular communication via cytokines, and weakens innate host defense via phagocytosis and oxidative burst [33, 34]. Low levels of Zn have been also reported to be associated with T cell-mediated autoimmunity [35]. Indeed, Zn deficiency is reported to induce an imbalance between Th1 and Th2 cell functions and between T regulatory (Treg) and pro-inflammatory T cells, as well as a failure of the Th17 down-regulation, the major mechanisms that contribute to the pathogenesis of MS autoimmunity [35, 36].

The association between Zn deficiency and the development of MS has been supported by numerous studies, especially in the relapsing-remitting MS (RRMS) clinical form [37, 38]. Other studies showed lower levels of Zn in the plasma of MS patients compared to controls [17, 39-41].

The unbalanced immune response associated with Zn deficiency can, however, be restored by Zn integration. It was shown that Zn supplementation induces Treg cells by inhibition of Sirt-1 deacetylase [42]; as well as suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation [43].

In summary, Zn is a multipurpose metal that is vital for the growth and function of the cells. The immune system is especially affected by the modification of Zn homeostasis, specially the pathways associated with AD, PD and MS pathogenesis. Achieving an optimal immune response to different stimuli and avoiding damage of tissues and organs is a delicate balance that relies, amongst other factors, on the regulation of Zn in extracellular and intracellular compartments [22].

2.2 Mechanisms of Copper Neurotoxicity

The balance between beneficial and harmful effects of free radicals is a very important aspect of living organisms and is achieved by mechanisms called “redox regulation”. Redox

regulation protects living organisms from various oxidative stress processes and maintains “redox homeostasis” by controlling the redox status. In fact, the neurotoxic effects are attributed to increased ROS production in CNS due to inherent redox properties of Cu ions [44]. Because of its high metabolic rate and relatively capacity for cellular regulation compared with other organs, brain is believed to be particularly susceptible to the damaging effects of ROS. Manifestation of ROS damages and neurodegeneration has been related to essential metals, including Cu. The excess of Cu is neurotoxic and has been implicated in the pathogenesis of AD and PD as well as prion disease and other NDDs. Moreover, altered Zn and Cu homeostasis is implicated in several conditions, such as high Cu/Zn ratio was observed in the elderly, particularly those with NDD [45].

Cu is an essential element and an integral component of various enzymes, including Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD or SOD1), cytochrome c oxidase, dopamine β hydroxylase and monoamine oxidase, playing an important role in electron and oxygen transport, protein modification, and neurotransmitter synthesis [46]. On the other hand, excess amounts of Cu are toxic as it is a potential generator of free radicals via Fenton chemistry. Thus, Cu homeostasis must also be strictly regulated in the systemic, cellular, and subcellular levels as dysregulation causes severe consequences [47].

Dietary cupric Cu (Cu^{2+}) needs to be reduced to cuprous Cu (Cu^{1+}) before uptake across the apical membrane by Cu transporter 1 (CTR1), a high affinity Cu uptake transporter. The reduction is thought to be mediated by several reductases such as ferrireductase, duodenal cytochrome or cytochrome b reductase 1 (DCYB) and six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-2 (STEAP2) metallo-reductase. Cu^{1+} is taken up by CTR1, which localizes to the apical membrane, and early endosomes in the intestinal epithelial cells. Cu exported from the intestinal epithelial cells binds to albumin or α_2 -macroglobulin in the blood and is transported to the liver, where Cu loading onto ceruloplasmin occurs for systemic circulation. The former is functional for loading Cu to the SOD1, while the latter is necessary for Cu mobilization into the mitochondria. Excess Cu in the cytosol binds to the metallothioneins, thereby reducing free Cu ions, which is thought to be important for avoiding the toxicity caused by free Cu ions [47].

Since Cu is loosely bound to albumin, it is possible that Cu ions may be released from albumin-bound moiety at the BBB and that these free Cu ions may subsequently be

transported into the brain [47]. Two intracellular proteins, i.e., Cu-transporting P-type ATPases (ATP7A and ATP7B) belonging to a subclass of ATPases, are responsible for ATP-dependent transport of Cu across the BBB, but the distribution pattern of ATP7A and ATP7B in the BBB are unknown. Under normal physiological conditions, the BBB is impermeable to Cu. Movement of Cu across the BBB between two fluid compartments requires specific Cu transport systems. Only under certain pathological conditions, in which BBB permeability is compromised, Cu may enter the cerebrospinal fluid (CSF) through passive diffusion [48].

Regarding SOD1, this enzyme acts as a first line of defense against toxicity of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) radicals. The enzyme may also participate in cell signaling where ROS have been invoked. Although largely cytosolic, SOD1 also resides in the mitochondrial intermembrane space, where the enzyme can directly remove superoxide ($O_2^{\bullet-}$) generated from the mitochondrial respiratory chain [49].

AD is one of the biggest healthcare challenges in developed countries, which Cu and Fe toxicity is implicated in the metal hypothesis of its pathogenesis. Aaseth and coworkers [50] suggested that Fe and Cu promote A β formation/accumulation in AD plaques, and this deposition in the CNS appears to promote the progression of the A β cascade. Inside of neurons, Fe and Cu binding to hyperphosphorylated Tau protein precedes the formation of intracellular tangles. The presence of free Fe^{2+} or Cu^{1+} species will induce deleterious Fenton reactions with ROS generation and microinflammation [51].

The neurotoxic mechanism of action of Cu was classically viewed as its strong affinity to A β to help its aggregation and increase oxidative stress via Fenton reaction. Thus, it has been thought that accumulation of Cu mediates neurotoxicity and removing it from the brain prevents or reverse A β plaque burden. However, recent evidence suggests that dyshomeostasis of Cu and its valency in the body, instead of the accumulation and interaction with A β , are major determinants of its beneficial effects as an essential metal or its neurotoxic counterpart. This notion is also supported by the fact that genetic loss-of-function mutations on Cu transporters lead to severe neurological symptoms. Along with its altered distribution, it was proposed novel mechanisms of Cu neurotoxicity mediated by non-neuronal cell lineages in the brain, such as capillary endothelial cells, leading to development of AD neuropathology [1].

In its turn, Cu plays a dual role in PD. On one hand, free Cu is associated with increased oxidative stress, oligomerization of α -synuclein protein, and formation of Lewy bodies via

Fenton and Haber–Weiss reactions. On the other hand, Cu acts as a cofactor of important antioxidant enzymes, such as Cu/Zn-SOD, which reduces oxidative stress. Studies of PD patients have reported total serum or plasma Cu levels, rather than individual levels of the different pools of Cu. Theoretically, as the concentration of non-ceruloplasmin bound Cu is very low relative to total serum Cu concentrations, a clinically significant change in the highly reactive pool of non-ceruloplasmin-bound Cu may not be apparent. Taken together, these findings suggest that Cu and ceruloplasmin levels in the blood are unaltered in PD and, therefore, unlikely to represent a valid diagnostic marker or prediction tool in PD [52].

The role of Cu in MS pathology is proposed to be via excessive Cu and subsequent oxidative damage. The injury of mitochondrial electron transport system, cytochrome oxidase, and activated glia increase Cu contents. However, according to Sheykhansari et al [34], conflicting findings have also been reported. Previous results show that the elevated Cu levels found in CSF and serum of MS patients could be due to serum ceruloplasmin reduction of ferroxidase function. The latter could be the consequence, but also the triggering factor of the higher oxidative environment found in MS subjects [53].

2.3 Mechanisms of Manganese Neurotoxicity

Mn is an essential ubiquitous trace element required for normal growth, development and cellular homeostasis [54]. Daily intake of Mn through dietary sources provides the necessary amount required for several key physiological processes, including blood sugar regulation, bone formation, reproduction, metabolism of lipids, proteins and carbohydrates, antioxidant defense, and immune response. In humans and animals, Mn functions as a cofactor for maintaining the function and regulation of many biochemical and cellular reactions, including multiple enzymes, such as glutamine synthetase (GS), pyruvate decarboxylase, serine/threonine protein phosphatase I, Mn-SOD and arginase, which are required for neurotransmitter synthesis and metabolism, as well as for neuronal and glial function [55, 56].

The routes of Mn exposure are mainly through dietary intake, dermal absorption, and inhalation. Moreover, Mn in the diet is found mostly in whole grains, nuts, and seeds, tea, legumes, pineapple, and beans. Ingested Mn is absorbed in the intestine; however, molecular mechanisms of Mn uptake are not well characterized. It is thought that Mn can enter cells either

through passive diffusion or active transport via divalent metal transporter 1 (DMT-1) [57]. The gastrointestinal tract responds to dietary Mn levels to regulate Mn uptake. High Mn intake, either through dietary or environmental exposure, leads the gastrointestinal tract to absorb less Mn while the liver increases metabolism and biliary and pancreatic increases excretion, respectively. While uncommon, Mn deficiency can contribute to birth defects, impaired fertility, bone malformation, weakness, and enhanced susceptibility to seizures [58].

Mn exists in various chemical forms including oxidation states (Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{6+} , Mn^{7+}), salts (sulfate and gluconate), and chelates (aspartate, fumarate, succinate). However, Mn^{2+} and Mn^{3+} are the two common species found in human body. Since Mn^{2+} is chemically more stable than Mn^{3+} in the body, Mn is mainly incorporated into metalloenzymes in the form of Mn^{2+} [56]. Ceruloplasmin effectively oxidizes Mn^{2+} to Mn^{3+} and this trivalent oxidation state, though a minor form of Mn in the circulation, has been shown to access the CNS via a transferrin receptor (TfR)- mediated mechanism. In contrast to the Mn^{3+} , Mn^{2+} is readily transported into the brain, either as a free ion species or as a nonspecific protein-bound species [59].

The abundant manganoprotein glutamine synthetase (GS) is predominantly expressed in astrocytes and synthesizes glutamine via the conversion of glutamate to glutamine. As Mn has been suggested to regulate GS activity, low levels of Mn reduce GS activity in the brain. As consequence, increased glutamate trafficking and glutamatergic signaling results in excitotoxicity through an excessive amount of glutamate at the synapse [60].

Mn^{2+} is a central component of some metalloenzymes and an activator of many metal-enzyme complexes and activates these enzymes by binding the protein directly or by acting through an intermediate interaction with a substrate, like ATP, to initiate a conformational change and activate enzymatic activity. Mn^{3+} is found in the essential enzymes like CAT and Mn superoxide dismutase (MnSOD), both of which break down oxidants using the Mn^{3+} in their reactive catalytic centers. Mn serves as a cofactor for MnSOD that catalyzes superoxide to hydrogen peroxide through the $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ cycle and thereby detoxifies free radicals in the mitochondria to prevent oxidative stress. On the other hand, the $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ cycle can trigger dopamine auto-oxidation, which is one of proposed mechanisms for Mn-induced neurotoxicity [61]. CAT converts hydrogen peroxide into oxygen and water, aiding in reducing oxidative stress. MnSOD is involved in the dismutation of superoxide in mitochondria to decrease

oxidative stress, which is also significant in Mn-induced dopaminergic (DAergic) neurodegeneration [62, 63]. Therefore, the Mn redox cycle contributes to both nutritional metabolism and toxic effects on biological function [64].

A growing body of literature indicates the role of Mn in NDDs [65]. Despite its essentiality, Mn is toxic to the CNS at excessive levels. Overexposure from environmental sources can result in a condition known as manganism that features symptomatology similar to PD. Manganism is an extrapyramidal, parkinson-type movement disorder that presents with debilitating motor and cognitive deficits that arise from a neurodegenerative process [66].

Despite its essential role in multiple metabolic functions, excessive Mn exposure can accumulate in the brain and has been associated with dysfunction of the basal ganglia system that causes a severe neurological disorder similar to PD. Although Mn-induced parkinsonism and PD are pathologic and clinically distinct, both disorders share generalized bradykinesia and widespread rigidity, as well as broadly similar pathophysiological mechanisms such as oxidative stress, protein aggregation, impaired proteasomal and autophagy functions, excitotoxicity, aberrant signal transduction, mitochondrial dysfunction and cell death pathways [64]. Mn overload affects two vital organs, the brain and lungs; the latter results from inhalation [67]. The dystonic high-stepping gait disturbance associated with Mn poisoning is easily distinguishable from the shuffling gait of PD [68].

In PD, Mn toxicity is characterized by motor and sensory disturbances, as well as neuropsychiatric and cognitive deficits. The motor impairments include hypertonia with cogwheel rigidity, bradykinesia, “cock-gait”, rapid postural tremor, and tendency to fall when walking backwards. In human patients and animal models, neurons of the globus pallidus appear to be most sensitive to Mn-induced degeneration while the striatum is less severely affected. Other brain areas that may be affected in Mn toxicity include the cerebellum, red nucleus, pons, cortex, thalamus, and anterior horn of the spinal cord. So, this pathologic phenotype is distinct from idiopathic PD, where dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta are specifically degraded [69].

Increasing evidence has shown that Mn is potentially involved in the progression of AD. It has been reported that AD patients have a deregulated metabolism of Mn, and a dysfunction of the Mn-SOD scavenger system, associated with the formation of senile plaques. Reduced mitochondrial MnSOD activities have been found in the brain of neuropathology confirmed AD

patients. Moreover, it has been reported that the transport of Mn across the BBB is regulated by Fe, and perturbed Fe distribution has been implicated in the pathogenesis of AD [30].

In order to maintain a balance between its essentiality and neurotoxicity, several mechanisms exist to properly buffer cellular Mn levels. These include transporters involved in Mn uptake, and newly discovered Mn efflux mechanisms [70]. Mn is transported to the CNS either as a free ion or as a non-specific protein-bound species. Transport of Mn^{2+} is mediated, at least in part, by the family of natural resistance-associated macrophage proteins, the DMT-1. In the Mn^{3+} oxidation state, Mn complexes with transferrin and, in a similar manner to Fe, is transported by a Tf receptor-mediated mechanism. Genetics factors influence Mn toxicity, for example, mutations in one of Mn exporters (*SLC30A10*) result in liver impairments and neurological disfunction [70].

Mn accumulates primarily in the globus pallidus, γ aminobutyric-acid (GABAergic) neurons of the basal ganglia, but the effects of Mn on GABAergic neurotransmission are controversial. Kuakye and coworkers [69] included a variety of results such no statistical difference in the GABA levels in Mn-exposed groups. It's possible that the conflicting effects of Mn on GABA homeostasis are due to diverse experimental techniques used to examine the effect of extracellular GABA homeostasis and transport dynamics, but more research is necessary to establish the effect of Mn exposure on GABA neurotransmission. Actually, the basal ganglia have been more studied because Mn intoxication patients often show symptoms that resemble those of PD; therefore, the basal ganglia have been targeted as a putative location for studies on Mn toxicity [71]. Among different sub-cortical structures, the basal ganglia have been investigated as a putative anatomical biomarker in magnetic resonance imaging-based studies of Mn toxicity. The striatum and the globus pallidus, structures of the basal ganglia, are thought to be the primary targets of Mn accumulation in the brain. However, other brain areas that may be affected in Mn toxicity include the cerebellum, red nucleus, pons, cortex, thalamus, and anterior horn of the spinal cord [69].

Astrocytes accumulate higher levels of Mn than neurons and are therefore considered an important target cell for transport of Mn into the brain as well as for initiating inflammatory signaling during neuronal stress and injury. Astrocytes serve as the major homeostatic regulator and storage site for Mn in the brain and are a prominent contributor to Mn-stimulated nitric oxide (NO) production through inducible nitric oxide synthetase (iNOS). Results of an experimental

study with immunopurified cultures of primary microglia and astrocytes demonstrate that microglia directly accumulate Mn and develop a mixed inflammatory phenotype characterized by release of IL-6, TNF- α , and the CC chemokines CCL2 and CCL5. The results show that products from Mn-activated microglia are essential for neuroinflammatory activation of Mn-exposed astrocytes and that NF- κ B-dependent release of TNF- α from microglia is a key signaling event in microglia regulating these glial-glia interactions [72, 73].

Compared with neurons, astrocytes have a greater tendency to accumulate Mn and its neuroimmunotoxicity is associated with altered glial function and secondary impairment of astrocyte-dependent neuronal functions [63]. Glial cells are an important target of Mn in the brain, both for sequestration of the metal, as well as for activating inflammatory signaling pathways that damage neurons through overproduction of numerous ROS and RNS, as well as inflammatory cytokines [73].

Mitochondria is the primary storage site for intracellular Mn and the elevation of Mn levels in this organelle can directly interfere with oxidative phosphorylation for inhibiting the function of F1-ATPase and consequently with cellular ATP synthesis [62]. In turn, elevated intra-mitochondrial Mn levels trigger oxidative stress generating the excessive ROS, causing mitochondrial dysfunction. The transition of Mn⁺² to Mn⁺³ increases its pro-oxidant capacity. Mn-induced oxidative stress leads to the opening of mitochondrial transition pore, resulting in increased solubility to protons, ions and solutes, loss of the mitochondrial inner membrane potential, impairment of oxidative phosphorylation and ATP synthesis and mitochondrial swelling [74]. Furthermore, Mn exposure has also been linked to the activation of signaling pathways involved in response to oxidative stress, including NF- κ B and activator protein-1 (AP-1) [75].

Besides, Mn has been shown to trigger apoptosis in dopaminergic neurons in a caspase-3-dependent manner by activation of protein kinase C delta (PKC- δ) and to cause apoptotic cell death in astrocytes by mitochondrial pathways involving cytochrome c release and caspase activation [76]. Mechanism of Mn toxicity also involves a proinflammatory role with the activation of glial cells that is characterized by the release of non-neuronal derived ROS, such as nitric oxide (NO), prostaglandins and hydrogen peroxide. Mn also cause increased release of several cytokines, including tumor necrosis factor (TNF- α), IL-6, IL-1 β from the activated glial cells, so activating various transcription factors including NF- κ B [63].

