

LIPOPROTEÍNAS E INFLAMAÇÃO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Medicina

Especialidade de Bioquímica



Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Maria João Melo Cascais

2010

Agradecimentos

Quando queremos agradecer todo o trabalho e atenção daqueles que de algum modo colaboraram para que pudéssemos escrever a dissertação que a seguir se apresenta, salvo algumas figuras de evidente importância, ficamos em dúvida pelo lugar a atribuir aos outros intervenientes. Às vezes nem nos lembramos de os mencionar e foram importantes em momentos de grande dificuldade, passaram no nosso percurso, mesmo que por breve tempo, e deram a sua contribuição para o NOSSO trabalho. Para essas pessoas, se de algum modo se sentiram esquecidas, não o estão. Foram e são, muito importantes.

O primeiro agradecimento é dirigido ao Sr. Professor Armando Sena, meu Orientador, pela confiança que depositou em mim há alguns anos, acreditando que alguém, médica de formação, mas sem preparação específica na área da Neurologia, pudesse, com o seu apoio e ajuda, tentar através da Bioquímica dar o seu contributo para esta matéria de estudo e investigação. O cientista, que é para mim a sua melhor definição, nunca me deixou diminuir a qualidade do trabalho realizado, e a actualização quase ao “minuto”, levou-me muitas vezes a pensar se conseguiria estar à altura da tarefa a que me tinha proposto. No entanto, os seus ensinamentos nunca foram desperdiçados e acabaram por levar ao trabalho que apresentei.

Devo também um agradecimento à Professora Doutora Maria da Graça Morais por todo o apoio prestado ao longo destes anos em que trabalhei neste Departamento de Bioquímica sob a sua regência, disponibilizando-me todos os meios humanos e materiais nesta Faculdade para a realização das tarefas a que me tinha proposto.

Para o Professor Doutor Miguel Seabra, actual Regente de Bioquímica, um agradecimento especial, pela inovação do nosso meio académico, científico e humano, que confiou desde o primeiro dia, que este trabalho era exequível e me deu toda a ajuda, para lá do nível profissional que lhe competiria, com uma grande compreensão para as dificuldades que surgem no nosso caminho nesta ambição de querer realizar um trabalho científico.

Na minha carreira hospitalar devo agradecer também aos Directores de Serviço de Patologia Clínica, Dr. Mira Cabaço e Dr. João Perera de Almeida, da Maternidade Dr. Alfredo da Costa e ao seu Director, Professor Doutor Jorge Branco a compreensão para este percurso académico, muitas vezes difícil de explicar fora das paredes de uma Faculdade. Muitas vezes me proporcionaram um ambiente científico e de experimentação que são de louvar.

Uma palavra especial para o Luís Miguel Cardoso, meu aluno, daqueles que nos levam a pensar que vale a pena ensinar. Com o seu entusiasmo por este trabalho, ajuda científica e prática tornou o percurso mais fácil. Na hora de ler estas linhas já será nosso colega, muito obrigada.

Muito do meu trabalho decorreu dentro de um Laboratório onde fiz parte de uma equipa, com Técnicos competentes e disponíveis que contribuíram para o sucesso desta investigação. Agradeço à Técnica D. Firmina Lebre e D. Augusta Marques na Faculdade de Ciências Médicas e também às Técnicas D. Teresa Almeida e D. Maria José Martins. Um agradecimento também pelas qualidades humanas e competência da secretária D. Helena Almeida e, pelo apoio logístico e humano, à Dra. Sofia Tavares de Biologia Molecular e D. Isabel Coelho, meios audiovisuais.

“Last but not least” uma palavra para a minha família, que assistiu a este caminho, por vezes menos fácil, em que são relegados para segundo plano, e deixam de manter contacto com o “aspirante a cientista” em que por vezes nos tornamos. Muito obrigada pela paciência demonstrada.

Devo ainda um agradecimento às companhias farmacêuticas, Bayer Schering, Biogen idec, Merck Serono e Sanofi-Aventis pelo apoio financeiro para a realização dos estudos apresentados nesta Tese.

Um agradecimento à Dra. Elizabeth Benito Garcia e Dra Joana Vasconcelos, da BoEpi (Clinical and Translational Research Center), Oeiras, pela colaboração nas análises estatísticas.

Pra a Dr^a Paula Mateus pela revisão e conselhos linguísticos, também os meus agradecimentos.

Índice

PREÂMBULO	13
PARTE I – INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO 1.....	19
PATOLOGIA E CLÍNICA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: BREVES CONCEITOS BÁSICOS.....	19
EPIDEMIOLOGIA: ASPECTOS AMBIENTAIS E GENÉTICOS	19
BREVE DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	21
DIAGNÓSTICO	22
PATOLOGIA E PATOGENIA	23
As Placas na Esclerose Múltipla	23
Patogenia	24
TERAPÊUTICA.....	25
Interferão β	26
Acetato de glatirâmero.....	27
Natalizumab.....	27
CAPÍTULO 2.....	28
INFLAMAÇÃO E ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	28
PROTEÍNA C REACTIVA	29
AMILÓIDE SÉRICO A (ASA)	31
FIBRINOGENÍO E SISTEMA DA COAGULAÇÃO	32
FERRITINA E METABOLISMO DO FERRO	34
NEOPTERINA	35
Marcador Inflamatório	36
Relação com LDL oxidadas.....	36
Neopterina e EM.....	37
ÁCIDO ÚRICO E STRESS OXIDATIVO.....	37
LEPTINA.....	38
ADIPONECTINA	40
CONCLUSÃO	41
CAPÍTULO 3.....	43
LIPOPROTEÍNAS E ESCLEROSE MÚLTIPLA	43
METABOLISMO LIPOPROTEICO PLASMÁTICO	43
LIPOPROTEÍNAS E INFLAMAÇÃO	49
VLDL Efeitos pró-inflamatórios	49
Remanescentes.....	50
LDL e Inflamação.....	52
Lp(a).....	53
HDL e Inflamação.....	54
Propriedades Anti-Inflamatórias da HDL.....	56
APOPROTEÍNA A-I	56
APOPROTEÍNA J.....	57
APOPROTEÍNA M.....	58
PAF-AH	58
PARAOXONASE.....	59
PROTECÇÃO ENDOTELIAL.....	59
Propriedades Pró-Inflamatórias da HDL.....	61
GLICAÇÃO DA HDL.....	62
MODIFICAÇÃO DA HDL PELA MIELOPEROXIDASE	62
LÍPIDOS E PATOGENIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA	63
Introdução	63
Papel da apoE na Inflamação	66
ApoE na Neurodegenerescência	66
ApoE e Esclerose Múltipla	67

METABOLISMO LIPÍDICO E ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	68
CAPÍTULO 4.....	71
FUNDAMENTOS E OBJECTIVOS DE ESTUDO	71
PARTE II – MATERIAL E MÉTODOS	76
CAPÍTULO 1. MATERIAL.....	78
POPULAÇÃO	78
CAPÍTULO 2. MÉTODOS.....	79
MÉTODOS LABORATORIAIS.....	79
Colesterol Total.....	79
Triglicéridos	79
HDL colesterol.....	80
Apo A-I	80
Apo B.....	81
Ácido Úrico	81
Leptina	82
Princípio do Procedimento.....	82
Metaloproteinase 9	83
Princípio do Procedimento.....	83
Preparação da amostra	83
Neopterina.....	83
Princípio do Procedimento.....	84
Amostras	84
LDL oxidada.....	85
Princípio do Procedimento.....	85
Lipoproteínas Remanescentes.....	85
Princípio do Procedimento.....	85
Amostras	86
ApoE.....	86
FENOTIPAGEM DA APOLIPOPROTEINA E	87
Ferritina	89
Fibrinogénio.....	90
Adiponectina.....	90
Princípio do Procedimento.....	91
Anticorpos Neutralizantes (Nab’s).....	91
MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	92
PARTE III – RESULTADOS.....	94
ESTUDO 1. E1	96
Conclusão.....	97
ESTUDO 2. E2	100
Breve Introdução	100
Resultados	100
Conclusões.....	101
ESTUDO 3. E3	104
Breve Introdução	104
ESTUDO 4. E4	108
Breve Introdução	108
Resultados	108
Conclusões.....	110
ESTUDO 5. E5	112
Breve Introdução	112
Resultados	112
ESTUDO E 6 (E 6).....	118
Breve Introdução	118

Resultados	119
Conclusões	122
PARTE IV - DISCUSSÃO	126
DISCUSSÃO	128
PARTE V – SÍNTESE E CONCLUSÃO	136
SÍNTESE	138
CONCLUSÃO	140
BIBLIOGRAFIA	144
ANEXOS.....	163
ESTUDO 1	165
ESTUDO 2	167
ESTUDO 3	169
ESTUDO 4	171
ESTUDO 5	173
ESTUDO 6	175

Preâmbulo

Os processos inflamatórios induzem alterações marcadas do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas e estas, por sua vez, regulam as reacções imunitárias.