In MS, the activation of microglia precedes astrogliosis and overt neuronal loss. Although microgliosis is implicated in Mn neurotoxicity, the role of microglia and glial crosstalk in Mn-induced neurodegeneration is poorly understood. Recent results provide evidence that NF- κ B signaling in microglia plays an essential role in inflammatory responses in Mn neurotoxicity by regulating cytokines and chemokines that amplify the activation of astrocytes [72].

Taken together, Mn has an important role in neurological homeostasis but in excess has been associated with a neurological syndrome comprising cognitive deficit, neuropsychological abnormalities and parkinsonism. For this reason, in the last decade there has been significant progress using state-of-the-art neuroimaging and behavioral methodologies that have opened up a new understanding of Mn neurotoxicology.

2.4 Mechanisms of Iron Neurotoxicity

In normal human plasma, Fe exists primarily in the Fe³⁺ form and is complexed with the high affinity iron binding protein transferrin in a 2:1 ratio. Inside the cell, free Fe in its reduced form (Fe²⁺) constitutes the Fe pool, which supplies Fe²⁺ molecules as cofactors for many Fe²⁺-dependent enzymes in the cytosol, mitochondria, and nucleus [77]. Fe is essential for proper physiological activities of all living organisms. It is commonly found in the form of heme containing proteins, as a cofactor in Fe-sulfur cluster containing proteins, and as Fe ion containing proteins [78]. Hemoglobin, cytochromes, catalases and peroxidases are examples of proteins that consist of heme Fe [80]. Their main function includes oxygen transport, activation and storage, electron transport and cellular respiration [79, 80]. CAT, one of the foremost antioxidant enzymes in oligodendrocytes contains four heme groups; its production and maintenance is therefore dependent on a constant supply of Fe. If the CAT antioxidant system fails, oligodendroglial cell death may follow [81].

The absorption of metals from dietary sources occurs by a number of metal transporters to provide specific needs for individual nutrient metals. In particular, the DMT-1 is a major Fe transporter essential for its absorption from diet. Fe bioavailability is affected by valence state, form, solubility, particle size, and complexation which in turn may be affected by the food matrix. DMT-1 also plays an important role in the uptake of several other divalent metals, including Mn. Since the expression levels of DMT-1 are regulated by several factors, such as

body Fe status, gene polymorphism and inflammation changes in DMT-1 could also alter the transport and neurotoxicity of metals. For example, Fe deficiency up-regulates intestinal DMT-1 levels and increases the absorption of Mn and neurotoxicity [82].

Fe is likely an integral part of metabolism because it can gain (ferric to ferrous, or Fe^{3+} to Fe^{2+}) or lose (Fe^{2+} to Fe^{3+}) electrons relatively easy. Fe has a functional split personality in the CNS where it is essential for life yet toxic if levels are perturbed. At the cellular level, Fe is required for the cell growth; however, excessive Fe (Fe overload) causes oxidative stress and cell death. Fe levels are tightly regulated in a process referred to as Fe homeostasis. The main protective strategy to avoid Fe overload in the brain is the BBB, which limits Fe via highly regulated, selective transport systems [77].

Within the brain, multiple feedback loops form an elaborate control system for cellular Fe levels to ensure that a precisely balanced Fe level exists for normal function of the CNS. Fe-induced oxidative stress is particularly dangerous because it can cause further Fe release from Fe-containing proteins such as ferritin, heme proteins, and Fe-sulfur clusters, forming a destructive intracellular positive-feedback loop that exacerbates the toxic effects of brain Fe overload. In the brain, Fe uptake is through the BBB. Fe is taken up by the capillary endothelial cell TfR, in the form of transferrin- Fe^{3+} [77].

Fe is transported to cerebral compartment from the basolateral membrane of endothelial cells and is then made available to neurons and glia. Of note, oligodendrocytes stained for most of the detectable Fe in the brain. Transferrin is also found predominantly in these cells, which is important for myelination formation. Although ependymal cells can mediate Fe absorption into the brain from the blood, their contribution is thought to be rather small [13].

During aging, different Fe complexes accumulate in specific brain regions, which are associated with motor and cognitive dysfunction, although the etiology of the deposits differs. In AD, PD and MS changes in local Fe homeostasis result in altered cellular Fe distribution and accumulation, ultimately inducing neurotoxicity [60].

Bound Fe is considered safe, but free Fe is more likely to exchange electrons with nearby molecules and produce free radicals. Normal metabolic processes in the mitochondria form hydrogen peroxide as the result of molecular reduction of oxygen. Hydrogen peroxide alone is not particularly toxic, but in the presence of free Fe a hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) is formed when free Fe donates an electron to hydrogen peroxide via the Fenton reaction. This free radical can interact

with oxygen and other molecules in the brain to form more free radicals propagating a deleterious positive feedback loop. Hydroxyl radicals can attack proteins, DNA, and lipid membranes. This process can disrupt cellular integrity and function eventually leading to oxidative stress and cell apoptosis [83].

Fe deficiency can also enhance absorption of divalent metals, such as lead (Pb), cadmium (Cd), aluminum (Al), and Mn. Fe deficiency can enhance brain Mn accumulation even in the absence of excess Mn in the environment or the diet. For this event, the effects of Fe deficiency on Mn transport have been documented. Previous studies have shown that Fe deficiency increases blood levels of Mn in adults [84].

Fe and Mn, as well as other essential metals, are regulated within the CNS by influx into the brain via transferrin and TfRs, as well as via DMT-1; as such, there is an inverse relationship between Mn and Fe. Fe deficiency increases transferrin and DMT-1, facilitating Mn uptake. Consequently, Fe deficiency can lead to increased Mn accumulation in the brain and vice versa. Fe and Mn compete for the same carrier transport system; both TfR and DMT-1 regulate their influx into the brain [85]. Likewise, other essential metals sharing the transporters may be altered by imbalances in Fe and/or Mn [86]. Neonatal rats exposed to either a low-Fe diet (ID) or a low-Fe diet supplemented with Mn (IDMn) via maternal milk during the lactation period had decreased Fe and increased Cu brain levels; IDMn pups also had increased brain levels of several other essential metals including Mn, chromium (Cr), Zn, cobalt (Co), Al, molybdenum (Mo), and vanadium (V), as well as DMT-1 and TfR. The results of this study confirmed that there is homeostatic relationship among several essential metals in the brain and not simply between Fe and Mn. Indeed, Fe deficiency is a known risk factor for metal toxicity, resulting in enhanced absorption and accumulation of divalent metals [87].

Fe deficiency is associated with increased accumulation of Mn in the brain in a region-specific manner; elevated Mn levels observed with Fe deficiency are more pronounced in the caudate putamen and globus pallidus. A clinical study evaluated the Mn level in the brain of Fe deficient/anemic patients and the results showed that Fe deficiency was correlated with increased Mn deposition in the basal ganglia. In contrast, Mn levels in the globus pallidus were minimally affected in anemic humans. Moreover, dietary Fe deficiency up-regulated the expression of DMT-1 in the intestine, resulting in increased basal levels of Mn in various tissues, including brain, heart, kidney, testis, femoral muscle and tibia [64].

Fe and its deregulated homeostasis have been proposed to have a role in the pathogenesis of PD because of its pro-oxidant characteristics that may lead to ROS generation via Fenton and Haber-Weiss reactions. However, epidemiological evidence concerning the possible association between Fe and PD remains still controversial. In meta-analysis of available case-control studies, Mostile and coworkers [88] state there are still not sufficient evidence supporting higher or lower serum levels of Fe in PD patients as compared to controls, assuming this may be related to metal exposure or pathological processes in such subjects.

Despite the important roles of Fe in the brain, there is evidence supporting a strong link between high brain Fe concentrations and Fe-induced neurotoxicity. Fe accumulation has been identified in the substantia nigra of PD patients. It acts as a co-factor for tyrosine hydroxylase, enzyme that limits the dopamine synthesis, as well as free Fe is toxic to the cell [89]. In AD, a diffuse accumulation of Fe occurs in various regions, for example, cortex and hippocampus, with Fe marginally increased in the senile plaques. In MS, elevated levels of Fe occur in certain brain regions, such as the thalamus and striatum, which may be due to inflammatory processes disrupting the BBB and attracting Fe-rich macrophages. Moreover, reduced axonal clearance of Fe has been postulated to promote disease activity by amplifying the activated microglia, promoting mitochondrial dysfunction and catalyzing the production of ROS [51].

Oligodendrocytes need Fe for the extremely high energy requirements of producing and maintaining the complex myelin sheath which is many times larger than the cell body, indicating that Fe deficiency could seriously compromise the viability of these cells. Fe is essential for many of biochemical reactions, such as cholesterol synthesis, which occurs at a higher rate in oligodendrocytes than any other cell type in the brain. Fe is also a prerequisite for the maturation of oligodendrocyte precursor cells into oligodendrocytes [90].

The death of oligodendrocyte in MS is associated with the demyelination, the content of the extracellular milieu (the interstitial fluid) being increased, thereby amplifying oxidative stress in axons has been postulated to promote disease activity by amplifying the activated microglia, promoting mitochondrial dysfunction and catalyzing the production of ROS [91].

In MS, data is emerging indicating that this Fe could participate in pathogenesis by various mechanisms, for example, promoting the production of ROS, increasing the production of proinflammatory cytokines and accumulation with white matter injury [83]. Duck and Connor [92] demonstrated that Fe across BBB both a transcytotic and an endocytic mechanism primarily

transferrin-dependent by which Fe is released from transferrin in the endosome for export into intercellular Fe pool.

Increased Fe deposition in cerebral deep gray matter has been considered a global marker for neurodegeneration in MS. Cerebral Fe levels are highest in deep gray matter and are associated with age, and disease duration and disability in MS [93]. Elevated levels of Fe accumulation in deep gray matter nuclei in MS have been reported using different Fe-sensitive magnetic resonance imaging measures, with studies focusing particularly on the large basal ganglia nuclei (caudate, putamen, globus pallidus, and the thalamus). A study revealed that increased Fe in the globus pallidus, measured using quantitative susceptibility mapping, was moderately associated with a lower cognitive composite score in MS patients and suggested a specific role of globus pallidus Fe accumulation in global cognitive functions, irrespective of globus pallidus atrophy, implying that Fe accumulation in this structure may have a unique role in globally affecting cognitive processes in MS [94].

Increased Fe^{3+} in the vicinity of lesions in MS suggests the presence of proinflammatory nonphagocytizing M1 macrophages. Conversely, actively demyelinating lesions contain a high number of myelin laden M2 anti-inflammatory macrophages, which contain small amounts of Fe^{3+} [95]. One obvious source of immune uptake of free Fe in the vicinity of lesions is oligodendrocyte destruction in MS, which contain profound amounts of Fe because of their role in myelin production [96]. Elevated Fe in MS deep gray matter may occur as a compensation mechanism for enhanced oxidative stress and may be uptaken in neurons via astrocyte end-feet processes, passage through voltage-gated calcium channels, and/or ferritin uptake through heavy chain subunit (H)-ferritin receptors. TfR upregulation could also account for elevated Fe levels in patients with secondary progressive SPMS [97].

Some studies suggest that Fe insufficiency may play a role in MS disease progression as MS patients display clinical improvement upon Fe supplementation. However, other studies indicate improved disease outcome in Fe-limited MS patients. It is possible that inadequate Fe levels (both low and high) may be harmful in MS since Fe excess might elevate oxidative stress, while Fe reduction could decrease immune system function and cause an energy deficit due to loss of mitochondria membrane potential [90].

So, although Fe is vital for normal neuronal metabolism and in excessive levels may be harmful for life. It's indisputable that the transport and metabolism of brain Fe and where it

normally accumulates with aging and that the hypothesis that excessive brain Fe can lead to free radical damage, lipid peroxidation, and cellular death. In conclusion, it is essential that the brain remains in a homeostasis with low inflammation and low Fe content in order to sustain health and longevity [51].

The **Figure 2** shows the interaction of the essential metals Mn, Zn, Cu and Fe with the CNS through the breakdown of the BBB, with emphasis on microglia activation, MMP cofactor metals, Fe deposition in the brain, increased production of IO&NS, and neurodegeneration.

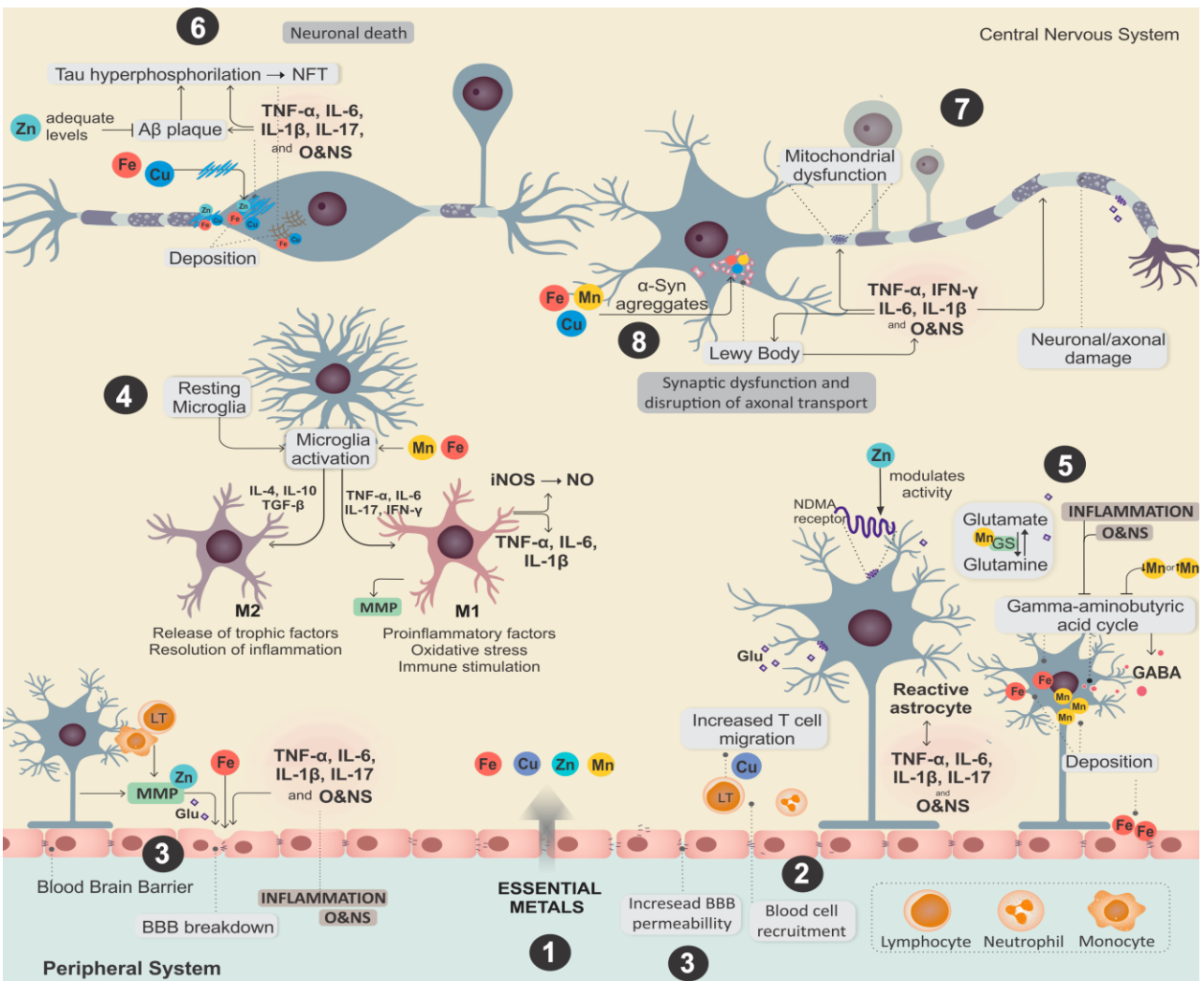


Figure 2 Related events with the interaction of the essential metals zinc, copper, manganese and iron with the central nervous system through the breakdown of the blood-brain barrier. 1) The interaction of the essential metals zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), and iron (Fe) with the Central Nervous system (CNS) through the breakdown of the blood-brain-barrier (BBB). 2) The inflammatory immune response, as well as the oxidative nitrosative stress, lead to neurodegeneration through different mechanisms, such as those mediated by blood cells recruitment; 3) matrix metalloproteinases (MMP), a family of proteolytic zinc-containing enzymes involved in physiological as well as in pathological conditions; 4) proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-17, and interferon (IFN)- γ

released by microglia activated (M1); on the other hand, microglia M2 participates with the release of trophic factors and anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β in order to mediate the inflammation; 5) Moreover, the essential metals are involved in different injurious mechanisms in CNS. High or low levels of Mn inhibit the gamma-aminobutyric acid (GABA) cycle, high levels of Mn and Fe activate the microglia, high levels of Fe result in iron storage in the brain cells, Zn and Fe participate of the BBB breakdown; 6) the immune-inflammatory through the proinflammatory cytokines and oxidative and nitrosative stress (O&NS) molecules exert deleterious effect on the brain cells, such as Tau hyperphosphorylation with the formation of neurofibrillary tangles, aggregates of hyperphosphorylated Tau protein are most commonly known as a primary marker of Alzheimer disease (AD); 7) Demyelination and axonal injury; oligodendrocyte death; and mitochondrial dysfunction; 8) Zn inhibits the formation of A β plaque, high levels of Fe, Mn and Cu participate in the formation α -synuclein aggregates in intracellular inclusions, called Lewy Body, another marker of PD, that result in synaptic dysfunction and interruption of axonal transport. All these metal-mediated events contribute to the enhancement of the inflammatory and O&NS damage mechanisms.