Dadas as muitas relações existentes entre imunidade inata e adquirida e o metabolismo das lipoproteínas, investigámos neste trabalho a sua possível relevância para a compreensão da Esclerose Múltipla (EM), uma doença neuroinflamatória e neurodegenerativa do Sistema Nervoso Central (SNC).

Como será evidente ao longo da nossa exposição, consideramos também que ao tomarmos esta doença como modelo de investigação para estas interacções, poderemos também obter informação importante sobre as bases bioquímicas de mecanismos fisiopatológicos relevantes para muitas outras entidades patológicas.

Dividiu-se esta dissertação nas seguintes partes e capítulos:

PARTE I – INTRODUÇÃO

Capítulo I. Introdução

Neste capítulo faz-se uma breve definição da Esclerose Múltipla, dos seus mecanismos patogénicos, apresentação clínica, diagnóstico e tratamento.

Capítulo 2. Inflamação e Esclerose Múltipla

Apresentam-se alguns marcadores inflamatórios e as suas relações com EM detalhando aqueles com relevância para a discussão deste trabalho

Capítulo 3. Lipoproteínas e EM

Neste local são revistas as relações do metabolismo lipoproteico com os processos inflamatórios e a sua possível relevância para a EM

Capítulo 4. Fundamentos e Objectivos do Trabalho

Com base na revisão efectuada neste capítulo são apresentados os objectivos deste trabalho.

PARTE II - MATERIAL E MÉTODOS

Neste é caracterizada a população estudada, os parâmetros determinados, e metodologia laboratorial utilizada, e métodos estatísticos usados.

PARTE III – RESULTADOS

Os resultados obtidos e publicados são aqui apresentados

PARTE IV – DISCUSSÃO

Neste local efectuamos uma discussão geral dos resultados

Parte V - SÍNTESE E CONCLUSÃO

PARTE VI – BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

PARTE I – INTRODUÇÃO

Capítulo 1

Patologia e Clínica da Esclerose Múltipla: Breves Conceitos Básicos

A esclerose múltipla é a doença desmielinizante mais frequente do Sistema Nervoso Central (SNC) e uma das causas mais comuns de incapacidade neurológica em adultos jovens.

A doença começa por ser diagnosticada no início do século XIX, mas só teve reconhecimento como entidade nosológica independente, em neurologia, com Carswell e Curveillier, que descreveram, em 1841, algumas das características patológicas da esclerose múltipla (Hickey, 1999).(2)

As primeiras correlações anatomo-clínicas devem-se a Jean Martin Charcot (1868), tendo sido um dos seus colaboradores, Vulpian, quem introduziu o termo “esclerose em placas” (3)

As primeiras descrições nos Estados Unidos da América, devem-se a Edward Seguin, o qual a denominou “esclerose múltipla”.(4, 5)

Uma das primeiras sociedades dedicadas a esta patologia surgiu, em 1946, nos Estados Unidos, a *National Multiple Sclerosis Society (NMSS)*. Mais tarde, facilitando a comunicação e investigação, surgiram o *ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis)* em 1982 e, em 1996, o *ACTRIMS (American Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis)*.

Epidemiologia: Aspectos Ambientais e Genéticos

A Esclerose Múltipla (EM) é considerada a patologia neurológica crónica mais comum em adultos jovens na Europa e América do Norte.

É mais frequente no Norte da Europa, mais precisamente, no Sul da Escandinávia, Norte da Alemanha e Reino Unido, assim como em algumas zonas de Itália (Sardenha).(6, 7)

Nas restantes zonas do mundo, encontra-se onde houve povoamento por europeus do norte, sendo que destes, um por mil irá desenvolver EM até ao fim da vida, sendo posta a hipótese de ser o “Mal de Odin”, doença transmitida pelas invasões vikings.(8)

Em Portugal, a prevalência de EM não é conhecida com precisão mas estima-se entre os 50 a 100 casos por 100.000, valores idênticos aos da Espanha e Sul de França (9)

Os dados fornecidos pelos estudos de migrações mostram que o desenvolvimento da doença nos indivíduos pertencentes a uma população de grande prevalência depende da idade em que se fez a migração.

O risco de desenvolver esta doença passa a ser semelhante ao da população para onde migram se o fizerem antes dos 15 anos de idade. Se a migração ocorre mais tarde, o risco mantém-se igual ao da população de origem(10). Estes dados indicam a importância de factores ambientais com efeitos nos períodos iniciais do desenvolvimento (até cerca da puberdade) do indivíduo. Entre aqueles atribui-se actualmente importância a uma deficiência em vitamina D, nomeadamente pela reduzida exposição aos raios ultravioleta com o aumento das latitudes e, possivelmente, pela infecção pelo vírus Epstein Barr.(11-14) No entanto, esses poderão interagir com aspectos nutricionais (eventualmente também fontes de vitamina D) e outros agentes infecciosos(15) O hábito tabágico também poderá ser um factor de risco.

A EM afecta quase todas as idades, mas a maioria dos pacientes desenvolve a doença entre os 18 e 50 anos. Há um predomínio do sexo feminino na EM com surtos-remissão mas não na doença primária progressiva, em que poderá haver ligeira predominância masculina. Este ponto levanta só por si, no que diz respeito à forma de surtos remissão, a implicação de factores genéticos, invocando a modulação do sistema imunitário pelas hormonas sexuais. (16). Outras doenças com mecanismos auto-ímmunes (lúpus eritematoso disseminado, artrite reumatóide) apresentam mais prevalência no sexo feminino. Na verdade, o factor de risco genético mais aceite de susceptibilidade para a EM está ligado ao sistema imunitário e é conferido pelo complexo major de histocompatibilidade HLA-DRB 1. Contudo a sua presença não explica só por si a frequência da doença nalgumas populações (17), **(18)**. Muitos outros factores genéticos (como sugerido pelos estudos de incidência familiar) e de

Índole étnica poderão favorecer o desenvolvimento da doença por interação com factores ambientais particulares. Em síntese, a EM será devida a uma complexa, e ainda não completamente esclarecida, interação entre factores genéticos e ambientais.

Breve Descrição Clínica

A EM é uma entidade clinicamente heterogénea com diferentes formas ou tipos de apresentação e evolução clínica.

Na sua forma mais frequente (cerca de 85%), definida como EM de surto remissão, manifestam-se sinais agudos (designados surtos) que podem ser muito variáveis, da esfera sensitiva, sensorial ou motora, que se instalam ao longo de dias e estabilizam em cerca de quatro semanas, podendo regredir total ou parcialmente. Por definição, o surto dura mais de 24 horas e pode prolongar-se por um período de 4 semanas. Todos os sinais que se instalam ao longo do mês fazem parte do mesmo surto. A existência de sinais ou sintomas ao longo de 6 meses indica lesão neurológica permanente. Aproximadamente 10 a 15 anos após o diagnóstico, cerca de 80% destes doentes entra numa fase progressiva, com ou sem surtos de agravamento, designada EM secundária progressiva.