3 Conclusions

As many of the NDDs are associated with aging, immunological causes, as well as environmental factors and epigenetic modifications, the scientific community observes an increased number of disabling patients; however, this fact is not being matched by advances in understanding and treatment of these diseases. As we show, essential metals, such as Zn, Cu, Mn and Fe probably exert critical roles in the pathophysiology of AD, PD and MS. These metals accumulate in different brain regions at different levels. Therefore, it is difficult to isolate their specific toxicity. So, the maintenance of homeostasis of these metals is critical as any substantial change can lead to neurotoxic outcomes. A better comprehension of the possible mechanisms associated with the disrupted homeostasis of these metals may improve the acceptance of essential and heavy metals as key point in brain and NDDs.

Delineating the specific mechanisms by which metals alter redox homeostasis is essential to understand the pathological processes of some NDDs and may provide possible new targets for the prevention of AD, PD, and MS, as well as for the treatment of the patients affected by these NDDs.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Hsu HW, Bondy SC, Kitazawa M (2018) Environmental and dietary exposure to copper and its cellular mechanisms linking to Alzheimer disease. *Toxicol Sci* 1;163(2):338-345. doi: 10.1093/toxsci/kfy025.
2. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM (2019) The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem.* 195:120-129. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013.
3. Garza-Lombó C, Posadas Y, Quintanar L, Gonsebatt ME, Franco R (2018) Neurotoxicity linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: Redox signaling and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 28(18):1669-1703. doi: 10.1089/ars.2017.7272.
4. Kovacs GG (2016) Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: turning towards precision medicine. *Int J Mol Sci.* 17(2):189. doi: 10.3390/ijms17020189
5. Kumar N, Abboud H (2019) Iatrogenic CNS demyelination in the era of modern biologics. *Mult Scler.* 15:1352458519828601. doi: 10.1177/1352458519828601.
6. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A (2018) Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res.* 2018:4784268. doi: 10.1155/2018/4784268.
7. von Bernhardt R, Eugenín J (2012) Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenica mechanisms *Antioxid Redox Signal.* 16(9):974-1031. doi: 10.1089/ars.2011.4082.
8. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Signorelli SS, Ferrante M, Zappia M, Nicoletti A (2017) Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environ Res* 159: 82–94. doi: 10.1016/j.envres.2017.07.048.
9. Kawahara M, Kato-Negishi M, Tanaka K (2017) Cross talk between neurometals and amyloidogenic proteins at the synapse and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Metallomics* 9(6): 619-633. doi: 10.1039/c7mt00046d.
10. Pandey S, Singh B, Yadav SK, Mahdi AA (2018) Novel biomarker for neurodegenerative diseases- motor neuron disease (MND), cerebellar ataxia (CA) and Parkinson's disease (PD). *Clin Chim Acta* 485:258-261. doi: 10.1016/j.cca.2018.07.021.
11. Islam T (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction linked neurodegenerative disorders *Neurol Res* 39(1): 73-82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711.
12. Bhat AH (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother* 74:101–110. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.025.

13. Liu H, Wu J, Yao JY, Wang H, Li ST (2017) The role of oxidative stress in decreased acetylcholinesterase activity at the neuromuscular junction of the diaphragm during sepsis. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:9718615. doi: 10.1155/2017/9718615.
14. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A (2016) Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* 1(1):1003.
15. Chen P, Parmalee N, Aschner M (2014) Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. *Front Genet* 5:265. doi: 10.3389/fgene.2014.00265.
16. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N (2015) The physiological, biochemical, and Molecular roles of zinc transporters in Zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev* 95: 749–784. doi: 10.1152/physrev.00035.2014.
17. Bredholt M, Frederiksen JL (2016) Zinc in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ASN Neuro* 1–9. doi: 10.1177/1759091416651511.
18. Chen P, Miah MR, Aschner M (2016) Metals and Neurodegeneration F1000 Research 5 (F1000 Faculty Rev):366. doi: 10.12688/f1000research.7431.1.
19. Lee SR (2018) Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 9156285. doi:10.1155/2018/9156285.
20. Kimura T, Kambe T (2016) The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci* 17(3):336. doi: 10.3390/ijms17030336
21. Szewczyk G, Rak J, Ruth JH (2013) Inflammatory mediators of angiogenesis. *Mediators Inflamm*. 2013:610543. doi: 10.1155/2013/610543.
22. Gammoh NZ, Rink, L (2017) Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* 9(6): 624. doi:10.3390/nu9060624.
23. Costarelli L, Muti E, Malavolta M, Cipriano C, Giacconi R, Tesei S, Piacenza F, Pierpaoli S, Gasparini N, Faloi E, Tirabassi G, Boscaro M, Polito A, Mauro B, Maiani F, Raguzzini A, Marcellini F, Giuli C, Papa R, Emanuelli M, Lattanzio F, Mocchegiani E (2010) Distinctive modulation of inflammatory and metabolic parameters in relation to zinc nutritional status in adult overweight/obese subjects. *J Nutr Biochem* 21 (5):432–437. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.02.001.
24. Bao B, Ahmad A, Azmi A, Li Y, Prasad AS, Sarkar FH (2013) The biological significance of zinc in inflammation and aging. In: Rahman I, Bagchi D, editors. *Inflammation, Advancing and Nutrition*. New York, NY: Elsevier Inc p.15–27.
25. Grabrucker AM, Rowan M, Garner CC (2011) Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review. *Drug Deliv Lett* 1(1): 13–23.

26. Cristóvão JS, Santos R, Gomes CM (2016) Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* Article ID 2016:9812178. doi: 10.1155/2016/9812178.
27. Alzheimer's Association (2017) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 13(4). doi: 10.1016/j.jalz.2017.02.001.
28. Mlyniec K (2015) Zinc in the Glutamatergic Theory of Depression. *Curr Neuropharmacol*. 13(4):505-13.
29. Olesen RH, Hyde TM, Kleinman JE, Smidt K, Rungby J, Larsen A (2016) Obesity and age-related alterations in the gene expression of zinc-transporter proteins in the human brain. *Transl Psychiatry* 6(6): e838. doi: 10.1038/tp.2016.83.
30. Du K, Liu M, Pan Y, Zhong X, Wei M (2017) Association of Serum Manganese with Alzheimer' Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 9(3):231. doi:10.3390/nu9030231.
31. Stelmashook EV, Isaev NK, Genrikhs EE, Amelkina GA, Khaspekov LG, Skrebitsky VG, Illarionov SN (2014) Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemistry*. 79(5):391-6. doi: 10.1134/s0006297914050022.
32. Mirshafiey A, Asghari B, Ghalamfarsa G, Jadidi-Niaragh F, Azizi G (2014) The significance of matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis and treatment of Multiple Sclerosis. *Sultan Qaboos University Med J* 14(1):13-25.
33. Maares M, Haase H (2016) Zinc and Immunity: an essential interrelation. *Arch Biochem Biophys* 611: 58-65. doi: 10.1016/J.Abb.2016.03.022.
34. Sheykhansari S, Kozielski K, Bill J, Sitti M, Gemmati D, Zamboni P, Singh AV (2018) Redox metals homeostasis in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Cell Death Dis*. 9(3):348. doi: 10.1038/s41419-018-0379-2.
35. Pawlitzki M, Uebelhör J, Sweeney-Reed CM, Stephanik H, Hoffmann J, Lux A, Reinhold D (2018) Lower Serum Zinc Levels in Patients with Multiple Sclerosis Compared to Healthy Controls. *Nutrients* 10(8): 967. doi:10.3390/nu10080967.
36. Li YF, Zhang SX, Ma X, Xue YL, Gao C, Li XY (2017). Levels of peripheral Th17 cells and serum Th17-related cytokines in patients with multiple sclerosis.: a meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 18:2-25. Doi 10.1016/j.msard.2017.09.003.
37. Choi S, Liu X, Pan Z (2018) Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 39(7):1120-1132. doi: 10.1038/aps.2018.25.

38. Pan Z, Choi S, Ouadid-Ahidouch H, Yang JM, Beattie JH, Korichneva I (2017) Zinc transporters and dysregulated channels in cancers. *Front Biosci* 1;22: 623-643.
39. Socha K, Karpinska E, Kochanowicz J, Soroczynska J, Jakoniuk M, Wilkiel M, Mariak ZD, Borawska MH (2017) Dietary habits; concentration of copper, zinc, and Cu-to-Zn ratio in serum and ability status of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Nutrition*. 39:76–81.
40. Popescu BF, Frischer JM, Webb SM, Tham M, Adiele RC, Robinson CA, Fitz-Gibbon PD, Weigand SD, Metz I, Nehzati S, et al (2017) Pathogenic implications of distinct patterns of iron and zinc in chronic MS lesions. *Acta Neuropathol*. 134: 45–64.
41. Sanna A, Firinu D, Zavattari P, Valera P (2018) Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 11;10(1). pii: E68. doi: 10.3390/nu10010068.
42. Rosenkranz E, Metz CH, Maywald M, Hilgers RD, Wessels I, Senff T, Haase H, Jager M, Ott M, Aspinall R, et al (2016) Zinc supplementation induces regulatory T cells by inhibition of Sirt-1 deacetylase in mixed lymphocyte cultures. *Mol. Nutr. Food Res*. 60: 661–667.
43. Kitabayashi C, Fukada T, Kanamoto M, Ohashi W, Hojyo S, Atsumi T, Ueda N, Azuma I, Hirota H, Murakami M, et al (2010) Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *Int. Immunol*. 22, 375–386.
44. Rana S, Prasoon A, Sadhukhan P, Jha PK, Sathe V, Barman SR, Ballav N Spontaneous Reduction of Copper (II) to Copper (I) at Solid-Liquid Interface (2018) *J Phys Chem Lett*. 9(21):6364-6371. doi: 10.1021/acs.jpcclett.8b02844.
45. Hane FT, Hayes R, Lee BY, Leonenko Z (2016) Effect of Copper and Zinc on the Single Molecule Self-Affinity of Alzheimer's Amyloid- β Peptides. *PLoS ONE* 11(1):e0147488. doi: 10.1371/journal.pone.0147488.
46. Kawamata H, Manfredi G (2010) Import, Maturation, and Function of SOD1 and Its Copper Chaperone CCS in the Mitochondrial Intermembrane Space. *Antiox Redox Signal* 13(9):1375-1384. doi: 10.1089/ars.2010.3212.
47. Nishito Y, Kambe T (2018) Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2018;64(1):1-7. doi: 10.3177/jnsv.64.1.
48. Zheng W, Monnot AD (2012) Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 133(2): 177-88. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.006.
49. Wang L, Duan Q, Wang T, Ahmed M, Zhang N, Li Y, Li L, Yao X (2015) Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors Involved in ROS Production Induced by Acute High Concentrations of Iodide and the Effects of SOD as a Protective Factor. *Oxid Med Cell Longev*. 2015:217670. doi: 10.1155/2015/217670.

50. Aaseth J, Alexander J, Bjørklund G, Hestad K, Dusek P, Roos PM, Alehagen U (2016) Treatment strategies in Alzheimer's disease: a review with focus on selenium supplementation. *Biometals* 29:827–39. doi: 10.1007/s10534-016-9959-8.
51. Ward RJ, Dexter DT, Crichton RR (2015) Ageing, neuroinflammation and neurodegeneration. *Front Biosci* 7:189-204.
52. Davies KM, Mercer JF, Chen N, Double KL (2016) Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Apr;130(8):565-74. doi: 10.1042/CS20150153.
53. De Riccardis L, Buccolieri A, Muci, M, Pitotti, E, De Robertis F, Trianni G, Manno D, Maffia M (2018) Copper and ceruloplasmin dyshomeostasis in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis subjects. *Biochim Biophys Acta* 1864(5): 1828-1838. doi: 10.1016/J.Bbadis.2018.03.007.
54. Erikson KM, Syversen T, Aschner J, Aschner M (2005) Interactions between excessive manganese exposure and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environ Toxicol Pharmacol*. 19:415–421.
55. Erikson KM, Aschner M (2003) Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochem Int*. 43:475-480.
56. Horning KJ, Caito SW, Tipps KG, Bowman AB, Aschner M (2015) Manganese Is Essential for Neuronal Health. *Annu Rev Nutr*. 2015; 35:71–108.
57. Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W (2007) Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 221:131–147.
58. Aschner M, Shanker G, Erikson K, Yang J, Mutkus LA (2002) The uptake of manganese in brain endothelial cultures. *Neurotoxicology*. 23:165–168.
59. Aschner M, Dorman Dc (2006) Manganese: Pharmacokinetics and molecular mechanisms of brain uptake. *Toxicol Rev*. 25(3):147-54.
60. Lewerenz J, Maher P (2015) Chronic Glutamate toxicity in neurodegenerative diseases – What is the evidence? *Front. Neurosci*. 9: 469. doi: 10.3389/fnins.2015.00469.
61. Peres TV Schettinger MR, Chen P Carvalho F, Avila DS Bowman AB, Aschner M (2016) Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies. *BMC Pharmacol Toxicol*. 17(1):57. doi: 10.1186/s40360-016-0099-0
62. Martinez-Finley EJ, Gavin CE, Aschner M, Gunter TE (2013) Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 62: 65–75. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.032.

63. Karki P, Lee E, Aschner M (2013) Manganese neurotoxicity: a focus on glutamate transporters. *Ann Occup Environ Med.* 25(1):4. doi:10.1186/2052-4374-25-4.
64. Ye Q, Park JE, Gugnani K, Betharia S, Pino-Figueroa A, Kim J (2017) Influence of iron metabolism on manganese transport and toxicity. *Metallomics.* 9(8):1028-1046. doi: 10.1039/c7mt00079k.
65. Bowman AB, Kwakye GF, Hernández EH, Aschner M (2011) Role of manganese in neurodegenerative diseases. *J Trace Elem Med Biol.* 25(4): 191–203. doi:10.1016/j.jtemb.2011.08.144.
66. Chen P, Chakraborty S, Mukhopadhyay S, Lee E, Paoliello MM, Bowman AB, Aschner M (2015) Manganese homeostasis in the nervous system. *J Neurochem* 134(4):601–610. doi: 10.1111/jnc.13170.
67. Aschner M, Aschner JL (1991) Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev.* 15:333–340.
68. Ratner, MH, Fitzgerald, E (2016) Understanding of the role of manganese in parkinsonism and Parkinson disease. *Neurology.* 88(4):338–339. doi:10.1212/wnl.0000000000003543.
69. Kwakye GF, Paoliello MM, Mukhopadhyay S, Bowman AB, Aschner M (2015) Manganese-Induced parkinsonism and Parkinson's disease: shared and distinguishable features. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12, 7519–7540. 10.3390/ijerph120707519
70. Chen P, Bowman AB, Mukhopadhyay S, Aschner M (2015). SLC30A10: A novel manganese transporter. *Worm* (3):e1042648. doi:10.1080/21624054.2015.1042648.
71. Lao Y, Dion LA, Gilbert G, Bouchard MF, Rocha G, Wang Y, Leporé N, Saint-Amour D (2017) Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese. *Sci Rep.* 3;7: 41804. doi: 10.1038/srep41804.
72. Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, Legare ME, Tjalkens RB (2017) Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J Neuroinflammation.* 14(1):99. doi:10.1186/s12974-017-0871-0.
73. Tjalkens RB, Popichak KA, Kirkley KA (2017) Inflammatory Activation of Microglia and Astrocytes in Manganese Neurotoxicity. *Adv Neurobiol.* 18:159-181. doi: 10.1007/978-3-319-60189-2_8.
74. Milatovic D, Gupta RC, Yu Y, Zaja-Milatovic S, Aschner, M (2011) Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 256(3): 219–26. doi: 10.1016/j.taap.2011.06.001.
75. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 49(11): 1603–1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

76. Gonzalez OA, Novak MJ, Kirakodu S, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, Gonzalez-Martinez J, Ebersole JL (2011) Effects of aging on apoptosis gene expression in oral mucosal tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 256(3): 227–420. doi: 10.1007/s10495-013-0806-x.
77. Mills E, Dong XP, Wang F, Xu H (2010) Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem.* 2(1):51–64.
78. Paul BT, Manz DH, Torti FM (2017) Mitochondria and Iron: Current Questions. *Expert review of hematology.* 10(1):65-79. doi: 10.1080/17474086.2016.1268047.
79. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L (2012) Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51(29):5705-24. doi: 10.1021/bi300752r.
80. Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 202(2):199-211. doi: 10.1016/j.taap.2004.06.021.
81. Kim YS, Kim SU (1991) Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29:100–106.
82. Menon AV, Chang J, Kim J (2016) Mechanisms of divalent metal toxicity in affective disorders. *Toxicology.* 339:58–72. doi: 10.1016/j.tox.2015.11.001
83. Stankiewicz JM, Neema M, Ceccarelli A (2014) Iron and multiple sclerosis. *Neurobiol Aging.* 35 Suppl 2:S51-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.039.
84. Kim Y, Park S (2014) Iron deficiency increases blood concentrations of neurotoxic metals in children. *Korean J Pediatr.* 57(8):345–350. doi:10.3345/kjp.2014.57.8.345
85. Aschner M (2000) Manganese in health and disease: From transport to neurotoxicity. In *Handbook of Neurotoxicology* (E. Massaro, Ed.), pp. 195– 209. Humana Press, Totowa, NJ.
86. Beard JL (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutr.* 131, 568S–580S.
87. Garcia SJ, Gellein K, Syversen T, Aschner M (2007) Iron deficient and manganese supplemented diets alter metals and transporters in the developing rat brain. *Toxicol Sci.* 95(1):205-14.
88. Mostile, G, Cicero, CE, Giuliano, L, Zappia, M, Nicoletti, A (2017) Iron and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Medicine Reports,* 15, 3383-3389. doi: 10.3892/mmr.2017.6386.
89. Gangania MK, Batra J, Kushwaha S, Agarwal R. (2017) Role of Iron and Copper in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Indian J Clin Biochem.* 32(3):353–356. doi:10.1007/s12291-016-0614-5.