Cerca de 10% dos doentes tem um curso progressivo desde o início, sem surtos. Estas são as formas primárias progressivas, que surgem em geral em idades mais tardias, atingem os dois sexos com igual frequência manifestando-se frequentemente com paraparésia ou tetraparésia lentamente progressiva; noutros casos, há um curso progressivo e insidioso, desde o início, mas a ele sobrepõem-se surtos de agravamento. Correspondem a 5% dos doentes e são denominadas remitentes progressivas ou transicionais, ou progressivas com surtos.

Para avaliação da incapacidade neurológica e severidade ou grau de progressão da doença têm sido criadas várias escalas.

A escala de Kurtzke de 1975 mede o estado de incapacidade neurológica DSS (Disability Status Scale). (19, 20) Em 1983 foi publicada a escala alargada EDSS.(20)

O paciente recebe pontuação entre 0, sem incapacidade, até 10, morte. Por exemplo, um EDSS 6 traduz uma incapacidade neurológica que requer um apoio unilateral para o doente andar 100 metros.

Outra escala é designada MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score) que relaciona a escala EDSS com a distribuição de incapacidade em doentes com a mesma duração da doença (21). A pontuação conferida por esta escala possibilita uma quantificação da severidade da doença ou grau de progressão das incapacidades.

Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se na história e observação clínica e a sua evolução no tempo, e nos exames complementares de diagnóstico sendo actualmente o mais importante a Ressonância Magnética do Sistema Nervoso Central.

O exame do LCR é também, importante nesta doença para estabelecer a sua natureza inflamatória.

Observa-se na maioria dos doentes um aumento da IgG. Mais importante é a observação de bandas oligoclonais que constituem um dado fidedigno de produção intratecal de IgG.

Utilizando-se a técnica de focalização isoeléctrica, observa-se, em cerca de 95% dos doentes, o padrão de bandas oligoclonais no LCR que não é detectado no soro. Este padrão difere em cada doente e não se altera até ao fim da doença (22).

Não podemos deixar de referir ainda o contributo eventual da investigação neurofisiológica (potenciais evocados).

Nesta base, foram publicados critérios de diagnóstico para a doença. Os de Schumacher, baseados nos achados clínicos, os de Poser, incorporando os estudos do LCR e neurofisiológicos e, mais recentemente, os de McDonald, posteriormente revistos e actualmente mais actualizados que realçam a importância dos exames de Ressonância Magnética.(23) Ver Fig. 1

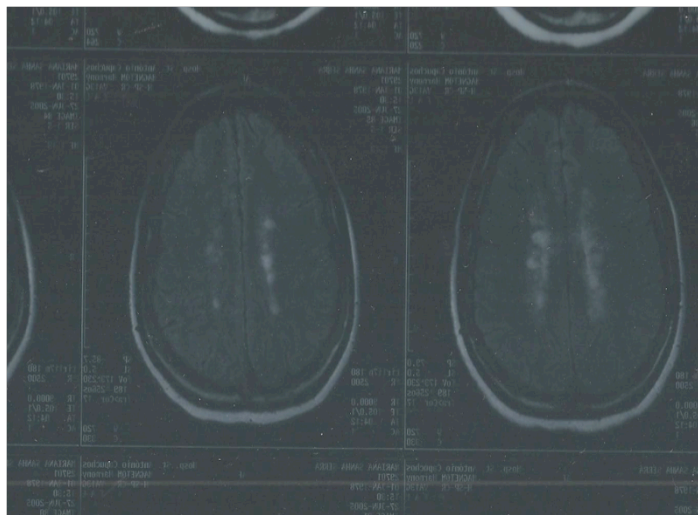


Figura 1- RMN na EM

Patologia e Patogénia

A esclerose múltipla é também designada por “esclerose em placas”, dado que as alterações de inflamação, desmielinização e neurodegenerescência dão origem a múltiplas lesões no SNC que se designam de “placas”, características patológicas da doença.

As Placas na Esclerose Múltipla

Se a doença é, como vimos, muito diversa nas suas manifestações e evolução clínica, estudos recentes demonstraram que também as placas têm uma composição heterogénea, embora de padrão essencialmente constante no mesmo doente.

Estes estudos são de extrema importância, porque apoiam o conceito dos mecanismos da sua etiopatogenia poderem ser diferentes para as suas diversas formas de evolução clínica e, possivelmente diferentes, entre os doentes com o mesmo tipo de evolução. As placas foram classificadas em 4 tipos. A infiltração macrófágica é comum a todas elas, indicando a presença de componente inflamatória característica da doença. Contudo, no tipo I, predomina um infiltrado celular linfocitário, sugerindo uma génese auto-imune celular, enquanto no tipo II, a composição sugere a predominância de uma mediação imunitária humoral. Estes dois tipos de placas são as

mais frequentes. As de tipo III são lesões invocando um mecanismo hipoxico-isquémico e as de tipo IV, mais raras, lesões em que a morte oligodendrocitária sugere mecanismos de apoptose e uma disfunção metabólica subjacente (24)

Se a perda de mielina ou desmielinização é aparente em qualquer tipo de placa, também o é a lesão ou perda axonal que pode, ou não, ser só consequência da destruição da sua bainha, fundamental para a rápida condução do impulso nervoso. Embora estas lesões ocorram na substância branca, também existe uma desmielinização e atrofia da substância cinzenta. Recentemente, tem-se sublinhado a presença de uma atrofia neuroaxonal nos estádios mais precoces da doença, questionando-se se esta será sempre secundária a uma desmielinização ou será consequência de uma patologia primariamente degenerativa((25)).

Patogenia

A EM tem sido considerada uma doença essencialmente mediada por células Th 1 e citocinas pró inflamatórias por elas secretadas. Contudo, tem sido recentemente realçada a importância para a sua imunopatogénese de muitas outras células, em particular, a mediação pelos Th 17, as citotóxicas CD 8 e os linfócitos B concomitantemente com uma deficiência nos efeitos supressores de células T reguladoras ((26)). Não é este o local para uma revisão mais pormenorizada destes aspectos imunológicos e ainda pouco esclarecidos e que não são de especial relevância para a temática do nosso trabalho. Tem sido proposta uma variedade de autoantígenos, em particular, componentes da mielina como a proteína básica da mielina (MBP) e a glicoproteína oligodendrocito mielina (MOG) e os sulfatidos.

Outra hipótese que tem sido proposta é a reactividade cruzada que pode haver destes autoantígenos com antígenos microbianos.

A barreira hematoencefálica (BHE) oferece uma grande resistência à migração de linfócitos para o interior do SNC. É hoje consensual, que esta migração de células T auto-reactivas se processa sobretudo após activação inflamatória do endotélio e expressão de moléculas de adesão, como a VCAM (endotélio) e integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA 4) nos linfócitos. É desta interacção e activação das metaloproteinases (em especial a MMP-9) que resulta a migração, necessitando os linfócitos de serem reactivados por células da imunidade inata reactivada, existentes no SNC, como macrófagos e células dendríticas ou da microglia. Os mecanismos da imunidade inata, subjacentes à

apresentação antigénica, activação e reactivação linfocitária, têm recebido crescente atenção nesta patologia. Na verdade, existe evidência para uma actividade inflamatória e proteolítica no SNC dos doentes, mesmo na ausência de infiltração linfocitária e lesão da BHE, inclusivamente na designada substância branca aparentemente normal ((27)). Nos anos 70 foi demonstrado que estes doentes podem ter uma capacidade de secreção alterada de interferão tipol, incluindo β .

A persistência de uma disfunção da imunidade inata e processo inflamatório é sublinhada para as formas progressivas da doença, caracterizadas por uma acentuação de um processo neurodegenerativo, que começa no início da doença. Este facto tem levado alguns autores a questionar se ela não será “primariamente “ neurodegenerativa(28)

Para alguns autores, poderá haver uma disfunção metabólica do oligodendrócito(29) ou do desenvolvimento e composição da mielina ((30)) que determinarão secundariamente uma reactividade imunitária.

Uma disfunção mitocondrial (31) ou excitotoxicidade pelo glutamato (32) que se podem associar ao processo inflamatório, têm sido invocados nos mecanismos degenerativos.

Em síntese, EM é uma entidade patologicamente heterogénea, possivelmente mesmo subjacente a formas de apresentação e evolução clínica aparentemente semelhantes.