90. van Rensburg SJ, Kotze MJ, van Toorn R (2012) The conundrum of iron in multiple sclerosis – time for an individualized approach. *Metab Brain Dis.* 27(3):239-53. doi: 10.1007/s11011-012-9290-1.
91. Barnhamabc KJ, Bush AI (2014) Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chem Soc Rev* 43(19):6727-49. doi: 10.1039/c4cs00138a.
92. Duck KA, Connor JR (2016) Iron uptake and transport across physiological barriers. *Biometals* 9:573–91. doi: 10.1007/s10534-016-9952-2.
93. Ropele S, Enzinger C, Fazekas F (2017) Iron Mapping in Multiple Sclerosis. *Neuroimaging Clinics of North America*, 27(2), 335–342. doi: 10.1016/j.nic.2016.12.003.
94. Fujiwara E, Kmech JA, Cobzas D, Sun H, Seres P, Blevins G, Wilman AH (2017) Cognitive Implications of Deep Gray Matter Iron in Multiple Sclerosis *AJNR Am J Neuroradiol.* 38(5):942-948. doi: 10.3174/ajnr.A5109.
95. Mehta V, Pei W, Yang G, Li S, Swamy E, Boster A, Schmalbrock P, Pitt D. (2013) Iron is a sensitive biomarker for inflammation in multiple sclerosis lesions. *PLoS One* 2013; 8:e57573
96. Bagnato F, Hametner S, Yao B, van Gelderen P, Merkle H, Cantor FK, Lassmann H, Duyn JH (2011) Tracking iron in multiple sclerosis: a combined imaging and histopathological study at 7 Tesla. *Brain.* 134:3602-3615.
97. Williams R, Buchheit CL, Berman NE, LeVine SM (2012) Pathogenic implications of iron accumulation in multiple sclerosis. *J Neurochem* 120:7-25.

**ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY DIAGNOSTIC BIOMARKERS IN
MULTIPLE SCLEROSIS: A MACHINE LEARNING STUDY**

Leda Mezzaroba^{1,2}, Andrea Name Colado Simão², Sayonara Rangel Oliveira², Tamires Flauzino¹, Daniela Frizon Alfieri¹, Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira^{1, 3}, Ana Paula Kallaur¹, Marcell Alysson Batisti Lozovoy², Damacio Ramón Kaimen-Maciel³, Michael Maes^{4,5}, Edna Maria Vissoci Reiche²

¹ Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Paraná, Brazil

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

³ Outpatient Demyelinating Diseases, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁴ Impact Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

⁵ Department of Psychiatry, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Chulalongkorn, Bangkok, Thailand

Corresponding author: Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, University Hospital, State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil; E-mail: reiche@sercomtel.com.br, Tel/Fax: +55 43 3371 2619.

ORCID: 0000-0001-6507-2839.

Abstract

An imbalance of inflammatory/anti-inflammatory and oxidant/antioxidant molecules has been implicated in the demyelination and axonal damage in multiple sclerosis (MS). The current study evaluates serum tumor necrosis factor (TNF)- α , soluble TNF receptor (sTNFR)1, sTNFR2, adiponectin, hydroperoxides, advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide metabolites, total plasma antioxidant capacity using the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), sulfhydryl (SH) groups, and zinc in 174 MS patients and 182 healthy controls. MS is characterized by lowered levels of zinc, adiponectin, TRAP and SH groups and increased levels of AOPP. Logistic regression showed that MS was best predicted by a combination of lowered levels of zinc, adiponectin, TRAP and SH groups yielding an area under the Receiver Operating Curve (AUC/ROC) of 0.986 (± 0.005). Neural network showed an AUC/ROC of 0.997 and that TRAP, adiponectin and zinc are the most important predictors of MS followed at a distance by sTNFR2. Support vector machine with 10-fold validation performed on the four antioxidants showed a training accuracy of 92.9% and a validation accuracy of 90.56%. The results indicate that lowered levels of those four antioxidants increase risk of MS and that these antioxidants are more important biomarkers of MS than TNF- α signaling and nitro-oxidative biomarkers. Adiponectin, TRAP, SH groups, zinc and sTNFR2 play a role in the pathophysiology of MS. A combination of these biomarkers is useful as external validating criteria for the diagnosis MS with high sensitivity, specificity, and accuracy. Drugs that increase the antioxidant capacity may offer novel therapeutic opportunities for MS.

Keywords: multiple sclerosis; oxidative stress, TNF- α ; TNF receptors; adiponectin; zinc

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated inflammatory disease and the most common chronic demyelinating disorder of the central nervous system (CNS) leading to substantial disability in the patients. MS is mediated by a T-cell-dependent process in association with macrophage-mediated demyelination driven by myelin specific autoantigens [1]. The etiology of MS is the result of a complex interaction between multiple genetic, immune, environmental and epigenetic factors [2].

Growing evidence indicates that inflammatory, oxidative and nitrosative stress (IO&NS) mechanisms play a key role in the pathophysiology of MS by contributing to myelin and oligodendroglia degeneration [3, 4]. Likewise, studies have provided evidence for the role of tumor necrosis factor (TNF)- α and its two TNF receptors (TNFR1 and TNFR2) in the onset of MS [5]. Soluble TNF- α (sTNF- α) and transmembrane bound TNF- α (tmTNF- α) signals are *via* TNFR1 and TNFR2, whereas sTNF- α signals mainly *via* TNFR1 [6]. While TNFR1 is ubiquitously expressed and promotes mainly inflammation and apoptosis, TNFR2 is restricted mainly to immune and endothelial cells and it is known to activate the pro-survival PI3K-Akt/PKB signaling pathway and to sustain T regulatory (Treg) cells function [7]. Previously we demonstrated that TNF- α levels are associated with progressive clinical forms of MS [8]; we also demonstrated high levels of soluble TNFR1 (sTNFR1) and soluble TNFR2 (sTNFR2) in patients with MS [9].

One of the regulatory mechanisms of TNF- α response is mediated by adiponectin, an adipokine with anti-inflammatory effects, mainly on endothelial cells through the inhibition of TNF-induced adhesion-molecule expression. In addition, adiponectin inhibits the transcription nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation in endothelial cells and interferes with the function of macrophages [10, 11]. The main anti-inflammatory function of adiponectin might be related to its capacity to suppress the synthesis of TNF- α and interferon (IFN)- γ and to induce the production of anti-inflammatory cytokine interleukin (IL)-10 and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) [12]. Antioxidant activities of adiponectin were also demonstrated [13, 14]. Moreover, low levels of adiponectin have been demonstrated in patients with MS compared to controls [15-18].

A redox imbalance has been reported in MS and has been implicated in demyelination and axonal damage. Oxidation of plasma proteins, mainly fibrinogen and albumin, leads to formation

of advanced oxidized protein products (AOPP). The increase in AOPP and decrease in total thiol group level in serum of clinically isolated syndrome (CIS) and the relapsing-remitting MS (RRMS) patients was previously reported [19]. Similarly, Adamczyk and Adamczyk-Sowa [20] demonstrated that IO&NS biomarkers such as plasma levels of lipidic hydroperoxides, AOPP, oxide nitric metabolites (NOx), and total antioxidant capacity of plasma measured by total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) might be considered potential predictive biomarkers of high disability in MS and were associated with different aspects of disease progression. Previously, we observed higher levels of oxidant biomarkers including lipid hydroperoxides, carbonyl proteins as well as lower levels of antioxidant biomarkers, such as sulfhydryl (SH) groups of proteins and TRAP in patients with MS compared to controls [21].

Antioxidant deficiencies may occur during the clinical course of MS as result of chronic inflammation that is accompanied by increased oxidative stress. Decrease total antioxidant capacity of plasma observed in MS patients is a result of changes in other plasma low-weight antioxidant molecules, such as decrease SH groups [9, 22]. Furthermore, low levels of zinc, an important cofactor for the antioxidant enzymes, are associated with MS [23].

To the best of our knowledge, no study evaluated whether a combination of these IO&NS biomarkers may contribute to the prediction of MS diagnosis. Hence, the current research was conducted to delineate a) whether antioxidant (zinc, adiponectin, SH groups and TRAP) and oxidative and nitrosative stress (AOPP, lipid hydroperoxides and NOx) biomarkers play a role in MS beyond and above the effects of TNF- α signaling; and b) the diagnostic performance of the oxidative and nitrosative stress (O&NS) biomarkers as compared with that of TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 levels.

Methods

Subjects

The study included 174 patients with MS recruited from the Demyelinating Diseases Outpatient Department of the University of Londrina, Londrina, Paraná, Southern Brazil. The MS diagnosis was established according to the McDonald criteria [24]. Among them, 5 presented the clinical isolated syndrome (CIS), 144 presented relapsing-remitting MS (RRMS) and 25 presented progressive clinical forms of MS (ProgMS), including 5 with primary progressive MS (PPMS) and 20 patients with secondary progressive MS (SPMS). The majority of the patients

were treated with interferon beta (IFN- β , n=104), glatiramer acetate (n=45), natalizumab (n=10), glucocorticoids (n=28), and fingolimod (n=1). Patients without treatment (n=13) were those who abandoned therapy or were drug naïve at the time of blood collection. As controls, the study enrolled 182 healthy individuals selected among blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina. None of the participants in the study was placed on a specific diet and was receiving antioxidant supplements and none of them presented clinical symptoms or laboratory markers of heart, thyroid, and renal, hepatic, gastrointestinal, or oncological diseases.

Baseline characteristic of MS patients and controls were obtained using a standard questionnaire on admission. The ethnicity was self-reported as Caucasians and non-Caucasians (Black, Afro-Brazilian, and Asiatic) [25]. Body mass index (BMI), waist circumference, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) values were measured.

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

Immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress biomarkers

After fasting for 12 h, venous blood sample was obtained with ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) as anticoagulant and without EDTA. All samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 min; plasma and serum samples were aliquoted and stored at -80 °C for subsequent analysis. Plasma levels of TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 were determined using immunofluorimetric assay (Novex Life Technologies, Frederick, USA) for Luminex platform in MAGPIX® instrument (Luminex Corp. TX, USA). Plasma levels of adiponectin were determined using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Duo Set, R&D 207 System, Minneapolis, USA).

The O&NS biomarkers were determined as reported elsewhere [21]. Briefly, lipid hydroperoxides were evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) [26]. AOPP were determined and the results were expressed as micromoles per liter ($\mu\text{mol/L}$) of chloramine T equivalents [27]. Nitric oxide (NO) was estimated by measuring the NO metabolites (NO_x) nitrites (NO₂⁻) and nitrates (NO₃⁻) [28]. Plasma SH groups were evaluated using a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), as previously reported [29]. The total plasma antioxidant capacity was determined using the TRAP as reported previously [30].

Serum levels of zinc were determined using flame atomic absorption spectrometer (FAAS) (Varian® Model SpectrAA Palo Alto, CA, USA). The air–acetylene flame was used for analysis. The zinc hollow cathode lamp, which emitted a light of wavelength as 213.9 nm, was used for the apparatus under the conditions such as wavelength, slit width, and burner height, as recommended by the manufacturer.

Statistical Analysis

Categorical variables were expressed as the absolute (n) and relative (%) values and analyzed using chi-square test (or Fisher Exact test when appropriate). Continuous variables were expressed as mean and \pm standard deviation (\pm SD). We used analysis of variance (ANOVA) to check intergroup differences in continuous variables and the Kolmogorov–Smirnov goodness test to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformations of continuous data were performed to normalize data distribution or to adjust for heterogeneity of variance between study groups (as assessed with the Levene test). Pearson’s correlation coefficients were used to examine the associations between two scale variables. We used multivariate general linear model (GLM) analysis to ascertain the effects of independent variables, such as diagnosis, on biomarkers while controlling for possible confounders, including age, sex and BMI. Consequently, we used tests for between-subject effects to check the effects of explanatory variables on the separate biomarkers and model-estimated estimated marginal mean values were computed. Results of multiple comparisons were corrected for false discovery rate [31]. Binary logistic regression analysis was employed to assess the significant variables that predict MS *versus* controls using biomarkers as explanatory variables. We computed the odds ratio (OR) and 95 % confidence intervals (CI) of significant predictors as well as receiver operating curve (ROC) analysis to calculate the area under the ROC (AUC/ROC).

As supervised learning techniques we used Neural Network analysis and Support Vector Machine (SVM). SVM has been used to develop automated classification of diseases and to improve methods for detecting disease in the clinical setting [32, 33]. SVM with radial basis function (RBF/SVM) was employed to compute training and 10-fold validation accuracy of a 2-class segregation (MS *versus* controls) with the biomarkers as explanatory variables. SVM was performed using The Unscrambler® (CAMO®). Multilayer perceptron (MLP) Neural Network analysis was employed to discover the effects of complex nonlinear relationships among input

variables predicting MS *versus* controls. The relative numbers of cases assigned to the training (to estimate the network parameters), testing (to prevent over-fitting) and holdout (to evaluate the final network) sets were 7, 3 and 5 respectively. Stopping rule was one consecutive step with no further decrease in the error term. The input layer of the feedforward architecture model contained the biomarkers whilst the output layer contained the diagnoses. We trained one or two hidden layers with a variable number of nodes (2-7). Error and relative error were computed as well as the (relative) importance of each of the input variables in sensitivity analyses. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Windows version 24. Tests were 2-tailed, and an alpha level of 0.05 indicating a statistically significant effect.

Results

Subject data

Table 1 shows the socio-demographic and IO&NS biomarkers data of 174 MS patients and 182 healthy controls. There were no significant differences between both groups in age, sex, ethnicity, BMI, smoking, SPB and DBP. Patients with MS showed lower levels of zinc, adiponectin, TRAP, SH groups (all $p=0.001$) and higher levels of AOPP ($p=0.041$), NOx ($p=0.046$), TNF- α ($p<0.001$), and sTNFR2 ($p<0.001$) than controls. These results were obtained from simple ANOVAs performed with the biomarker data without any adjustment for the effects of confounding variables and without p-correction.

In order to delineate different multivariate models based on the IO&NS biomarkers, we first analyzed their correlation matrices. The intercorrelation matrix showed that zinc was positively correlated with adiponectin ($r=0.329$, $p<0.001$, $n=303$), TRAP ($r=0.351$, $p<0.001$, $n=351$), SH groups ($r=0.203$, $p<0.001$, $n=341$) and negatively with TNF- α ($r=-0.243$, $p<0.001$, $n=211$). Adiponectin was positively correlated with TRAP ($r=0.351$, $p<0.001$, $n=351$), SH groups ($r=0.203$, $p<0.001$, $n=341$) and negatively correlated with TNF- α ($r=-0.243$, $p<0.001$, $n=211$) and sTNFR2 ($r=-0.209$, $p=0.002$, $n=211$). TRAP was negatively correlated with TNF- α ($r=-0.220$, $p=0.001$, $n=209$), while SH groups were negatively correlated with sTNFR2 ($r=-0.215$, $p=0.002$, $n=207$). TNF- α was positively correlated with sTNFR1 ($r=0.324$, $p<0.001$, $n=211$) and sTNFR2 ($r=0.307$, $p<0.001$, $n=2011$), as well as a positive correlation was observed between both sTNFR1 and sTNFR2 levels ($r=0.527$, $p<0.001$, $n=211$).

Table 2 shows the results of two multivariate GLM analysis with the IO&NS biomarkers as dependent variables and diagnosis (namely MS *versus* healthy controls) as explanatory variable, while adjusting for background variables including sex, age, and BMI. The TNF- α data were assessed separately because they were assayed in a subset of the participants, which would yield a considerable lowered number of degrees of freedom, and also because they reflect another construct. Multivariate GLM analysis #1 shows that diagnosis (MS patients *versus* controls) exerts the highest effect on O&NS biomarkers levels explaining 68.2% of the variance of their values, while sex and age showed moderate effect (14.9% and 14.0%, respectively) and BMI showed a weak effect (9.3%). With the analysis between subject effects, we observed that MS diagnosis showed strong effect on zinc (36.8% of the variance), on adiponectin (45.1% of the variance), and on TRAP (36.8% of the variance), but a weak effect on SH groups (4.5% of the variance) and AOPP (2.7% of the variance). The MS diagnosis was not associated with NOx and CL-LOOH.

We have also examined possible effects of the MS therapy and clinical forms of MS on the results obtained in regression #1. Introducing MS treatment in regression #1 showed that glucocorticoids ($F=0.84$, $df=7/246$, $p=0.552$), glatiramer acetate ($F=0.44$, $df=7/246$, $p=0.875$), IFN- β ($F=0.55$, $df=7/246$, $p=0.797$) and natalizumab ($F=0.30$, $df=7/246$, $p=0.954$) had no significant impact on the results. In addition, there were no significant differences in adiponectin, TRAP, SH groups, CL-LOOH and AOPP between RRMS and ProgMS, while zinc was significantly lower ($F=7.78$, $df=1/143$, $p=0.006$) in patients with the ProgMS compared with those with RRMS (data not shown).