A predominância dos mecanismos de imunidade celular versus imunidade humoral na sua patogenia, bem com o contributo inicial de uma disfunção hipóxica ou metabólica poderão ser variáveis. Os mecanismos de autoimunidade associados a uma activação do endotélio e lesão da BHE relacionam-se mais com a expressão clínica de surtos. Contudo um aspecto comum é a presença de uma actividade inflamatória invocando uma disfunção da imunidade inata.

Terapêutica

O tratamento dos surtos é efectuado com glicocorticóides (sobretudo metilprednisolona endovenosa), reduzindo o edema intersticial e a permeabilidade da barreira hematoencefálica. O tratamento induz uma infra-regulação de moléculas de

adesão e citocinas Th1 pró-inflamatórias, diminuindo a infiltração de linfócitos T auto reactivos.

Nos últimos 15 anos foram introduzidas, entre outras, na terapêutica imunomoduladora, o interferão β e o acetato de glatirâmero e mais recentemente o anticorpo monoclonal, natalizumab. Estas terapêuticas estão indicadas nas formas com surtos.(33)

Interferão β

A terapêutica com imunomoduladores retarda o aparecimento de novos surtos e a sua intensidade ((33) mas tem um efeito restritivo na progressão de incapacidades.

Mecanismos sugeridos para os benefícios clínicos do interferão β incluem a supressão da activação das células T por inibição da acção nas moléculas coestimuladoras, indução da produção de IL 10, e limitação da permeabilidade da BHE, por inibição da expressão de moléculas de adesão celular, e da produção de metaloproteinases de matriz(34).

Existem 3 preparações de interferão β , o IFN- β 1-a (Avonex e Rebif), cuja estrutura é idêntica ao IFN humano natural produzido em culturas celulares de mamíferos, o IFN- β 1 b (Betaferon) que provem de culturas bacterianas geneticamente modificadas, que se diferencia do humano pela ausência de glicosilação e por 2 aminoácidos modificados.(10)

Uma consequência possível desta terapêutica é o aparecimento nalguns doentes de anticorpos neutralizantes da actividade do medicamento (NABs), que poderão reduzir a sua eficácia clínica.

O interferão β 1 b (Betaferon) parece ser o mais imunogénico, sendo seguido interferão β -1a (Rebif), via de administração subcutânea, sendo o interferão de administração intramuscular, β -1a (Avonex) o menos imunogénico(35)

As recomendações da EFNS (European Federation of Neurological Societies) revelam que os NAB's devem ser determinados entre os 12 e 24 meses de terapêutica, já que os doentes com NAB's positivos têm uma possibilidade elevada de insucesso no tratamento.

Acetato de glatirâmero

Trata-se de uma mistura de polipeptidos sintéticos, compostos de 4 aminoácidos, assemelhando-se à proteína básica da mielina, que inicialmente se demonstrou reduzir a actividade inflamatória a nível experimental na encefalomielite auto-imune (EAE)(36).

Tem um mecanismo diferente do interferão β , nomeadamente favorecendo uma actividade das células Th 2, que migram através da BHE e suprimem as auto-reactivas Th 1(37)

Natalizumab

Este é um anticorpo monoclonal dirigido para as $\alpha 4$ integrinas. Como já foi referido na patogénese da EM, a migração das células T através da barreira hematoencefálica faz-se por interacção de moléculas de adesão como a VLA - 4 e a VCAM-1. O natalizumab vai bloquear esta migração, ligando-se a VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrina)(38). O medicamento está actualmente reservado para as formas mais graves com surtos.

Capítulo 2

Inflamação e Esclerose Múltipla

As células do sistema da imunidade inata induzem uma resposta inflamatória aguda cuja componente sistémica é seguida da resposta de fase aguda (RFA) (39).

Em muitas situações, como a diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, persiste um estado inflamatório crónico, cujas causas e mecanismos são pouco conhecidos(40).

A reacção de fase aguda ou a sua persistência na inflamação crónica traduz-se na indução (ou supressão) da síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, células endoteliais e outras. Esta modulação da expressão genética é mediada por citocinas libertadas pelas células da imunidade inata e traduz-se também em muitas e diversas alterações metabólicas e hormonais. Estas alterações do metabolismo, associadas à resposta inflamatória, são indispensáveis às próprias defesas mediadas pelas células da imunidade adaptativa ou adquirida. Na verdade, as respostas imunitárias e a regulação metabólica estão estreitamente interligadas, com o correcto funcionamento das primeiras dependendo da segunda e vice-versa.

Entre as citocinas libertadas por estímulos inflamatórios estão os interferões tipo I, no qual se inclui o interferão β .

Estudos nos anos 70, em células em cultura nos doentes com a forma de surto-remissão, sugeriram uma deficiência na secreção de interferão β após estimulação viral (Borden et al Nat Rev Drug Disc6: 675-990,2007)(41). Contudo, os trabalhos mais recentes demonstraram que esta população é heterogénea, com alguns doentes apresentando uma aumentada secreção de interferão tipo I à estimulação da imunidade inata(42)Comabella, Brain 2009.

Na verdade, não são claras as razões do benefício do interferão β na doença. Fisiologicamente, o interferão tipo I (A e B) activa as células dendríticas, a imunidade humoral e as respostas das células Th1, promovendo por isso a autoimunidade sistémica que será, à partida, prejudicial para a EM.

Curiosamente, poderá não haver benefício na administração terapêutica de interferão β num subgrupo de doentes que já apresentam endogenamente uma secreção aumentada desta citocina aos estímulos inflamatórios (42). Esta situação levou-nos a incluir nas nossas investigações (como será especificado mais tarde) a análise de doentes tratados com esta citocina.

Com essa abordagem poderemos colher informação relevante, não só sobre o seu mecanismo de acção, como do seu próprio significado fisiopatológico na EM.

Neste local não nos debruçamos sobre os inúmeros estudos de índole imunológica ou imunoquímica documentando esta complexidade. Vamos restringir-nos a rever o significado de algumas proteínas de fase aguda e alterações metabólicas de relevância mais directa para as investigações efectuadas.

O capítulo seguinte analisará especialmente as relações do metabolismo lipídico e lipoproteico com esta doença e outras patologias inflamatórias crónicas. Estes dois capítulos fornecerão as bases fundamentando as investigações e objectivos desenvolvidos neste trabalho.

Proteína C Reactiva

Esta proteína é uma das proteínas de fase aguda, as pentraxinas, que são duas e partilham semelhanças estruturais, embora estabeleçam ligações diferentes, sendo que a PCR se liga preferencialmente à fosfocolina e a outra proteína liga-se melhor à fosfoetanolamina, a chamada proteína amilóide de componente P.

Esta proteína é composta por 5 unidades ligadas de forma não covalente, de 206 aminoácidos arranjadas de forma cíclica. Cada subunidade tem uma ligação à fosfocolina, como já foi dito, e são orientadas para a mesma face do pentâmero. Isto origina uma capacidade de ligação a sequências na superfície das células. Deste modo tem um papel na imunidade inata e remove membranas e material necrótico das células. Pode iniciar a activação do complemento pela via clássica ligando-se a C1q e a sua ligação ao receptor $FC\gamma RI$, com baixa afinidade e ao receptor $FC\gamma RII$, com alta afinidade nos leucócitos.(43).

Estas ligações estão, segundo Szalai 2004(44), sujeitas aos diferentes níveis de glicosilação da PCR, o que dificulta ainda mais o raciocínio.

O seu aumento dos níveis séricos, no caso de reacções inflamatórias e também na auto-imunidade, foi considerado um marcador possível destas situações.(44) Dadas as relações estudadas desde há vários anos, entre esta proteína e a doença aterosclerótica, é também considerada como um bom parâmetro de avaliação no risco de doença cardiovascular.(45)

A PCR é sintetizada no fígado e induzida por citocinas tais como IL 6, IL 1 e $TNF\alpha$, e por sua vez induz a síntese de citocinas, moléculas de adesão celular e factores teciduais nos monócitos circulantes e nas células endoteliais in vitro.(43)

Os níveis da Proteína C reactiva de alta sensibilidade (hs-PCR), no soro, conseguem reflectir mesmo as pequenas alterações da actividade inflamatória (Sellner MS,2008) (46) dada a sensibilidade da técnica.

NA EM, os níveis de hs-PCR na fase de surto-remissão, são idênticos nos doentes e nos controlos, mas os níveis aumentam durante as fases de surtos (47). Os valores elevados de hs-PCR estão associados com risco mais alto de progressão e agravamento da doença.

Foram efectuados estudos de terapêutica com estatinas, sendo que estas reduzem os mediadores pró-inflamatórios, tais como, PCR, Amiloide sérico A, citocinas e moléculas de adesão celular.

Podemos, por exemplo, citar um estudo feito por Sellner,(46) em que foi efectuada terapêutica só com interferão β e este, em conjunto com artrovastatina. Foi concluído que o tratamento, só com interferão, provocava um aumento mantido da PCR, enquanto a associação com a estatina leva a uma diminuição da PCR. A artrovastatina vai inibir a sinalização STAT 1 mas não a STAT 3, não revertendo todos os efeitos do interferão como sua terapêutica adjuvante.

Esta proteína aparece elevada, como já referimos, em doença aterosclerótica, insuficiência cardíaca congestiva e outras doenças cardiovasculares e, por isso, torna-se difícil determinar qual o seu valor no meio de tantos factores que a influenciam.

Por vezes, o problema pode ser contornado com determinações mais específicas no LCR e acompanhadas de outros mediadores de inflamação como o $TNF-\alpha$. Estas variações são especialmente visíveis quando da terapêutica com

interferão β 1, o qual provoca a diminuição dos valores de hs-PCR, provavelmente por modulação da secreção de TNF- α .

Amilóide Sérico A (ASA)

É uma família de proteínas que inclui membros que surgem na resposta de fase aguda e outros que são constitutivos. No genoma humano há 4 genes para o ASA, sendo que o ASA-1 e ASA-2 são sobretudo de fase aguda. No entanto, ambos são sintetizados pelo fígado por indução pró-inflamatória. Um aspecto particular das duas subfamílias, é o facto de que elas, que surgem apenas na fase aguda terem sido identificados em todos os vertebrados, já os outros constitutivos, só se encontraram em humanos e ratos(48). O ASA é uma proteína de fase aguda de 12 KDa e aumenta a sua expressão até 1000 vezes pelo mecanismo de transcrição genética.(49, 50) A sua síntese é regulada positivamente pela IL-1, IL-6 e TNF. (51) Parece estar relacionado com a resposta inata (52, 53), sendo capaz de interagir com proteínas da matriz extracelular e de induzir a migração de linfócitos T CD4+ e T CD8+, monócitos e macrófagos. (54, 55) Tendo sido sugerido que a resposta imunitária inata influencia a resposta adquirida, durante os processos inflamatórios agudos e crónicos (56), é legítimo pensar que possa ter um papel na patogénese das doenças de base auto-imune.

O ASA é também expresso em tecidos saudáveis, particularmente nos epitélios, é depositado em vários tecidos inflamatórios e associado à patogénese de múltiplas situações: infecção, neoplasia (57), trauma (58), doença de Alzheimer (59), aterosclerose (60).

O ASA, principalmente o ASA-4, pouco afectado pela fase aguda, é constituinte estrutural da HDL em condições basais. Durante a inflamação, o ASA-1 e o ASA-2 podem integrar a lipoproteína(61). Consequentemente a esta resposta aguda surgem alterações estruturais na HDL, que lhe conferem um comportamento diferente do habitual e de carácter pró-inflamatório. Ao enriquecimento de ASA associa-se concomitante perda de ApoA-I, PON (paraoxonase) e PAF-AH (acetilhidrolase-factor activador das plaquetas) (62) Deste acontecimento resultará a diminuição dos efeitos da ApoA-1, sejam eles na limitação do transporte reverso do colesterol, por diminuição da activação da LCAT (lecitina colesterol acetil hidrolase) e menor probabilidade de interacção com a ABCA1. Os efeitos antioxidantes da HDL ficam também bastante

comprometidos, resultando numa baixa capacidade para inibir a oxidação das LDL. Por outro lado, esta lipoproteína adquire uma afinidade maior para libertar colesterol aos macrófagos.(63)

Apesar de ser sintetizado principalmente no fígado o ASA pode também ser expresso por outros tipos celulares, nomeadamente endotélio e células do SNC (60, 64), encontrando-se em muito maior concentração no liquor de indivíduos com doença de Alzheimer.(65) Este facto parece ter como consequência a deslocalização das moléculas de ApoE da partícula de HDL com possível comprometimento do metabolismo da proteína A β .(66)

Em doentes com Esclerose Múltipla em surto-remissão foi encontrada, por Ristori e colaboradores, uma relação entre a fase de recidiva e os valores séricos do ASA. Neste estudo, observou-se uma sensibilidade para detecção de inflamação “activa” na periferia, muito semelhante à sensibilidade da RMN com gadolínio, para detecção sinais de doença activa no SNC. A utilização do ASA como marcador de actividade da doença ou potencial factor prognóstico carece, no entanto, de mais estudos.

Fibrinogénio e Sistema da Coagulação

O fibrinogénio é, em geral, referido no contexto dos mecanismos da coagulação e hemostase. No entanto, o conhecimento da sua estrutura e ligação à molécula de adesão celular ICAM-1, aumentando a adesão dos monocitos ao endotélio, formando uma ponte entre os dois sistemas celulares, além da sua ligação a outros leucócitos, tem reforçado a compreensão da sua função nos processos inflamatórios.(67) O seu papel como proteína de fase aguda é, portanto, importante no metabolismo da inflamação. É mencionada neste estudo dadas as suas relações com uma doença auto-imune como a EM, em que as lesões axonais estão associadas com a deficiente fibrinólise, resultante da inibição do sistema activador do plasminogénio. Estas lesões estão presentes no modelo de estudo da EM, a encefalomielite aguda auto-imune (EAE), em que há depósitos de Fibrinogénio nos axónios vulneráveis, podendo representar um aumento de defosforilação neuronal, contribuindo assim para as alterações patológicas.(68)

Nas doenças neuroinflamatórias, uma deficiência no mecanismo de fibrinólise, leva a que a ligação dos inibidores do tPA (activador do plasminogénio tecidual) às proteínas das membranas axonais, tais como a anexina II e à LRP (proteína relacionada com o receptor de LDL) que podem constituir um mecanismo de defesa para que a ligação às serpinas, não se efectue.(69)

Esta proteína anexina II, cálcio dependente, é expressa no SNC em pequenas quantidades mas aumenta durante lesões tumorais e inflamatórias. Sendo expressa nas células endoteliais e macrófagos, liga-se ao tPA e plasminogénio e promove a degradação da plasmina. Liga-se também à proteína da matriz extracelular tenascina C resultando em fibrinólise, remodelação da matriz extracelular e libertação de factores angiogénicos. A LRP é expressa na superfície celular e encontra-se no SNC nas células neuronais, microglia e astrócitos, sendo primariamente ligada ao metabolismo lipoproteico. Esta proteína liga-se a inibidores de proteases como α_2 macroglobulina e activadores do complexo dos inibidores do tPA, estando aqui um exemplo da associação entre o metabolismo lipídico inflamatório e fibrinólise.

Passamos de seguida, com maior detalhe, às relações entre a EM e os inibidores dos activadores do plasminogénio, tendo em conta que as lesões da BHE são determinantes no aparecimento de fibrinogénio e fibrina no SNC.

Por isso, a actividade das proteases da serina parecem estar aumentada na EM levando a disrupção desta barreira e à entrada de leucócitos e subsequente lesão da mielina.

Nas lesões de EM, o tPA está localizado nos axónios desmielinizados com neurofilamentos e fibrina, sugerindo o seu papel na lise da fibrina. No entanto, a supra-regulação do inibidor do tPA, PAI-1 e a formação de complexos tPA:PAI-1 na EM, diminui a capacidade fibrinolítica levando à deposição de fibrina com lesão axonal.