Multivariate GLM regression #2 shows that MS was significantly associated with increased the TNF- α variables explaining 27.5% of the variance. Tests for between-subject effects showed that 14.7% of the TNF- α variance as well as 16.7% of the sTNFR2 variance was associated with MS. Introducing MS therapy in the analysis showed no significant effects of glatiramer acetate ($F=0.23$, $df=3/193$, $p=0.876$), IFN- β ($F=0.22$, $df=3/193$, $p=0.884$) and natalizumab ($F=2.42$, $df=3/193$, $p=0.068$). There was, however, a modest but significant suppressive effect of glucocorticoids on TNF- α ($F=2.91$, $df=3/193$, $p=0.036$). Moreover, introducing clinical forms of MS in this analysis showed that there were no significant differences of these three TNF variables among patients with RRMS when compared to ProgMS (data not shown).

Figure 1 shows the values of the IO&NS biomarkers in controls (Group 0) and MS patients (Group 1). All data are in z scores computed on the logarithmic natural (Ln) transformation of the measurements. **Table 3** shows the model-generated estimated marginal mean values of the biomarkers (thus after adjusting for sex, age and BMI). The four antioxidants (zinc, adiponectin, TRAP and SH groups) were significantly lower in MS patients than in controls, whilst AOPP, TNF- α , and sTNFR2 were significantly higher in MS than controls.

Diagnostic biomarkers of MS

In order to examine the best diagnostic biomarkers of MS, we have carried out binary regression analysis with MS as dependent variable and controls as reference group. **Table 4** regression #1 shows the results of binary regression analysis with all seven O&NS biomarkers (adiponectin, zinc, TRAP, SH, AOPP, LOOH and NOx) as explanatory variables. MS was best predicted by a combination of the four antioxidants, including zinc, adiponectin, TRAP and SH groups with zinc being the most important ($x^2=282.32$, $df=4$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.889); 95.5% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 95.7% and a specificity of 95.1%. The AUC/ROC based on these four antioxidants was 0.986 (± 0.005). We have rerun the analysis now with inclusion of TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 and the results showed that a combination of the four antioxidants and sTNFR2 yielded the best prediction for MS diagnosis ($x^2=162.29$, $df=5$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.919) and that 97.4% of all subjects were correctly classified with sensitivity of 98.7% and specificity of 91.7%. The AUC/ROC based on these five variables was 0.990 (± 0.006). Nevertheless, adiponectin, TRAP and zinc were again the most important variables. As such, lowered levels of zinc, adiponectin, TRAP and SH groups and increased levels of sTNFR2 were associated with increased risk of MS.

In order to assess the validation accuracy of the four antioxidant levels, we carried out SVM analysis. **Figure 2** shows the results of 10-fold validation accuracy obtained with SVM, Radial Basis Function. The training accuracy was 93.51% and the validation accuracy was 92.03%. This figure shows the separation of the data when using adiponectin and TRAP as input variables.

Table 5 shows the results of Neural Network analysis. We trained the network predicting MS and controls (output or target variables) using the O&NS and TNF data as input variables. We trained the network using 2 hidden layers with each 5 units, with hyperbolic tangent as

activation function in hidden layer 1, and identity in the output layer. **Table 5** shows that the sum of squares error term was lower in the testing than in the training set and that the percentage of incorrect predictions were relatively constant among the training, testing and holdout samples showing that the model is not overfitted. The training results of the machine learning network in the holdout sample showed a sensitivity of 98.2% with a specificity of 83.3%. The AUC/ROC was 0.997. **Figure 3** shows the relative importance of the input variables, namely TRAP and adiponectin are the most important predictors followed at a distance by zinc and again at a distance by sTNFR2.

Discussion

The present study demonstrated that patients with MS showed higher levels of AOPP, TNF- α and sTNFR2, as well as lower levels of zinc, SH groups, adiponectin and TRAP than controls. Total plasma antioxidant capacity, adiponectin, zinc, and sTNFR2 were the most important diagnostic biomarkers associated with MS. We demonstrated that MS diagnosis was highly associated with the oxidant/antioxidant profile, explaining 68.2% of the variance of their levels, with a particularly strong impact on adiponectin (45.1%), zinc (36.8%) and TRAP (36.8%), as well as a moderate effect on sTNR2 (16.7%) and TNF- α (14.7%) variance levels. The combination of the four antioxidant biomarkers (adiponectin, zinc, TRAP, and SH groups) and sTNFR2 showed the best diagnostic model to externally validate the MS diagnosis with a sensitivity of 98.7% and specificity of 91.7%. These results also emphasize the important network involving inflammatory/oxidant and anti-inflammatory/antioxidant pathways in the pathophysiology of MS.

Previously, we demonstrated that high levels of AOPP and low levels of TRAP could be considered as diagnostic biomarkers for MS [21]. Proteins are major targets of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) attacks [19]. In our study, lowered TRAP was significantly associated with MS diagnosis. The TRAP method involves the cumulative action of all antioxidant molecules, such as uric acid, proteins, ascorbate and vitamin E, providing an integrated evaluation of all parameters rather than the simple sum of measurable antioxidants [20]. Indeed, the decrease in the TRAP values observed in MS patients may be due to changes in other low-weight antioxidant molecules in the plasma, such as decreased SH groups. Low SH

group levels are observed both in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients and may be ascribed to excessive redox dependent changes affecting respiratory chain complex activity [19].

In the present study, the positive correlation between TNF- α and both sTNFR1 and sTNFR2 is in agreement with results of Fissolo et al [34]. While TNFR1 is ubiquitously expressed and promotes mainly inflammation and apoptosis, TNFR2 is restricted mainly to immune and endothelial cells and it is known to activate the pro-survival PI3K-Akt/PKB signaling pathway and to sustain Treg cells function [7]. The spectrum and potency of biochemical activities initiated by TNFR1 and TNFR2 are also distinct [35-37]. TNFR1 and TNFR2 induce strong and rapid activation of MAP kinase- and NF- κ B-dependent cellular responses [6]. However, TNFR1 may effectively stimulate apoptotic and necroptotic cell death as well, whereas TNFR2, which lacks death domain, cannot. Genetic ablation of TNFR2, in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of human MS, resulted in exacerbated immune reactivity and chronic disease course [38], which generate by chronic inflammation like MS.

Our results are in agreement with some previous studies that demonstrated higher levels of TNF- α levels in MS patients than in controls [39, 40]. But according to Fissolo et al [34] the concentrations of their soluble receptors have received little attention. In fact, the cytokine TNF- α plays an important role in the propagation of inflammation due to the activation and recruitment of immune cells via the sTNFR1. Moreover, sTNFR1 can directly induce oxidative stress by the activation of ROS and RNS producing enzymes. Therefore, TNF- α plays a dual role in MS, since stimulation via the sTNFR2 exerts neuroprotective function and promotes tissue regeneration [6, 41]. It is possible that the increase in sTNRF2 levels observed in the present study may reflect an attempt to maintain the immunomodulation of TNF- α in patients with a chronic inflammatory disease, such as MS [42].

The lower levels of adiponectin observed in MS patients than controls of the present study, are consistent with previous reports [15-17] and may reflect the imbalance between the inflammatory/anti-inflammatory response toward Th17/Th1 cytokines profile in MS [43]. Moreover, the main variance observed in the adiponectin levels of MS patients and controls enrolled in the present study was explained by the presence of MS, as well as they were the second relative important biomarker in the MS diagnosis.

ATTENTION HAS BEEN PAID TO THE CLOSE ASSOCIATION BETWEEN INFLAMMATION AND ADIPOSE TISSUE, WHERE SOME ADIPOCYTOKINES, SUCH AS ADIPONECTIN, ARE SYNTHESIZED [44]. ADIPONECTIN IS THE MOST ABUNDANT ANTI-INFLAMMATORY ADIPOKINE IN THE PLASMA AND MODULATES NEGATIVELY THE ACTIVATION OF THE PRO-INFLAMMATORY NF-KB SIGNALING PATHWAY [11], DECREASING THE EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES SUCH AS TNF-A, IL-6, AND IFN- Γ AND INCREASING THE EXPRESSION OF ANTI-INFLAMMATORY MOLECULES, SUCH AS IL-10 AND IL-1RA [12]. ADIPONECTIN SUPPRESSES THE ACTIVATION AND PROLIFERATION OF T AND B LYMPHOCYTES AND EXERTS SOME PROTECTIVE FUNCTION AGAINST THE DEVELOPMENT OF NUMEROUS INFLAMMATORY CONDITIONS, SUCH AS MS [45].

The antioxidant role of adiponectin, has also been demonstrated in experimental studies when this adipokine downregulated oxidative stress by increasing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression in the mouse aorta, increased the activity of superoxide dismutase (SOD), and reduced levels of malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation [14]. Adiponectin exerts antioxidant effects by inhibition of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). Moreover, it affects the activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α which is related to the oxidation of fatty acid stimulated by adiponectin. The activation of PPAR- α can regulate the redox state in the cells to inhibit the signal transduction of NF-kB, which is sensitive to oxidation-reduction [14]. In our study, adiponectin was the second most important biomarker in the diagnosis of MS.

Following TRAP and adiponectin biomarkers, the present study demonstrated that zinc serum levels have a relative importance in the MS diagnosis. The lower levels of zinc among the MS patients than controls underscored the role of this metal in the development of MS. Low levels of zinc also have been reported to be associated with T cell-mediated autoimmunity [46]. The association between zinc deficiency and the development of neurodegenerative diseases, such as MS, has been supported by previous studies, especially in the RRMS patients [47, 48]. Indeed, zinc deficiency is reported to induce an imbalance between Th1 and Th2 cell functions and hinder down-regulation of Th17 lymphocytes, which have been suggested to be major mechanisms contributing to the pathogenesis of MS autoimmunity [49]. Underscoring these

previous reports, meta-analysis studies also revealed the possible role of zinc deficiency in MS patients [50, 51].

Zinc has been well known to be essential for the normal function of both innate and adaptive immune response, responding to pathogen or tissue damage and exerting antioxidant and anti-inflammatory functions [23]. So, a disrupted zinc homeostasis affects the immune cells, leading to impaired activation, and maturation of lymphocytes, disturbed intercellular communication via cytokines, and weakened innate host defense via phagocytosis and oxidative burst [52]. Prasad [53] demonstrated that the oxidative stress biomarkers were decreased by zinc supplementation in elderly and young adult human subjects including those with neurodegenerative diseases. At least, zinc exerts an antioxidant effect through four different mechanisms. First, by competition with iron and copper ions for binding to cells membranes and proteins, displacing these redox active metals, which catalyze the production of $\cdot\text{OH}$ from H_2O_2 . Second, zinc binds to SH groups of biomolecules protecting them from oxidation. Third, by increasing activation of antioxidant proteins and enzymes, such as glutathione (GSH), catalase, and SOD, as well as by reducing the activities of oxidant-promoting enzymes, including iNOS and NADPH oxidase and inhibiting the generation of lipid peroxidation products. Fourth, zinc induces the expression of a metal-binding protein metallothionein, which is very rich in cysteine and is an excellent scavenger of $\cdot\text{OH}$ ions [54].

Some limitations of this study should be considered. The case-control design does not allow inferences on the causal relationship between the evaluated biomarkers and the occurrence of MS. However, the study has as strength, a robust statistical analysis with adjustment of the results for confounding variables, as well as the use of machine learning models, including SVM, Neural Network, training tests and validation of accuracy. Currently these are the best models to predict candidate biomarkers for the diagnosis, prognosis and monitoring the treatment of diseases, including neurological diseases [33].

Conclusion

Taken together, our results demonstrated that MS patients have lower levels of antioxidant biomarkers adiponectin, total antioxidant capacity of plasma, zinc and SH groups, as well as higher levels of inflammatory biomarkers $\text{TNF-}\alpha$ and sTNFR2 compared to controls, independently of sex, age, and BMI. To our knowledge, this is the first report demonstrating that

a combination of aforementioned biomarkers, including adiponectin, TRAP, SH groups, zinc and sTNFR2, may be useful for MS diagnosis with high sensitivity, specificity, and accuracy. Therefore, this panel of biomarkers could be incorporated in the diagnostic biomarkers for MS in combination with clinical and radiological disease diagnostic criteria to improve the sensitivity and specificity of diagnosis. The results also suggest that the pathways involved with these biomarkers may be further evaluated as potential targets for a personalized therapy of MS patients.

Financial support

The study was supported by grants from Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) of Brazilian Ministry of Education; Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

1. Thompson, AJ, Baranzini, SE, Geurts, J, Hemmer, B, Ciccarelli, O (2018) Multiple sclerosis. *Lancet*. 391(10130):1622-36. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30481-1.
2. Aslani S, Jafari N, Javan MR, Karami J, Ahmadi M, Jafarnejad M (2017) Epigenetic modification sand therapy in multiple sclerosis. *Neuromol Med* 19: 11-23.
3. Witkowska AM, Socha K, Kochanowicz J, Karpińska E, Jakoniuk M, Zujko ME, Wilkiel M, Borawska MH, Mariak Z (2016) Levels of Biomarkers of Immune Activation and Associations With Neurological Impairment in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients During Remission. *Biol Res Nurs* 18(1):113-9. doi: 10.1177/1099800415583105.
4. Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative Disorders. *Neurol Res* 39(1):73-82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711.
5. Trenova AG, Slavov G; Manova MG, Draganaova-Filipova MN, Mateva NG, Miteva LD, Miteva LD (2017) Alterations in serum levels of IL-17 in contrast to TNF-alpha correspond to disease-modifying treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 77(4):283-288. doi: 10.1080/00365513.2017.1303843.

6. Pegoretti V, Baro W, Laman JD, Eisel ULM (2018) Selective modulation of TNF–TNFRs signaling: insights for multiple sclerosis treatment. *Front Immunol* 9:925. doi: 10.3389/fimmu.2018.00925.
7. Faustman D, Davis M (2010) TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 9(6):482-93. doi: 10.1038/nrd3030.
8. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, Alfieri DF, Flauzino T, Lopes J, de Carvalho Jennings Pereira W, de Meleck Proença C, Borelli SD, Kaimen-Maciel DR, Maes M, Reiche EMV (2017) Cytokine profile in patients with progressive multiple sclerosis and its association with disease progression and disability. *Mol Neurobiol* 54(4):2950-2960. doi: 10.1007/s12035-016-9846-x.
9. Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS, Kallaur AP, Alfieri DF, Kaimen-Maciel DR, Morimoto HK, de Almeida ERD, Lozovoy MAB, Reiche EMV, Dichi I, Simão ANC (2018) Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis* 33(5):1393-1399. doi: 10.1007/s11011-018-0224-4.
10. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100: 2473-2476.
11. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y (2000) Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96:1723-1732.
12. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H (2004) Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 323:630-635.
13. Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ (2004) Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 315(2):264–271. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.049.

14. Wang X, Pu H, Ma C, Jiang T, Wei Q, Zhang C, Duan M, Shou X, Su L, Zhang J, Yang Y (2014) Adiponectin abates atherosclerosis by reducing oxidative stress. *Med Sci Monit* 20:1792-800. doi: 10.12659/MSM.892299.
15. Musabak U, Demirkaya S, Genç G, Ilikci RS, Odabasi Z (2011) Serum adiponectin, TNF- α , IL-12p70, and IL-13 levels in multiple sclerosis and the effects of different therapy regimens. *Neuroimmunomodulation* 18:57–66. doi: 10.1159/000317393.
16. Guerrero-García JJ, Carrera-Quintanar L, López-Roa RI, Márquez-Aguirre AL, Rojas-Mayorquín AE, Ortuño-Sahagún D (2016) Multiple sclerosis and obesity: possible roles of adipokines. *Mediators Inflamm* 2016: 4036232.
17. Natarajan R (2016) Biomarkers in Multiple Sclerosis Special emphasis on Melatonin and Adipokines. *Acta Universitatis Tampereensis* 2172 Tampere University Press Tampere 98p.
18. Bloemer J, Pinky PD, Govindarajulu M, Hong H, Judd R, Amin RH, Moore T, Dhanasekaran M, Reed MN, Suppiramaniam V (2018) Role of Adiponectin in Central Nervous System Disorders. *Neural Plast* 2018:4593530. doi: 10.1155/2018/4593530.
19. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, Stojanovic D, Stefanovic N, Pavlovic D (2014) Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. *J Neurol Sci* 15;337(1-2):8-13. doi: 10.1016/j.jns.2013.11.006.
20. Adamczyk B, Adamczyk-Sowa M (2016) New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1973834. doi: 10.1155/2016/1973834.
21. Oliveira SR, Kallaur AP, Simão AN, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, Petenucci DL, Cechini R, Kaimen-Maciel DR, Reiche EM (2012) Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci* 15;321(1-2):49-53. doi: 10.1016/j.jns.2012.07.045.
22. Ferreira KPZ, Oliveira SR, Kallaur AP, Kaimen-Maciel DR, Lozovoy MAB, de Almeida ERD, Morimoto HK, Mezzaroba L, Dichi I, Reiche EMV, Simão ANC (2017). Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 373:236-241. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.039.

23. Lee SR (2018) Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. *Oxid Med Cell Longev* 2018:9156285. doi: 10.1155/2018/9156285.
24. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. doi: 10.1002/ana.22366.
25. Brazil. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) Characteristics of the population and households: results of the universe. Available in: https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed 3 Jul 2018.
26. Gonzales Flecha B, Llesuv S, Boveris (1991) A hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10(2):93-100.
27. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B (1996) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524–32. doi:0022-1767/98.
28. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679–681. doi: 10.1515/CCLM.2008.096.
29. Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI, editors. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, p. 380-382.
30. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255:107-117.
31. Benjamini Y, Hochberg J (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B* 57(1):289–300.
32. Kora P, Kalva SR (2015) Improved Bat algorithm for the detection of myocardia infarction. *Springerplus* 3; 4:666. Doi: 10.1186/s40064-015-1379-7.