A supra-regulação de outro receptor, de tipo urokinase, do activador do plasminogénio expresso nos monocitos, macrófagos e células T activadas, é um activador da inflamação pela ligação à vitronectina e integrinas. É indetectável no SNC íntegro e aparece nas lesões de EM nos monocitos e zonas de inflamação perivascular, contribuindo para a lesão da matriz extracelular.

Estudos conduzidos por Emma East et al, 2005 (69), tendo como modelo a EAE no ratinho transgénico, levaram à conclusão que, além dos mecanismos já mencionados, também as metaloproteinase da matriz e a supra-regulação das moléculas de adesão celular contribuem para a lesão da BHE. Este estudo levou a concluir que os depósitos de fibrina frequentemente acompanham as respostas inflamatórias e o fibrinogénio leva à exacerbação da inflamação, através de moléculas de sinalização, modulando a adesão, migração e aumento da expressão de citocinas. O ratinho, em que geneticamente ou farmacologicamente é depletado fibrinogénio, tem aumento do tempo de vida, menos lesões inflamatórias e menor desmielinização.

De todo este conjunto podemos esperar que actuando nos mecanismos de fibrinólise talvez se possam diminuir os mecanismos de inflamação, desmielinização e consequente neurodegenerescência.

Ferritina e Metabolismo do Ferro

A Ferritina é uma proteína de alto peso molecular e uma das suas funções é a reserva de Ferro do organismo. No entanto, é também uma das proteínas chamadas de fase aguda, aumentando nas situações inflamatórias, protegendo o organismo contra o stress oxidativo induzido pelo Ferro. No caso da EM, foram observados níveis aumentados no LCR estando alterada a sua regulação nas formas crónicas progressivas da doença.(70)

Os níveis de Ferritina são influenciados pelo estado de ferro oxidação do organismo, pela hipoxia e por algumas citocinas.

A heme oxigenase é a enzima regulador no catabolismo do heme clivando-o em 3 produtos: monóxido de carbono (CO), biliverdina e Ferro livre, existem 2 isoformas 1 e 2 sendo que a forma 1 é induzível, enquanto a forma 2 está alterada em condições patológicas.

A capacidade anti-inflamatória da HO deve-se indirectamente às propriedades dos produtos do catabolismo do heme e seus derivados os quais são especificados adiante. O CO suprime a resposta pró-inflamatória e promove a resposta anti-inflamatória nos macrófagos, aumentando a produção de IL10, e diminuindo a de TNF α . Contribui ainda com diminuição da activação e agregação plaquetária, suprimindo assim a resposta trombótica e pró-inflamatória das plaquetas, diminui a

inibição do factor activador do plasminogénio tipo1 (PAI-1) e previne a apoptose em vários tipos de células incluindo as endoteliais, fibroblastos e hepatócitos.

De acordo com Fontoura (JCI 2007) (71), heme oxigenase e o CO podem suprimir a neuroinflamação, sendo a heme oxigenase 1 um gene citoprotectivo e anti-inflamatório, o qual se expressa no modelo de estudo da esclerose múltipla, a EAE e na esclerose múltipla. Foi sugerido também que a HO-1 suprime a diferenciação das células T reactivas à mielina que induzem a formação de um tipo celular caracterizado pela secreção de citocinas pró inflamatórias.

Na realidade, os estudos em ratinhos levam a concluir que os produtos da sua activação, como a biliverdina e o Ferro livre regulam o aumento de produção da cadeia pesada da ferritina e de uma bomba ATPase que remove o ferro intracelular da célula. A ferritina foi de início considerada como sendo o mecanismo pelo qual a HO-1 confere resistência ao stress oxidativo nas células endoteliais. A contribuição desta bomba de Ferro versus ferritina para o efeito de citoprotecção da HO-1 não é claro mas ambos os mecanismos contribuem como antioxidantes. A ferritina é considerada como um mecanismo de defesa contra o stress oxidativo nos processos inflamatórios pelo sequestro de ferro, o qual é tóxico na sua forma livre ou com fraca ligação à proteína. Por outro lado, os quelantes de ferro foram usados para a actividade clínica e inflamatória nos modelos animais já mencionados como a EAE(72).

Neopterina

A Neopterina é produzida pelos macrófagos derivados de monócitos e pelas células dendríticas depois da estimulação com citocinas Th-1 como o interferão γ (73). Tem sido investigada como um marcador de activação de células do sistema imunitário em várias patologias.(74)

A neopterina é o produto resultante da oxidação da 7,8-dihidroneopterina, uma pterina sintetizada pelos macrófagos quando estimulados pelo interferão γ já que este regula a GTP-ciclodiolase, o qual catalisa a transformação do GTP em 7,8-dihidroneopterina trifosfato, a qual deixa a célula como 7,8-dihidroneopterina por acção das fosfatases.(75) Alguma quantidade de Neopterina é oxidada e torna-se fluorescente. A libertação de Neopterina é específica de monócitos, macrófagos e células dendríticas mas o epitélio renal também a pode libertar.

Ao contrário do que acontece no ratinho, os macrófagos dos primatas não induzem a síntese de óxido nítrico dado não levarem à indução da NO sintetase.

A reacção mais importante que gera Neopterin é a oxidação pelo ácido hipocloroso, o qual é libertado em grandes quantidades pelos macrófagos durante a inflamação.

Estas características fazem desta pterina uma molécula interessante na avaliação da activação do sistema imunitário nos pacientes, podendo ter interesse em situações inflamatórias e de autoimunidade como mais um dado para o diagnóstico e seguimento dos pacientes.

Marcador Inflamatório

O facto de ser uma molécula chamada de marcador inflamatório tem várias características que se detalham de seguida.

Em resposta a uma infecção, os valores de neopterin sobem em paralelo com os da proteína C reactiva, podendo ser usados como marcador de resposta à terapêutica como por exemplo na malária (76, 77), na tuberculose(78), no síndrome de imunodeficiência adquirida(79), sendo até medidos anteriormente como marcadores nos serviços de Imunoterapia(80). A neopterin está também elevada nos doentes com angor instável e enfarte agudo do miocárdio(81).

Nos mecanismos inflamatórios vários mediadores são, em tempos diferentes, pró-oxidantes e antioxidantes. O mesmo se passa com a neopterin, a qual, em conjunto com o $TNF\alpha$, promove a morte celular e, no entanto, actua como antioxidante protegendo o afluxo de mediadores inflamatórios que chegam até aos macrófagos.

Relação com LDL oxidadas

Ainda existem algumas dúvidas sobre qual é o mecanismo que leva à reacção entre uma molécula hidrossolúvel como a 7,8-dihidropterina e a LDL, molécula lipídica. As hipóteses são, por um lado, a compartimentalização da neopterin e, por outro lado, a sua capacidade de induzir, através do peroxinitrito, uma supra-regulação da oxidação das LDL. (82)

Neopterin e EM

Esta molécula, observada em várias doenças auto-imunes, terá também interesse no estudo das alterações inflamatórias da EM. Encontraram alguns autores resultados contraditórios, sendo encontrados elevados no LCR e soro de doentes durante a remissão (83) e outros encontraram níveis normais, não correlacionados com a clínica ou as imagens da RMN (84). O facto de ser uma molécula induzida pelo interferão libertando-se em grande quantidade dos monocitos e macrófagos, levando por sua vez a um aumento da expressão de $TNF\alpha$, torna a neopterin um marcador de células Th 1, tendo portanto interesse na avaliação do tratamento da EM.