33. Grollemund V, Pradat PF, Querin G, Delbot F, Le Chat G, Pradat-Peyre JF, Bede P (2019) Machine learning in amyotrophic lateral sclerosis: achievements, pitfalls, and future directions. *Front Neurosci* 13:135. doi: 10.3389/fnins.2019.00135.
34. Fissolo N, Cantó E, Vidal-Jordana A, Castelló J, Montalban X, Comabella M (2014) Levels of soluble TNF-RII are increased in serum of patients with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 271(1-2):56-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.04.001.
35. Varfolomeev E, Vucic D (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine* 101:26-32. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035.
36. Tseng W, Huang Y, Lin H, Luo S, McCann F, McNamee K, Clanchy F, Williams R (2018) TNFR signaling and its clinical implications. *Cytokine* 101:19–25. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.027.
37. Yang S, Wang J, Brand DB, Zheng SG (2018) Role of TNF–TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. *Front Immunol* 9:784. doi: 10.3389/fimmu.2018.00784.
38. Gao H, Danzi MC, Choi CS, Taherian M, Dalby-Hansen C, Ellman DG, Madsen PM, Bixby JL, Lemmon VP, Lambertsen KL, Branbilla R (2017) Opposing functions of microglial and macrophagic TNFR2 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Rep* 18(1): 198–212. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.083.
39. Olmos G, Lladó J (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231.
40. Fiedler SE, George JE, Love HN, Kim E, Spain R, Bourdette D, Salinthon S (2017) Analysis of IL-6, IL-1 β and TNF- α production in monocytes isolated from multiple sclerosis patients treated with disease modifying drugs. *J Syst Integr Neurosci* 3(3). doi: 10.15761/JSIN.1000166.
41. Fischer R, Maier O (2015) Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev* 2015:610813. doi:10.1155/2015/610813.

42. Mccann FE, Perocheau DP, Ruspi G, Blazek K, Davies ML, Feldmann M, Dean JL, Stoop AA, Williams RO (2014) selective tumor necrosis factor receptor i blockade is anti-inflammatory and reveals immunoregulatory role of tumor necrosis factor receptor ii in collagen-induced arthritis. *Arthritis rheum* 66(10): 2728–2738. Doi: 10.1002/art.38755.
43. Kvistad SS, Myhrn SS, Holmøy T, Benth JS, Wergeland, Beiske AG, Hovdal H, Midgard R, Sagen JV, Torkildsen Ø (2018) Serum levels of leptin and adiponectin are not associated with disease activity or treatment response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 323:373–7 doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.07.011.
44. Matveeva O, Bogie JFJ, Hendriks JJA, Linker RA, Haghikia A, Kleinewietfeld M (2018) Investigation of the prognostic value of adipokines in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1417(1):71-86. doi: 10.1111/nyas.13583.
45. Baranowska-Bik A, Waszkiewicz-Hanke M (2017) Adiponectin as a neuropeptide. *Post N Med* XXX(12): 717-722. doi:10.25121/PNM.2017.30.12.717.
46. Pawlitzki M, Uebelhör J, Sweeney-Reed CM, Stephanik H, Hoffmann J, Lux A, Reinhold D (2018) Lower serum zinc levels in patients with multiple sclerosis compared to healthy controls. *Nutrients* 10(8). pii: E967. doi: 10.3390/nu10080967.
47. Pan Z, Choi S, Ouadid-Ahidouch H, Yang JM Beattie JH, Korichneva I (2017) Zinc transporters and dysregulated channels in cancers. *Front Biosci* 22:623-643.
48. Socha K, Karpińska E, Kochanowicz J, Soroczyńska J, Jakoniuk M, Wilkiel M, Mariak ZD, Borawska MH (2017) Dietary habits, concentration of copper, zinc and Cu/Zn ratio in the serum and the ability status of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Nutrition* 40:76-81. doi: 10.1016/j.nut.2017.03.009.
49. Rosenkranz E, Maywald M, Hilgers RD, Brieger A, Clarner T, Kipp M, Plümäkers B, Meyer S, Schwerdtle T, Rink L (2016) Induction of regulatory T cells in Th1-/Th17-driven experimental autoimmune encephalomyelitis by zinc administration. *J Nutr Biochem* 29:116-23. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.010.
50. Bredholt M, Frederiksen JL (2016) Zinc in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ASN Neuro* 8(3). pii: 1759091416651511. doi: 10.1177/1759091416651511.

51. Sanna A, Firinu D, Zavattari P, Valera P (2018) Zinc status and autoimmunity: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 10(1). pii: E68. doi: 10.3390/nu10010068.
52. Sheykhansari S, Kozielski K; Bill J, Sitti M, Gemmati D, Zamboni P, Singh AV (2018) Redox metals homeostasis in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Cell Death Dis* 9:348 doi:10.1038/s41419-018-0379-2.
53. Prasad AF (2014) An Antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging (2014) *J Trace Elem Med Biol* 28:364-71. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.019.
54. Bao B, Ahmad A, Azmi A, Li Y, Prasad AS, Sarkar FH (2013) The biological significance of zinc in inflammation and aging. In: Rahman I, Bagchi D, editors. *Inflammation, Advancing and Nutrition*. New York, NY: Elsevier Inc p.15–27.

Table 1 Socio-demographic, clinical and biomarker data in multiple sclerosis (MS) patients and controls

Variables	Controls (n=182)	MS (n=174)	F/X ²	df	P value
Age (years)	39.5 (9.8)	41.9 (13.2)	3.62	1/354	0.058
Sex n (%)					
Female/Male	128 (70)/54 (30)	121 (70)/53 (30)	0.03	1	0.871
Ethnicity n (%)					
Caucasian/NC	140 (77)/42 (23)	138 (79)/36 (21)	0.06	1	0.810
Smoking n (%)					
No/ Yes	163 (89)/19 (11)	154 (88)/20 (12)	0.14	1	0.707
BMI (kg/m ²)	25.8 (9.6)	25.7 (5.2)	0.07	1/341	0.790
SBP (mmHg)	116.2 (18.8)	115.0 (13.0)	0.42	1/299	0.520
DBP (mmHg)	74.6 (12.4)	75.2 (9.2)	0.20	1/299	0.657
Zinc (µg/dL)	154.0 (44.2)	109.0 (25.4)	136.58	1/353	<0.001
Adiponectin (µg/mL)	7.51 (3.96)	3.01 (1.81)	171.70	1/302	<0.001
TRAP (µM Trolox)	928.0 (161.7)	726.2 (132.3)	163.72	1/350	<0.001
AOPP (µmol/L of chloramine T equivalents)	128.1 (54.6)	141.0 (58.2)	4.19	1/322	0.041
NOx (µM)	13.3 (7.4)	15.3 (11.0)	4.03	1/339	0.046
CL-LOOH (RLU)	191.5 (172.9)	178.5 (94.3)	0.76	1/345	0.385
SH groups (µM)	338.9 (98.3)	284.9 (65.3)	35.97	1/340	<0.001
TNF-α (pg/mL)	10.3 (39.8)	62.1 (343.3)	36.76	1/209	<0.001
sTNFR1 (pg/mL)	927.6 (280.0)	1051.0 (402.6)	2.58	1/209	0.110
sTNFR2 (pg/mL)	1390.0 (360.6)	2026.7 (676.2)	43.68	1/209	<0.001

All the results of analyses of variance (F values). X²: results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation (SD) and categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). df: degree of freedom; NC: No Caucasian; BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; AOPP: advanced oxidation protein products; NOx: nitric oxide metabolites; CL-LOOH: tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; RLU: relative light unit; SH groups: sulfhydryl groups; TNF-α: tumor necrosis factor α; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2.

Table 2 Results of multivariate GLM analysis with the oxidative and nitrosative stress biomarkers as dependent variables and diagnosis, namely multiple sclerosis (MS) versus healthy controls, as primary explanatory variable

Tests	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	P value	Partial Eta-squared (R ²)
Multivariate #1	Zinc, Adiponectin,	MS	78.21	7/255	<0.001	0.682
	TRAP, SH groups,	Sex	6.36	7/255	<0.001	0.149
	AOPP, NOx,	Age	5.93	7/255	<0.001	0.140
	CL-LOOH	BMI	3.74	7/255	0.001	0.093
Between- subject effects	Zinc	MS	152.03	1/261	<0.001	0.368
	Adiponectin	MS	214.36	1/261	<0.001	0.451
	TRAP	MS	152.30	1/261	<0.001	0.368
	SH groups	MS	12.36	1/261	0.001	0.045
	AOPP	MS	7.34	1/261	0.007	0.027
	NOx	MS	3.19	1/261	0.075	0.012
	CL-LOOH	MS	0.73	1/261	0.395	0.003
	Zinc	Sex	9.54	1/261	0.002	0.035
	Adiponectin	Sex	21.86	1/261	<0.001	0.077
	TRAP	Sex	4.63	1/261	0.032	0.017
	SH groups	Sex	8.14	1/261	0.005	0.030
	Adiponectin	Age (-)	14.02	1/261	<0.001	0.051
	SH groups	Age (-)	13.12	1/261	<0.001	0.048
	AOPP	Age	4.04	1/261	0.045	0.015
	NOx	Age	5.66	1/261	0.018	0.021
	Adiponectin	BMI	6.31	1/261	0.013	0.024
TRAP	BMI	14.21	1/261	<0.001	0.052	
AOPP	BMI	5.43	1/261	0.021	0.020	
Multivariate #2	TNF- α	MS	25.64	3/203	<0.001	0.275
	sTNFR1	Sex	0.08	3/203	0.972	0.001
	sTNFR2	Age	4.80	3/203	0.003	0.066
		BMI	4.51	3/203	0.004	0.063
Between- subject effects	TNF- α	MS	35.45	1/205	<0.001	0.147
	sTNFR2	MS	41.03	1/205	<0.001	0.167

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; BMI: body mass index; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; AOPPs: advanced oxidation protein products; NOx: nitric oxide metabolites; CL-LOOH: tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; SH groups: sulfhydryl groups; TNF- α : tumor necrosis factor α ; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2.

Table 3 Model-generated estimated marginal mean values (z values) with standard error obtained by general linear model analysis (see regression #1, Table 2), namely data were adjusted for age, sex and body mass index

Variables (in z values)	Controls	Multiple sclerosis patients
Zinc	+0.727 (0.085)	-0.539 (0.067)
Adiponectin	+0.649 (0.076)	-0.703 (0.060)
TRAP	+0.676 (0.083)	-0.567 (0.065)
AOPP	-0.272 (0.102)	+0.062 (0.080)
NOx	-0.143 (0.104)	+0.081 (0.081)
CL-LOOH	-0.100 (0.097)	+0.000 (0.076)
SH groups	+0.238 (0.100)	-0.187 (0.078)
TNF- α	-0.705 (0.147)	+0.224 (0.080)
sTNFR-1	-0.140 (0.155)	+0.063 (0.089)
sTNFR-2	-0.715 (0.137)	+0.217 (0.075)

TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; AOPP: advanced oxidation protein products; NOx: nitric oxide metabolites; CL-LOOH: tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; SH groups: sulfhydryl groups; TNF- α : tumor necrosis factor α ; sTNFR-1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR-2: soluble tumor necrosis factor receptor 2.

Table 4 Results of binary logistic regression analysis with multiple sclerosis as dependent variable and laboratory biomarkers as explanatory variables

Regression	Explanatory variables	Wald	df	P value	Odds ratio	95% CI
≠1 MS	Zinc	22.50	1	< 0.001	0.102	0.4-0.262
	Adiponectin	29.84	1	< 0.001	0.023	0.006-0.090
	TRAP	24.47	1	< 0.001	0.055	0.017-0.173
	SH groups	5.13	1	0.023	0.443	0.219-0.896
≠2 MS	Zinc	6.90	1	0.009	0.102	0.019-0.560
	Adiponectin	9.10	1	0.003	0.011	0.001-0.209
	TRAP	9.54	1	0.002	0.019	0.001-0.233
	SH groups	5.00	1	0.025	0.223	0.006-0.831
	sTNFR2	5.79	1	0.016	5.60	1.38-22.83

df: degree of freedom; CI: confidence interval; MS: multiple sclerosis patients; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; SH groups: sulfhydryl groups; sTNFR-2: soluble tumor necrosis factor receptor 2. ≠1 MS 95.5% of all subjects were correctly classified with sensitivity of 95.7%, specificity of 95.1%, and area under curve (AUC) of receiver operating curve (ROC) of 0.986 (± 0.005). ≠2 MS 97.4% of all subjects were correctly classified with sensitivity of 98.7% specificity of 91.7%, and AUC/ROC of 0.990 (± 0.006).

Table 5 Results of Neural Network (NN) analysis with multiple sclerosis and healthy controls (HC) as output variables and biomarkers as input variables

NN Outputs MS/HC	NN sample	Error: Sum of squares	% Incorrect predictions	Diagnosis	Predicted	AUC/ROC
	Training	2.017	2.0%	MS	97.6%	
				HC	100.0%	
	Testing	0.766	3.2%	MS	100.0%	0.997
				HC	83.3%	
	Holdout	-	4.7%	MS	98.1%	
				HC	83.3%	

NN: neural network; MS: multiple sclerosis; HC: healthy controls; AUC: area under curve; ROC: receiver operating curve

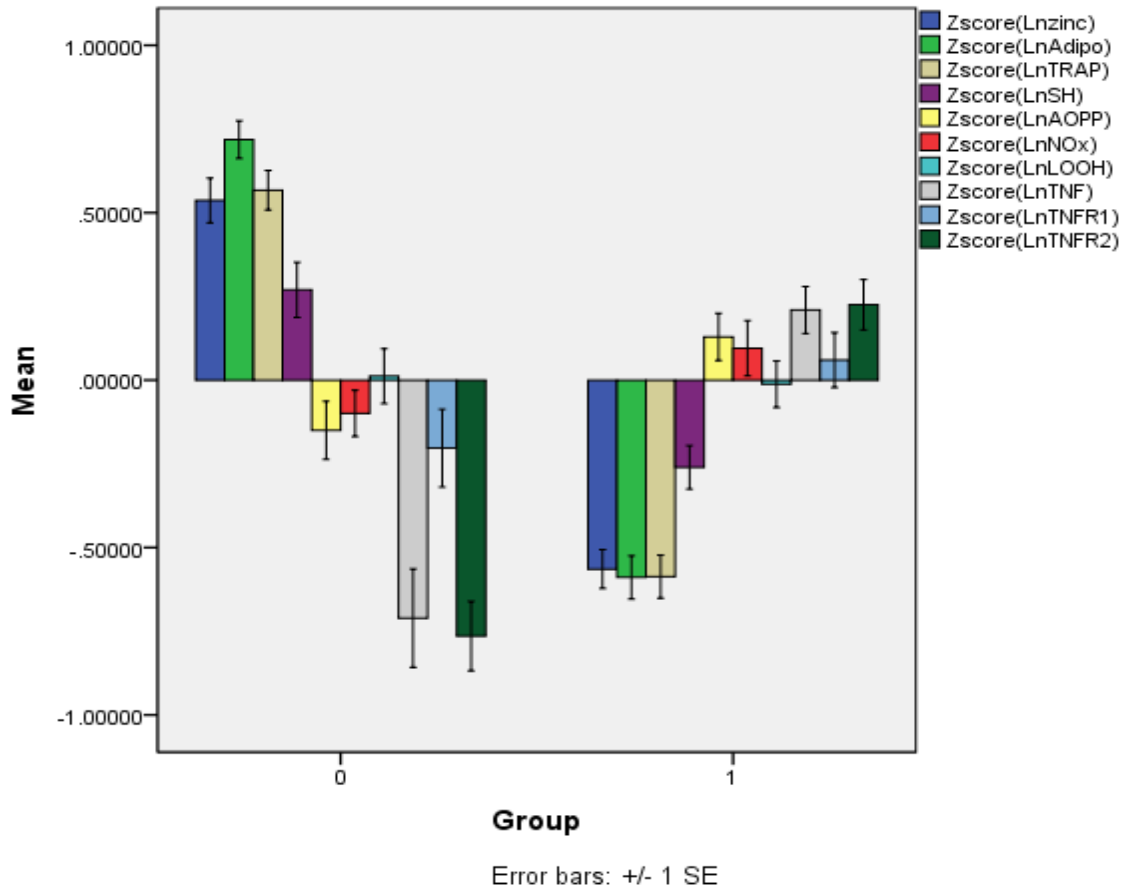


Figure 1 Values of the laboratory biomarkers in healthy controls (Group 0) and patients with multiple sclerosis (Group 1). Values of the laboratory biomarkers in healthy controls (Group 0) and patients with multiple sclerosis (Group 1). All data are in z scores computed on the logarithmic natural (Ln) transformation of the measurements. Adipo: adiponectin; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; SH groups: sulfhydryl groups; AOPPs: advanced oxidation protein products; NOx: nitric oxide metabolites; CL-LOOH: tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; TNF- α : tumor necrosis factor α ; sTNFR-1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR-2: soluble tumor necrosis factor receptor 2.

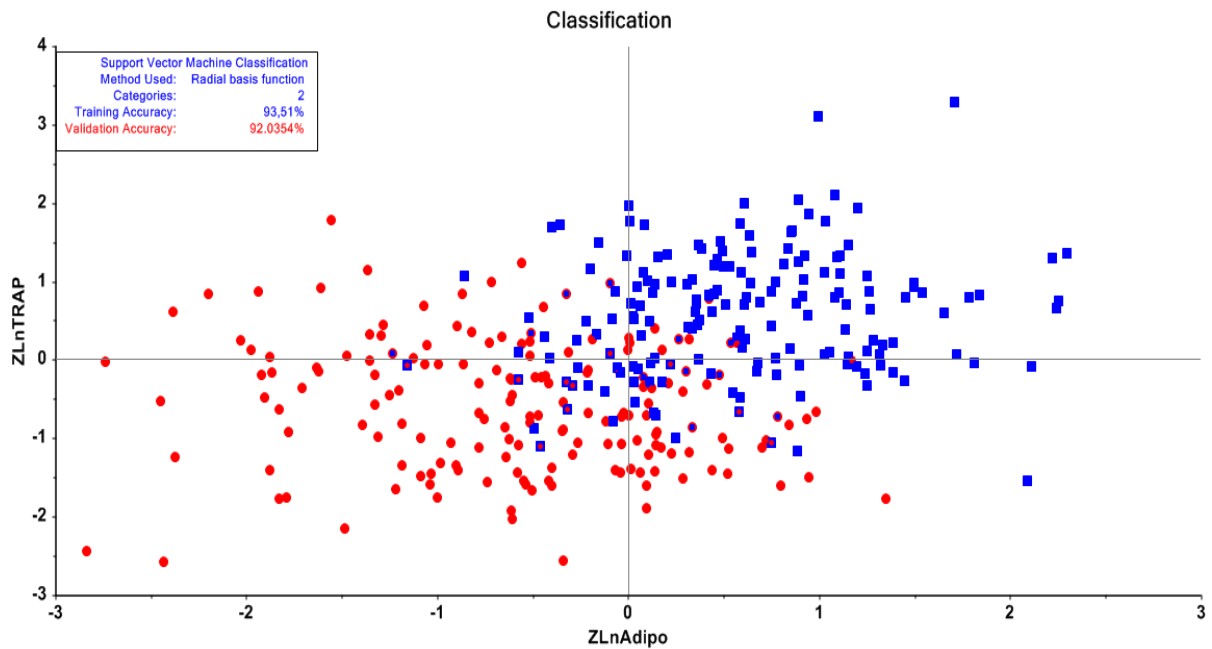


Figure 2 Results of 10-fold validation accuracy obtained with support vector model (SVM, Radial basis Function) with the adiponectin, TRAP, zinc and SH groups as input variables.

This plot shows the separation in a two dimensional plot with adiponectin and TRAP displayed on the axes. MS patients (red dots) and healthy controls (blue squares). zLnTRAP: z score of total radical-trapping antioxidant parameter; zLnAdipo: z score of adiponectin (both in Ln transformation).

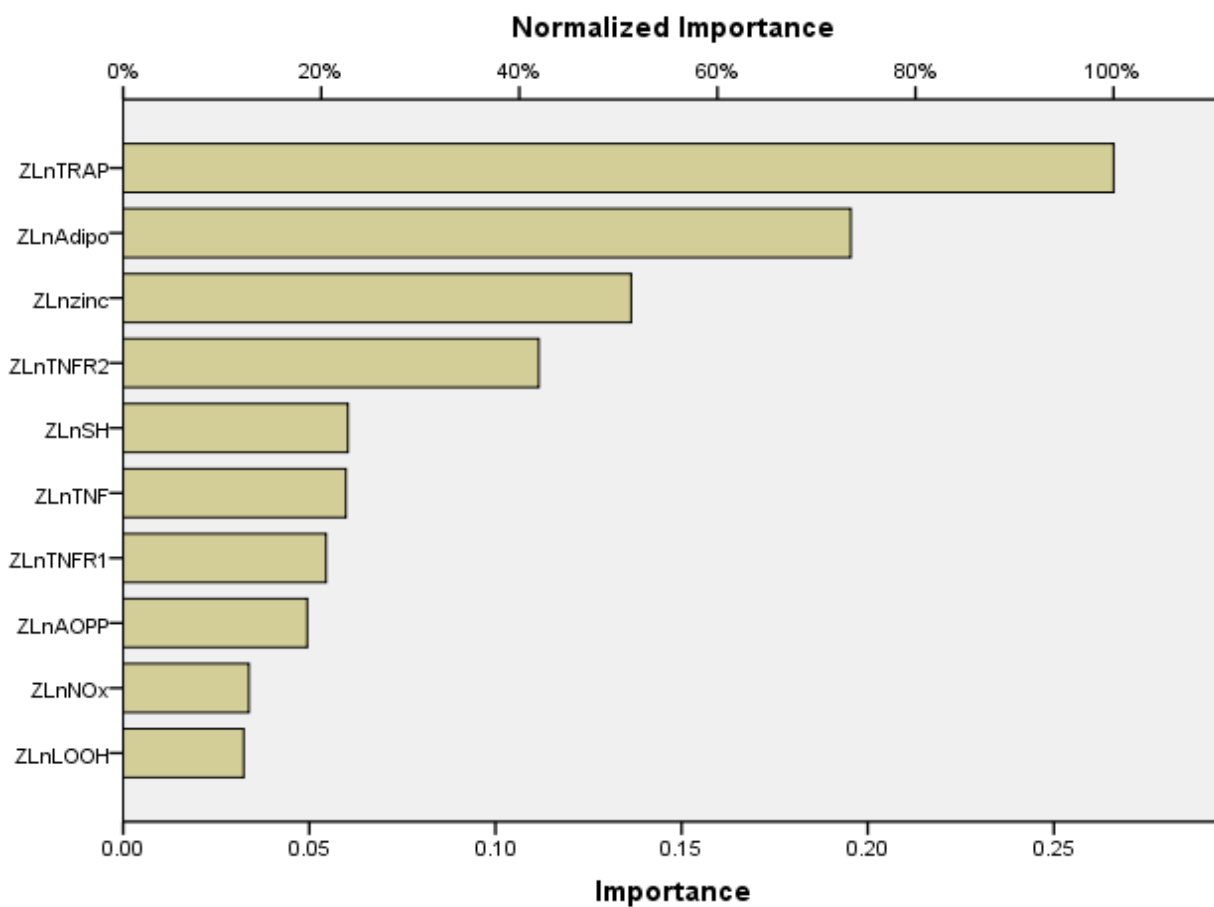


Figure 3 Relative importance of the input variables in the multiple sclerosis diagnosis. The values are expressed as z scores. TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; Adipo: adiponectin; SH groups: sulfhydryl groups; AOPPs: advanced oxidation protein products; NOx: nitric oxide metabolites; CL-LOOH: tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; TNF: tumor necrosis factor; TNFR1: tumor necrosis factor receptor 1; TNFR2: tumor necrosis factor receptor 2.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no artigo 1 da presente tese de doutorado permitem as seguintes conclusões:

- Alterações na homeostase zinco, cobre, manganês e ferro resultam em danos no SNC que influenciam o curso de doenças neurodegenerativas, como a DA, DP e EM;
- Alterações nos níveis de metais essenciais, incluindo baixos níveis de zinco, bem como altos níveis de cobre, manganês e ferro participam da ativação de vias de sinalização envolvidas na resposta IO&NS, incluindo o NF- κ B e proteína ativadora-1 (AP-1).
- Os efeitos deletérios desses metais são ocasionados pela indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-17 e IFN- γ , bem como ciclooxigenase 2 (COX-2), iNOS, MMP e moléculas de adesão que são chaves no dano no SNC;
- O zinco é um cofator para mais de 300 enzimas e metaloproteínas, incluindo a PBM e as MMP, proteínas com importante envolvimento na patogênese da EM.
- Na resposta imune adaptativa, a deficiência de zinco pode levar à atrofia do timo, redução da atividade da timulina, diminuição da proliferação de LT, modulação para uma resposta Th2 e falha na regulação negativa das células Th17, principais mecanismos que contribuem para a patogênese da autoimunidade da EM;
- O aumento do cobre leva ao aumento das ERO, microinflamação, disfunções do transporte de elétrons na mitocôndria (por interferências na citocromo oxidase) e ativação das células da glia;
- Manganês é cofactor de enzimas essenciais para o SNC, como a glutamina sintetase (GS), piruvato decarboxilase e Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD), requeridas para a síntese de neurotransmissores e regulação da excitotoxicidade no SNC. O aumento do manganês promove aumento da excitotoxicidade no SNC, aumenta a ativação da micróglia e as disfunções mitocondriais, levando ao aumento do EO&N, danos e morte celular;
- O aumento do ferro leva ao aumento da produção de ERO e de citocinas pró-inflamatórias, com deposição do metal e danos celulares, em especial na massa branca cerebral.

Os resultados obtidos no artigo 2 da presente tese de doutorado permitem as seguintes conclusões:

- Os resultados do estudo caso-controle ressaltaram que a EM é caracterizada por níveis elevados de oxidantes e níveis diminuídos de antioxidantes;
- O diagnóstico de EM exerceu um forte efeito nos níveis dos biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo, sendo responsável por 68,2% da variância dos níveis de zinco, adiponectina, TRAP, grupos SH, NOx, AOPP e CL-LOOH, mesmo após o ajuste por sexo, idade e BMI;
- O diagnóstico de EM exerceu um efeito moderado sobre níveis de TNF- α , sTNFR1 e TNFR2, sendo responsável por 27,5% da variância desses três biomarcadores em conjunto; isoladamente, o diagnóstico de EM foi responsável por 14,7% e 16,7% das variações dos níveis séricos de TNF- α e sTNFR2, respectivamente;
- Níveis baixos de zinco foram associados com maior probabilidade de desenvolvimento de EM, bem como de adiponectina e grupos SH. Por outro lado, níveis elevados de sTNFR2 foram associados com maior probabilidade de desenvolvimento de EM (OR: 5,60, IC 95%: 1,38-22,83, $p = 0,016$).
- A combinação de quatro biomarcadores antioxidantes (TRAP, adiponectina, zinco e grupos SH) com o biomarcador inflamatório sTNFR2 constitui um modelo preditor que pode contribuir para o diagnóstico de EM. Com este modelo, 97,4% dos indivíduos foram corretamente classificados, com sensibilidade de 98,7%, especificidade de 91,7% e acurácia de 92,92% (*training*) e 90,56% (*validação*).
- Os biomarcadores TRAP e adiponectina foram os mais importantes neste modelo, seguidos à distância pelo zinco e sTNFR2.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A EM é uma doença grave que, até o presente momento, não possui cura, e que atinge, principalmente, jovens adultos em idade produtiva. Atualmente, há disponibilidade de ampla gama de medicamentos, que devem ser adequados ao paciente de acordo com sua heterogeneidade clínica. A grande heterogeneidade clínica apresentada pelos pacientes com EM pode ser resultado do desequilíbrio dos diferentes mecanismos envolvidos, como inflamação/anti-inflamação e oxidantes/antioxidantes. A busca por biomarcadores que auxiliem o diagnóstico bem como identifiquem as alterações mais predominantes nos diferentes mecanismos lesivos presentes em cada um dos pacientes pode contribuir para a utilização de medicina personalizada, em especial aos pacientes que não respondem aos medicamentos atualmente disponíveis. Além disto, a identificação destes biomarcadores pode sugerir novos alvos terapêuticos que, associados aos clássicos, podem contribuir para melhora na qualidade de vida do paciente.

Neste estudo, algumas limitações devem ser consideradas. O delineamento transversal caso-controle não permite inferências sobre relação causal entre os biomarcadores avaliados e a ocorrência de EM. No entanto, este estudo tem como pontos fortes, uma análise estatística robusta, com o ajuste dos resultados para variáveis confundidoras, incluindo idade, sexo, IMC e terapia para EM. O estudo emprega análises com modelos matemáticos como SVM, rede neural, testes de treinamento e de validação da acurácia. Atualmente, esses são considerados os melhores modelos para predizer biomarcadores candidatos preditores do diagnóstico, prognóstico e monitoramento do tratamento de uma doença.

Os resultados do presente estudo apontam a importância da manutenção da homeostase dos metais zinco, cobre, manganês e ferro como um dos fatores envolvidos na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como a DA, DP e EM, o que pode justificar a avaliação laboratorial destes metais nos pacientes acometidos por estas doenças. Além disto, os resultados sugerem que a capacidade total antioxidante do plasma, adiponectina, zinco, grupos SH e sTNFR2 desempenham um papel importante na fisiopatologia da EM e sua combinação poderia ser incorporada aos atuais biomarcadores de diagnóstico da EM. Além disso, as vias envolvidas com esses biomarcadores podem ser avaliadas como potenciais alvos para uma terapia individualizada de pacientes com EM.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, B.; ADAMCZYK-SOWA, M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1973834. 2016.
- ALATAB, S. *et al.* Cytokine profile, Foxp3 and nuclear factor-kB ligand levels in multiple sclerosis subtypes. **Minerva Med**, v.102, p.461-468, 2011.
- ANTONOPOULOS, A.S. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NAPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2207-2219, 2015. doi: 10.2337/db14-1011.
- ARROYO, E. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and soluble TNF-alpha receptor responses in young vs. middle-aged males following eccentric exercise. **Exp Gerontol**, v.100, p. 28-35. 2017, doi: 10.1016/j.exger.2017.10.012.
- BADIOLA, N. *et al.* Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. **Neurobiol Dis**, v. 35, p. 438–447, 2009.
- BALDASSARI, L.E.; FOX, R. J. Therapeutic Advances and Challenges in the Treatment of Progressive Multiple Sclerosis. **Drugs**, v.78, n.15, p. 1549-1566, 2018. doi: 10.1007/s40265-018-0984-5.
- BAO, B. *et al.* The biological significance of zinc in inflammation and aging. *In*: RAHMAN I., BAGCHI, D., editors. **Inflammation, Advancing and Nutrition**. NewYork, NY: ElsevierInc 2013. p.15–27.
- BARANOSWSKA-BIK, A. *et al.* Adipokine profile in patients with anorexia nervosa. **Endokrynol Pol**, v. 68, n.4, p. 422-429, 2017. doi: 10.5603/EP.a2017.0035.
- BEECHAM, A. H. *et al.* Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. **Nat Genet**, v. 45, n. 11, p. 1353–1360, 2013.
- BENJAMINI, Y., HOCHBERG, J. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **J R Stat Soc Series B**, v.57, n.1, p.289-300, 1995.
- BRAND J. *et al.* Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis – Patients' Experiences, Information Interests and Responses to an Education Programme. **PLoS One**, v.9, n.11, p.e113252, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0113252.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Portaria Conjunta n.10, de 02 de abril de 2018.** Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/09/PORTARIA-CONJUNTA-N-10-ESCLEROSE-MULTIPLA.09.04.2018.pdf>

BREDHOLT, M.; FREDERIKSEN, J. L. Zinc in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **ASN Neuro**, v.8, n.3, pii. 1759091416651511. 2016. doi: 10.1177/1759091416651511.

BROWNLEE W. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. **The Lancet**, v. 389, n. 10076, p.1336-1346. 2017. doi:10.1016/s0140-6736(16)30959-x.

BROWNLEE, W.J.; MILLER D.H. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. **J Clin Neurosci**, v.21, n.12, p.2065-2071. 2014. doi: 10.1016/j.jocn.2014.02.026.

CALLEGARO, D. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil in 1990. **Neuroepidemiology**, v.11, p. 11-14, 1992.

CALLEGARO, D. Diagnóstico e tratamento da esclerose múltipla. **Acad Bras Neurologia**, p.1-10, 2001.

CASTRO-BORRERO, W. *et al.* Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review. **Ther Adv Neurol Disord**, v.5, n.4, p.205-220, 2012. doi: 10.1177/1756285612450936.

CHEN, K.B. *et al.* Tumor necrosis factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury, **Spine**, v. 36, 17, p. 1350–1358, 2011.

CHEN, H. *et al.* Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. **J Clin Invest**, 124: 2188–2192, 2014.

CHOI, B. Y.; JUNG, J. W.; SUH, S. W. The Emerging Role of Zinc in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **Int J Mol Sci**, v.18, n.10, p.E2070. 2017. doi: 10.3390/ijms18102070.

CHUN, J. *et al.* Fingolimod: Lessons Learned and New Opportunities for Treating Multiple Sclerosis and Other Disorders. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.59, p.149-179, 2019. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021358.

CHUN, J.; HARTUNG H. P. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. **Clin Neuropharmacol**, v.33, n. 2, p. 91-101, 2010.

ÇOBAN, A. *et al.* Investigation of the prognostic value of adipokines in multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord**, v.15, p. 11-14, 2017. doi: 10.1016/j.msard.2017.04.006.

COMABELLA, M.; MONTALBAN, X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, n.13, v. 1, p.113-126, 2014. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70233-3.

CRISTIANO, E.; ROJAS, J. I. Multiple sclerosis epidemiology in Latin America: An updated survey. **Mult Scler J Exp Transl Clin**, v. 3, n.2, 2017. doi: 10.1177/2055217317715050.

MESQUITA JUNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.** 2010, v..50, n.5, p.552-580. doi: 10.1590/S0482-50042010000500008.

DARGAHI, N. *et al.* Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain Sci**, v.7, n.7, p. E78, 2017. doi: 10.3390/brainsci7070078.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DOBSON, R.; GIOVANNONI. Multiple sclerosis - a review. **Eur J Neurol**, v.26, n. 1. p. 27-40. 2019. doi: 10.1111/ene.13819.

DOMINGUES, R. B. *et al.* The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. **Einstein (São Paulo)**, n. 15, v.1, p.100–104, 2017. doi: 10.1590/S1679-45082017RW3706.

DÜZEL, B. *et al.* Adipokines in Multiple Sclerosis Patients with and without Optic Neuritis as the First Clinical Presentation, **Immunol Invest**, v.48, n. 2, p. 190-197. 2019. doi: 10.1080/08820139.2018.1528270.

EIDE, D. J. The oxidative stress of zinc deficiency. **Metallomics**, v.3, n. 11, p. 1124-1129, 2011. doi: 10.1039/c1mt00064k.

EVANS, C. *et al.* Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. **Neuroepidemiology**, v. 40, n.3, p.195-210. 2013. doi: 10.1159/000342779.