Ácido Úrico e Stress oxidativo

Na EM as células inflamatórias produzem NO e peroxinitrito. Peroxinitrito e outras espécies reactivas de NO exercem um efeito tóxico nos neurónios e células da glia, aumentando a apoptose, aumentam também a permeabilidade da barreira hematoencefálica e podem aumentar a invasão de células inflamatórias no SNC. O Ácido Úrico, considerado como scavenger de peroxinitrito, diminui a permeabilidade da BHE e inflamação do SNC.(Mattle 2004)(85)

Os níveis de ácido úrico parecem, no entanto, não ser completamente fiáveis para serem usados como marcador na EM, dado que são variáveis com a produção do próprio SNC e também com o consumo feito pelo estado de oxidação do SNC.(Dujmovic 2009.)(86)

Encontraram-se níveis elevados de NO sintetase nos macrófagos, microglia e astrócitos nas placas dos doentes de EM, levando a concluir que, parte das lesões, são devidas à formação de radicais livres. O peroxinitrito, um dos mais potentes oxidantes, exerce um efeito tóxico nos neurónios, axónios e células da glia podendo levar à apoptose. (M Rentzos 2006).(87)

Doentes com gota têm diminuição da incidência de EM e nesta os níveis de ácido úrico são mais baixos, especialmente nas lesões activas, e aumentam na terapêutica com interferão (Guerrero e tal 2008) (88). Outro estudo anterior, feito em doentes com EM surtos-remissão e formas secundárias, pré e pós-terapêutica com

interferão, não permite concluir que os níveis de ácido úrico possam representar um marcador útil da severidade da doença ou do sucesso da terapêutica com interferão.

Continuamos, portanto, com a dúvida se os níveis reduzidos de ácido úrico são um defeito primário ou se resultam da sua oxidação com peroxinitrito e outros radicais livres, embora estas hipóteses não se excluam mutuamente. O destino seguinte do ácido úrico é a alantoína, a qual já não tem propriedades anti radicais livres. Um estudo feito no ratinho deficiente em receptor de glicocorticóides, o qual leva à diminuição da sintetase do NO, torna este ratinho susceptível à EAE, modelo de estudo da EM, enfatizando a importância deste oxidante na patologia da doença(89).

Nestas circunstâncias, seria de alguma utilidade determinar os níveis de alantoína na EM para se poder concluir se o tratamento, para aumentar os níveis de ácido úrico, seria eficaz no tratamento da EM (S. Sotgiu 2002).(90)

Os resultados do estudo NHS (Nurses Health Study) e NHS II, e do KPNC (Kaiser Permanent Health Northern Califórnia) que foi feito com carácter prospectivo, vieram também sugerir que o nível de ácido úrico não é preditivo do risco de EM, assim como o estudo do KPNC (Kaiser Permanent Health Northern Califórnia), que é retrospectivo. Está em curso um estudo com administração de inosina, precursor do ácido úrico (91) Massa, 2009, J Neurol. Este estudo é interessante uma vez que dá importância à perda de protecção contra antioxidantes, que poderá representar um campo terapêutico no futuro.

Leptina

Esta molécula foi descoberta a partir de um estudo genético no ratinho, por volta dos anos 50 em que se provocava obesidade, com bulimia e deficiente consumo de energia. O gene foi denominado *ob* e o ratinho *ob/ob*. Em 1994, foi identificada a molécula responsável, a Leptina. Esta citocina sintetizada no tecido adiposo tem funções relacionadas com a inflamação e modificação hormonal, que só mais tarde foram consideradas.

O receptor para a Leptina foi identificado pouco tempo depois, OB-R, sendo o produto do gene *db* e *db/db* no ratinho (Giamila Fantuzzi, Journal of Leucocyte 2000).(92)

Sendo a Leptina considerada a hormona da “fome”, relacionada com o estado nutricional, não se podem ignorar também as acções hormonais com diminuição das hormonas da reprodução por actuação ao nível do eixo hipotálamo-hipofisário, alteração do metabolismo da tiróide e do sistema imune.

Dado que a aterosclerose é também uma doença inflamatória, é relevante, para o estudo que realizámos, referir a importância dos efeitos potencialmente aterogénicos da molécula, tais como indução da disfunção endotelial, estimulação da reacção inflamatória e stress oxidativo, diminuição da actividade da paraoxonase, agregação plaquetária e migração, hipertrofia e proliferação das células do tecido muscular liso dos vasos (93) (94)

A expressão do gene da Leptina correlaciona-se directamente com as reservas de tecido adiposo, mas é influenciado por várias hormonas, tais como, Insulina, Glucocorticóides e Hormonas Gonadais. Insulina e Glucocorticóides actuam em sinergia para a produção de leptina, enquanto a Testosterona inibe a sua secreção, e os esteróides ovários aumentam a sua produção. Influencia ainda o sistema hipotálamo-hipofisário, hematopoiese e angiogénese. Esta hormona tem um dimorfismo sexual sendo mais alta no sexo feminino. Este dado é reforçado pelas alterações da Leptina na gravidez e a evolução da EM durante esta. Ou seja, nota-se uma atenuação da actividade da doença durante a gravidez e recorrência pós parto, o mesmo se passa com os níveis de Leptina (RF Neuteboom,MS,2009).(95)

Esta hormona é um dos mediadores comuns ao sistema neuroendócrino e imunitário. A Leptina, em conjunto com a PCR, IL-1 e IL-6, pode actuar como proteína de fase aguda, talvez sendo facilitada a sua actuação dadas as estreitas relações anatómicas da origem da hormona, tecido adiposo, e o tecido linfático geralmente nos mesmos territórios. O tecido adiposo e o tecido linfóide interagem localmente através de mediadores, as adipocinas, produzidas no tecido adiposo, as quais estabelecem a ponte entre o metabolismo e o sistema imunológico. Estas são, além da leptina, a adiponectina, as quimiocinas e outras citocinas.

Para a compreensão desta citocina, devemos ainda fazer uma breve referência ao receptor, melhor dizendo, às várias formas deste receptor, membro da classe 1 de citocinas. A forma longa é expressa no hipotálamo, nas áreas responsáveis pela expressão de neuropéptidos e neurotransmissores que regulam o apetite, peso corporal e massa óssea. É também expresso em células endoteliais e pancreáticas,

ovárias, hematopoiéticas, monocitos, macrófagos e células T e B. A transdução de sinal é do tipo JAK2 /Tirosina Kinase (Matarese,2008).(96)

Na EM os níveis de leptina estão aumentados no LCR, no soro nos doentes antes do tratamento. Correlacionam-se com a secreção de interferão e têm uma relação inversa com a percentagem de células Treg, as quais modificam a expressão de Teff cells, linfócitos efectores. No entanto, os níveis de Leptina no soro são mais baixos do que os que se encontram no LCR, sugerindo que existe alguma produção no SNC, ou aumento do transporte através da BHE.

A leptina representa apenas um dos factores derivados do tecido adiposo e do sistema neuroendócrino, que modula a inflamação, estando incluindo nestes a adiponectina, visfatina, neuropéptido Y e grelina. Temos, como exemplo, o efeito anti-inflamatório da grelina em relação à indução de secreção de citocinas inflamatórias pela Leptina e pela sua acção na homeostase do metabolismo do timo.

Resumo: A Leptina actua produzindo citocinas pró-inflamatórias, promovendo as respostas Th1 e, inibindo a expansão de células Treg, criando o ambiente propício para o aparecimento da autoimunidade nos doentes susceptíveis. PNAS,Fagionni, 2000(97)

Por outro lado, a administração de Ac anti-Leptina ao ratinho melhora o curso da doença, melhorando os sinais neurológicos.

Esta hormona poderá ser assim um alvo para possíveis tratamentos da EM.

Adiponectina

Trata-se de uma citocina secretada pelos dois tipos de tecido adiposo. Tem uma estrutura proteica semelhante em determinada sequência ao colagénio VIII e IX, e ao factor C1q do complemento, encontrando-se na circulação sistémica em várias formas moleculares(98). A adiponectina actua por dois receptores, Adipo R1, que se encontra sobretudo no tecido muscular esquelético e o outro, Adipo R2, que se encontra no fígado. A transdução de sinal envolve a activação da proteína AMPK, PPAR α e outras moléculas de sinalização.(99)

A adiponectina tem um largo efeito nas patologias de componente inflamatória e imunológica, tais como, as doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e artrite reumatóide.(100) Exerce a sua acção na imunidade inata e adquirida, inibindo a actividade fagocítica dos macrófagos, IL6 e TNF α . Reduz a produção de células B e induz a produção de factores inflamatórios IL10 IL-1RA (antagonista do receptor da IL-1) nos monócitos, macrófagos e células dendríticas.