FERREIRA, K. P. Z. *et al.* Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 373, p. 236- 241, 2017. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.039.

FERRETI, G.; BACCHETTI, T. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 311, n.1-2, p.92-97, 2011. doi: 10.1016/j.jns.2011.09.004.

FIGUEIRA, F.F.A.; FIGUEIRA, G.M.A. Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. **LAMSJ**, v.1, n.4, p.187-190, 2012.

FINKELSZTEJN, A., *et al.* Prevalência de esclerose múltipla em Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, São Paulo, v.72, n. 2, p. 104-106, 2014. doi:10.1590/0004-282X20130216.

- FISCHER, R. *et al.* Astrocyte-specific activation of TNFR2 promotes oligodendrocytematuration by secretion of leukemia inhibitory facto. **Glia**, v.62, n. 2, p. 272–283, 2014.
- FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxid Med Cell Longev**, v.2015, p. 10813, 2015. doi: 10.1155/2015/610813.
- FISCHER, R.; KONTERMANN, R.E.; MAIER O. Targeting sTNF/TNFR1: Signaling as a New Therapeutic Strategy. **Antibodies**, v. 4, p. 48-70, 2015.
- FISSOLO, N. *et al.* Levels of soluble TNFR2 are increased in serum of patients with primary progressive multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 271, p. 56-59, 2014.
- FRIEDMAN, J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? *In*: Gadoth, N. Göbel HH (eds). **Oxidative stress and free radical damage in Neurology**. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice. New York: Springer, p. 19-27, 2011.
- FRISCHER, J.M. *et al.* The Relation Between Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Brains. **Brain**, v.132, pt 5, p.1175-1189, 2009. doi: 10.1093/Brain/Awp070.
- GAMMOH, N.Z.; RINK, L. Zinc in Infection and Inflammation. **Nutrients**, v.9, n. 6. p. E624. 2017. doi: 10.3390/nu9060624.
- GAO, W. *et al.* IL-2/Anti-IL-2 Complex Attenuates Inflammation and BBB Disruption in Mice Subjected to Traumatic Brain Injury. **Front Neurol**, v.8, p.281. 2017. doi: 10.3389/fneur.2017.00281.
- GAO, H. *et al.* Opposing functions of microglial and macrophagic TNFR2 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cell Rep**, v. 18, p. 198–212, 2017.
- GHADGE, A.A. KHAIRE, A.A.; KUVELEKAR, A.A. Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 39, p.151-158. 2018. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.01.004.
- GHAZAVI, A. *et al.* High copper and low zinc serum levels in Iranian patients with multiple sclerosis: a case control study. **Clin Lab**, v.58, n.1-2, p.161-164. 2012.
- GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY. S.; BOVERIS. A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart. Liver and muscle. **Free Radic Biol Med**, v. 10. n. 2. p. 93–100, 1991.
- GROLLEMUND, V. *et al.* Machine Learning in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Achievements, Pitfalls, and Future Directions. **Front Neurosci**, v.13, article 135, 2019. doi: 10.3389/fnins.2019.00135.

GUERRERO-GARCÍA, J. J. *et al.* Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines. **Mediators Inflamm**, v.2016, p.4036232. 2016. doi: 10.1155/2016/4036232

HABBAS, S. *et al.* Neuroinflammatory TNF-alpha impairs memory via astrocyte signaling. **Cell**, v. 163, p. 1730–1741, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, G.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5th edition. NY: New York, Oxford, 2015.

HAAS, J. *et al.* Reduced suppressive effect of CD4+CD25 high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 11, p. 3343–3352, 2005.

HABBAS, S. *et al.* Neuroinflammatory TNF-alpha impairs memory via astrocyte signaling. **Cell**, v. 163, p. 1730–1741, 2015.

HAUSER, S.L. *et al.* Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. **Neurology**, v. 40, p.1735–1739, 1990.

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 380–385, 1994.

IBITOYE, R. *et al.* Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: a review. **Biomark Med**, v.10, n.8, p.889-902, 2016. doi: 10.2217/bmm-2016-0097.

KAIMEN-MACIEL D. R. **Neuroimunologia: imunopatogenia da esclerose múltipla**. Grupo Brasileiro de Neuroimunologia. 2016. Disponível em: <http://neuroimunologia.com.br/imunopatogenia-da-esclerose-multipla/>.2016. Acesso 10 Maio 2019.

KAIMEN-MACIEL, D.R.; MEDEIROS, M.C.R. Esclerose Múltipla: prevalência em duas cidades no norte do Paraná. **O Dendrito**, v. 9, n.4, p. 96-97, 2003.

KALLAUR, A.P. *et al.* Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol**, v.54, p.31-44, 2017a.

KALLAUR, A. P. *et al.* Profile in patients with progressive multiple sclerosis and its association with disease progression and disability. **Mol Neurobiol**, v. 54, p. 2950-2960, 2017b.

KALLIOLIAS, G.D.; IVASHKIV, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v.12, n.1, p.49-62, 2016. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.

- KATARINA, V. *et al.* Oxidative stress and neuroinflammation should be both considered in the occurrence of fatigue and depression in multiple sclerosis. **Acta Neurol Belg**, 2018. doi: 10.1007/s13760-018-1015-8.
- KAWAMOTO, E. *et al.* Anti-integrin therapy for multiple sclerosis. **Autoimmune Dis**, v. 2012, n. 357101. doi: 10.1155/2012/357101.
- KOLBINGER, F. *et al.* IL-17A and Multiple Sclerosis: Signaling Pathways, Producing Cells and Target Cells in the Central Nervous System. **Curr Drug Targets**, v. 17, n. 16, p. 1882–1893, 2016.
- KURTZKE J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, n.33, v.11. p. 1444-1452, 1983.
- LANA-PEIXOTO, M. A. *et al.* Prevalência da esclerose múltipla em Belo Horizonte, Brasil. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v.70, n.2, p.102-107, 2012. doi:10.1590/S0004-282X2012000200006.
- LEE, S.R. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. **Oxid Med Cell Longev**, n. 9156285. 2018. doi: 10.1155/2018/9156285.
- LEONE, C. *et al.* Effects of Rehabilitation on Gait Pattern at Usual and Fast Speeds Depend on Walking Impairment Level in Multiple Sclerosis. **Int J MS Care**, v.20, n.5, p.199-209, 2018. doi: 10.7224/1537-2073.2015-078.
- LERAY, E. *et al.* Epidemiology of multiple sclerosis. **Rev Neurol (Paris)**, v.172, n.1, p. 3-13, 2016. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.006.
- LI, Y. F. *et al.* Levels of peripheral Th17 cells and serum Th17-related cytokines in patients with multiple sclerosis: a meta-analysis. **Mult Scler Relat Disord**, v.18, p.20-25. 2017. doi: 10.1016/j.msard.2017.09.003.
- LIU, D.; LUO, S. LI, Z. Multifaceted roles of adiponectin in rheumatoid arthritis. **Int Immunopharmacol**, v.28, n.2, p. 1084-1090. 2015. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.013.
- LOZOVYOY, M. *et al.* Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome. **Lupus**, v.20, n.13, p. 1356-1364, 2011. doi: 10.1177/0961203311411348.
- LUBLIN, F.D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology**, v. 83, p. 278-286, 2014.
- LJUBISAVLJEVIC S. Oxidative Stress and Neurobiology of Demyelination. **Mol Neurobiol**, v.53, n.1, p.744-758, 2016. doi: 10.1007/s12035-014-9041-x.

LUKÁČ, S.; KALNOVIČOVÁ, T. MUCHOVÁ, J. Evaluation of oxidative and nitrosative stress in relapsing remitting multiple sclerosis. **Health**, v.5, n. 11, p. 1924-1928, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/health.2013.511260>.

MARRODAN, M. *et al.* The role of infections in multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 25, n. 7, p. 891-901, 2019. doi: 10.1177/1352458518823940.

MATVEEVA, O. *et al.* Western lifestyle and immunopathology of multiple sclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.17, n.1, p. 71-86, 2018. doi: 10.1111/nyas.13583.

McDONALD, W.I. *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. **Ann Neurol**, v.50, p.121-127, 2001.

MILLER, E.; WACHOWICZ, B. Advances in antioxidative therapy of multiple sclerosis. **Curr Med Chem**, v.20. n.37, p.4720-4730, 2013. doi: 10.2174/09298673113209990156.

MONTI A.C. *et al.* Is geo-environmental exposure a risk factor for multiple sclerosis? a population-based cross-sectional study in south-western Sardinia. **PlosOne**, v. 11, n.9, p. e0163313, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0163313.

MOREL, A. *et al.* Markers of oxidative/nitrative damage of plasma proteins correlated with EDSS and BDI scores in patients with secondary progressive multiple sclerosis. **Redox Report**, v.22, n.6, 2017. doi: 10.1080/13510002.2017.1325571.

MORRIS, G. *et al.* Multiple Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Stress Pathways Explain the Frequent Presence of Depression in Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol**, v.55, p.55:6282–6306. 2018. doi: 10.1007/s12035-017-0843-5.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. **Atlas da Esclerose Múltipla em 2013**: mapeamento da esclerose múltipla no mundo. Disponível em <http://abem.org.br/esclerose/atlas-da-esclerose-multipla-2013>. Acesso em: 10 Abr 2019.

NAGY, G. *et al.* Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v.12, n. 3, p. 210, 2010. doi: 10.1186/ar3045.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE (NIH). **Multiple Sclerosis Information Page**. 2018. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Multiple-Sclerosis-Information-Page>. Acesso em 10 abr 2019.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J.A.; GARCÍA-BENAYAS, C., ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin Chem**, v.44, n.33, p.679-681, 1998.

OLIVEIRA, S.R. *et al.* Immunopathological Mechanisms and Oxidative Stress Damage in Multiple Sclerosis. *In*: DICHI, I. *et al.* **Role of oxidative stress in chronic diseases**. Boca Raton: CRC Press. 2014. 720 pages.

- OLIVEIRA, S.R. *et al.* Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. **Metab Brain Dis**, v.33, n.5, p. 1393-1399, 2018. doi: 10.1007/s11011-018-0224-4.
- OLIVEIRA, S.R. *et al.* Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. **J Neurol Sci**, v.321, n.1-2, p.49-53, 2012. doi: 10.1016/j.jns.2012.07.045.
- PAN, Z. *et al.* Zinc transporters and dysregulated channels in cancers. **Front Biosci, (Landmark Ed)**. v.22, p. 623-643. 2017.
- PATEL, J. R. *et al.* Astrocyte TNFR2 is required for **CXCL12**-mediated regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation within the adult CNS. **Acta Neuropathol**, v.124, n. 6, P.847-860, 2012. doi: 10.1007/s00401-012-1034-0.
- PAVELEK, Z. *et al.* Proteomic analysis of cerebrospinal fluid for relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. **Biomed Rep**, v.5, p. 35-40, 2016. doi: 10.3892/br.2016.668.
- PAWLITZKI, M. Lower Serum Zinc Levels in Patients with Multiple Sclerosis Compared to Healthy Controls. **Nutrients**, v.10, n.967, 2018. doi:10.3390/nu10080967.
- PEREIRA, A.B.C. N. G. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Mult Scler Relat Disord**, v. 4, n. 6, p.572–579. 2015. doi: 10.1016/j.msard.2015.08.004.
- PERON, J.P. *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. **J Neuroimmunol**, v. 227, n.1-2, 2010. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.06.002.
- POLMAN, C.H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Ann Neurol**, v.69, n.2, p. 292-302, 2011. doi: 10.1002/ana.22366.
- PRASAD, A.S. Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging. **J Trace Elem Med Biol**, v.28, n.4, p.364-371. 2014. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.019.
- PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, v. 302, p. 2-22. 2015. doi: 10.1016/J.Neuroscience.2015.06.038.
- RAHMANZADEH, R. *et al.* Multiple sclerosis pathogenesis: missing pieces of an old puzzle. **Rev Neurosci**, v.30, n. 1, p.67-83, 2018. doi: 10.1515/revneuro-2018-0002.
- REICH, D. S.; LUCCHINETTI, C. F.; CALABRESI, P. A. Multiple Sclerosis. **N Engl J Med**, v. 378, n. 2, p. 169–180, 2018.

REN, Y. *et al.* Adiponectin modulates oxidative stress-induced mitophagy and protects C2C12 myoblasts against apoptosis. **Sci Rep**, v.7, n.1, p.3209, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-03319-2.

RIBEIRO, S. B. F. *et al.* Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v. 69, n.2, p. 184-187. 2011. doi: 10.1590/S0004-282X2011000200008.

ROCHA, F.C.G.; HERRERA, L.C.L., MORALES, R.R. Multiple sclerosis in Botucatu, Brazil: a population study. **Mult Scler**, v. 8, suplemento 1, 2002.

ROSENKRANZ, E. *et al.* Induction of regulatory T cells in Th1-/Th17-driven experimental autoimmune encephalomyelitis by zinc administration. **J Nutr Biochem**, v. 29, p.116-123, 2016. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.010.

SADOWSKA-BARSTOSZ, I. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. **Neurochem Int**, v. 63, n.5, p.507-516, 2013. doi: 10.1016/j.neuint.2013.08.009.

SANNA, A. *et al.* Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v.10, n.1, p.E68. 2018. doi: 10.3390/nu10010068.

SAPKOTA, M.; KNOELL, D. L. Essential Role of Zinc and Zinc Transporters in Myeloid Cell Function and Host Defense against Infection. **J Immunol Res**, v. 2018, n. ID 4315140. 2018. doi:10.1155/2018/4315140.

SEVEN, A. *et al.* Evaluation of oxidative and nitrosative stress in relapsing remitting multiple sclerosis: effect of corticosteroid therapy **Folia Neuropathol**, v.51, n.1, p.58-64, 2013. doi: 10.5114/fn.2013.34197.

SHARIEF, M.K.; HENTGES, R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med**, v. 325, p.467-472, 1991.

SOCHA, K. Dietary habits; concentration of copper, zinc, and Cu-to-Zn ratio in serum and ability status of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Nutrition**, v.39-40; n. 76-81. 2017. doi: 10.1016/j.nut.2017.03.009.

SORENSEN, P. S.; BLINKENBERG, M. The Potential Role for Ocrelizumab in the Treatment of Multiple Sclerosis: Current Evidence and Future Prospects. **Ther Adv Neurol Disord**, v. 9, n.1, p. 44-52, 2016.

SOSPEDRA, M. MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Semin Neurol**, v.36, n.2, p.115-127. 2016. doi: 10.1055/s-0036-1579739.

STAUN-RAM, E.; MILLER, A. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. **Clin Immunol**, v.184, p. 11-25, 2017. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.014.

STOOP, R.P. *et al.* Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. **PLoS One**, v.5, n.8, p.e12442, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0012442.

SYSTEMS BIOLOGY VERIFICATIONS (SBV IMPROVER). **Diagnostic Signature Challenge - MS Stage Sub-Challenge**. 2019. Disponível em: <https://www.sbvimprover.com/challenge-1/challenge/ms-stage>. Acesso em 10 Abr 2019.

SZEWZYK B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. **Front Aging Neurosci**, v.19, p.5-33. 2013. doi: 10.3389/fnagi.2013.00033.

TAVAZZI, E.; ROVARIS, M.; LA MANTIA, L. Drug therapy for multiple sclerosis. **CMAJ**, v. 186, n.11, p. 833-840, 2014. doi: 10.1503/cmaj.130727.

THOMPSON A. J. *et al.* Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1622-1636.2018. Disponível em: <http://neuroimunologia.com.br/imunopatogenia-da-esclerose-multipla/>.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n.10, p. 772-783, 2006. doi: 10.1038/nri1937.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SATRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. **Nat Rev Neurol**, v.15, n1, p.53-58. 2019. doi: 10.1038/s41582-018-0082-z.

VASCONCELOS, S. M. L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VIGLIETTA, V. *et al.* Efficacy of delayed-release dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: integrated analysis of the phase 3 trials. **Ann Clin Transl Neurol**, v. 2, p.103–118, 2015.

WANG, K. The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. **Am J Med Sci**, v.356, n. 6, p. 552-560, 2018. doi: 10.1016/j.amjms.2018.08.018.

WINGERCHUK, D.M.; WEINSHENKER, B.G. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. **BMJ**, v.254, p. i3518, 2016. doi: 10.1136/bmj.i3518.

WITKO-SARSAT *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, n. 5, p. 1304-1313. 1996. doi:10.1038/ki.1996.186.

WOODWARD, L. *et al.* Adiponectin paradox: novel roles of adiponectin in the regulation of cardiovascular disease. **Br J Pharmacol**, v.174, n.22, p. 4007–4020. 2017. doi: 10.1111/bph.13619.

YOKOTA, T. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Bloom**, v.96, n.5, p.1723-1732. 2000.

YOUSEFIAN M, *et al.* Gender-Specific Association of leptin and adiponectin genes with multiple sclerosis. **Am J Med Sci**, v. 356, n.2, p.159-167, 2018.

ZHANG, D. *et al.* Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 7, p. 2853-2689. 2016. doi: 10.1210/EN.2015-2078.

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 e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440.


Fone: 43-3371-2321 (Imunologia)

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

ANEXO A
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos/HUUEL



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

Parecer de Aprovação Nº 159/10 CAAE Nº 0140.0.268.000-10 FOLHA DE ROSTO Nº 355660	Londrina, 30 de agosto de 2010.
PESQUISADORA: EDNA MARIA VISSOCI REICHE	
Prezada Senhora: 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 style="text-align: center;">"AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA"</p>	
Situação do Projeto: APROVADO Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UUEL relatório final da pesquisa.	
Atenciosamente,  Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UUEL	