O seu papel na obesidade e doenças vasculares é protector, uma vez que, reduz a oxidação de ácidos gordos e a síntese de glicose hepática, sendo a sua acção reforçada pelas tiazolidinedionas, drogas usadas na terapêutica da diabetes tipo 2, as quais aumentam a sensibilidade à insulina.

Como já referimos, a adiponectina tem um papel importante no metabolismo lipídico, nomeadamente nos triglicéridos e nas lipoproteínas remanescentes, considerando a diminuição que a adiponectina produz no influxo de ácidos gordos não esterificados para o fígado, logo diminuindo a sua utilização na síntese de triglicéridos. Diminui a acumulação de triglicéridos no músculo-esquelético, aumentando a oxidação de ácidos gordos, estimula a lipoproteína lipase, aumentando a expressão de PPARs.(101)

No entanto, no que diz respeito ao papel desta citocina nas doenças auto-imunes, esta citocina assume características pró-inflamatórias com aumento das metaloproteinases na matriz das superfícies sinoviais (102, 103).

Estas características tornam esta molécula um bom campo de estudo nas doenças relacionadas com alterações da imunidade como a EM.

Conclusão

A lista de marcadores bioquímicos de actividade inflamatória atrás descrita foi referenciada pela sua relevância mais directa com a investigação do nosso trabalho. Contudo, ela poderia ser alargada a muitas outras moléculas importantes neste contexto. Por exemplo, existe um aumento de osteopontina sérica e no LCR na EM, que é reduzido pelas terapêuticas(104) Baixos níveis séricos de vitamina D foram associados a maior risco, severidade e progressão da doença (105). Foi proposta uma deficiência nas acções dos endocanabinóides na EM, com seus agonistas de receptor CB2 podendo ter efeitos anti-inflamatórios benéficos(106) . Entre as moléculas

reguladoras da interface, entre o metabolismo e as respostas inflamatórias, encontramos os receptores activados pelos proliferadores dos peroxisomas (PPARs). Estudos recentes sugerem um benefício dos agonistas dos PPARs, na BHE e, possivelmente, na EM(107) bem como a sua implicação nos mecanismos acção do interferão β 1 (108)(Sena, 2004). Em conclusão, esta revisão documenta que, na EM, existe evidência para uma alteração sistémica de certos marcadores inflamatórios ou das suas alterações pela administração de interferão β . Estas alterações são, em muitos aspectos, comuns a outras patologias inflamatórias.

Capítulo 3

Lipoproteínas e Esclerose Múltipla

Neste Capítulo realizou-se uma discussão sobre os trabalhos podendo implicar o metabolismo das lipoproteínas e colesterol, inflamação e patogénese da esclerose múltipla.

Após uma breve revisão esquemática do metabolismo lipoproteico plasmático, analisam-se, em particular, as suas relações com os processos inflamatórios sistémicos. Em seguida, referem-se alguns estudos sugerindo uma potencial implicação deste metabolismo na patogénese da doença.

Metabolismo Lipoproteico Plasmático

Quando falamos sobre metabolismo das lipoproteínas, não podemos deixar de referir os seus constituintes lipídicos como o colesterol e os triglicéridos.

O colesterol, necessário para a estabilidade das membranas celulares e crescimento, de uma forma geral, tem como metabolitos os ácidos biliares, oxisteróis, e hormonas esteróides (109); tem origem na alimentação e endogenamente.

Os triglicéridos são classificados como lípidos simples, são ésteres de ácidos gordos e glicerol.

Devemos ainda referir os lípidos compostos que contém um álcool e ácidos gordos, como os que contém grupo fosfórico, fosfolípidos, os glicolípidos compostos de ácidos gordos e hidratos de carbono e outro grupo como os sulfolípidos e aminolípidos e, dentro destes, as lipoproteínas. Como derivados importantes dos lípidos, temos os ácidos gordos, esteróis, álcoois etc. (Harper)(110)

A interacção do colesterol com os fosfolípidos nas membranas é sobretudo biofísica e não estereoespecífica, enquanto, em relação às proteínas, é bastante estereoespecífica (109), (110). As mutações na síntese de colesterol, transporte e vias metabólicas resultam num risco aumentado na doença aterosclerótica.

As apoproteínas, que representam a fracção proteica das lipoproteínas, são as responsáveis pelo sistema de transporte de triglicéridos e colesterol entre os vários compartimentos do organismo. Fazem-no através de três funções: solubilização de lipoproteínas, interagindo com os fosfolípidos, ligação aos receptores celulares e regulação da actividade de alguns enzimas que condicionam o metabolismo dos lípidos, como a LCAT (lecithin cholesterol acyl transferase), HL (hepatic lipase) e LPL (lipoprotein lipase) (111)(Carvalho, CLDV, 2000,19-20).


As lipoproteínas são classificadas de acordo com os constituintes de cada uma e pelas suas funções. As apoproteínas têm os genes mapeados no genoma humano, permitindo uma melhor compreensão das anomalias genéticas subjacentes às alterações lipídicas e relacioná-las com os vários aspectos do metabolismo em que estão implicadas estas moléculas, não só nos aspectos clássicos dos mecanismos da aterosclerose.

Os estudos epidemiológicos sugerem uma conexão entre a infecção /inflamação e aterosclerose, com alterações nas lipoproteínas resultantes da libertação de citocinas e outros medidores inflamatórios.(112) Por sua vez, a infecção e inflamação alteram também os níveis de colesterol e triglicéridos, um dos factores mais importantes de aumento das VLDL, depois de alterados pelos mecanismos inflamatórios (Gallin 1969)(113). Vamos ainda encontrar ligações entre a amiloidose, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, o nosso modelo de investigação, síndrome antifosfolípidos e outras entidades nosológicas mais associadas, em geral, ao metabolismo lipoproteico, as dislipidémias.

Desde a nomenclatura introduzida por Alaupovic (114), consideram-se, pelo menos, 7 tipos de apoproteínas, apoA-I, A-II, B, C-I, C-II, C-III, D, e E. Podemos depois individualizar mais alguns que se foram identificando ao longo dos anos. A apoA contém ainda a apoA-II e apoA-IV; a apoB subdivide-se em B100 e B48; a apo(a) que apresenta semelhanças estruturais com o plasminogénio e não é de facto uma apoproteína; a apoD, anteriormente chamada apoA-III; a apoE, com os vários fenótipos de interesse muito grande na clínica, como será detalhado mais tarde; além das apo F, G, H, e J.

Estas distribuem-se pelas seis grandes classes de lipoproteínas, ou seja, pelos quilomicra, VLDL, IDL, LDL, HDL e Lp(a).

Os lípidos exógenos são digeridos e integrados em grandes partículas lipoproteicas, ricas em triglicéridos, as menos densas, que são os quilomicra. Estas vão ser encaminhadas para o sistema linfático e depois para a circulação sistémica. São compostas por um grande núcleo lipídico constituído, na sua maior parte, por triglicéridos (TG) e uma camada superficial de fosfolípidos, colesterol não esterificado, e apoproteínas (A-I, A-II, A-IV, e B48). A presença de B48, em vez de B100, impede estas lipoproteínas de se ligarem aos receptores de LDL. No plasma, as quilomicra recebem apoC e apoE das HDL circulantes, podendo a apoE ser recebida directamente dos hepatócitos quando se acumulam partículas remanescentes nas sinusóides. No endotélio do tecido adiposo e muscular, existe a LPL que hidrolisa os TG e liberta ácidos gordos que são captados pelas respectivas células.

APOPROTEIN DISTRIBUTION IN LIPOPROTEIN CLASSES					
	CHYLO	VLDL	IDL	LDL	HDL
apoproteins (major)  (minor)	C-III	B-100	B-100	B-100	A-I
	C-II	C-III	B-48*		A-II
	C-I	E	E		D
	B-48	C-II			C-III
	E	C-I			C-I
	A-I	A-I			E
	A-II	A-II			

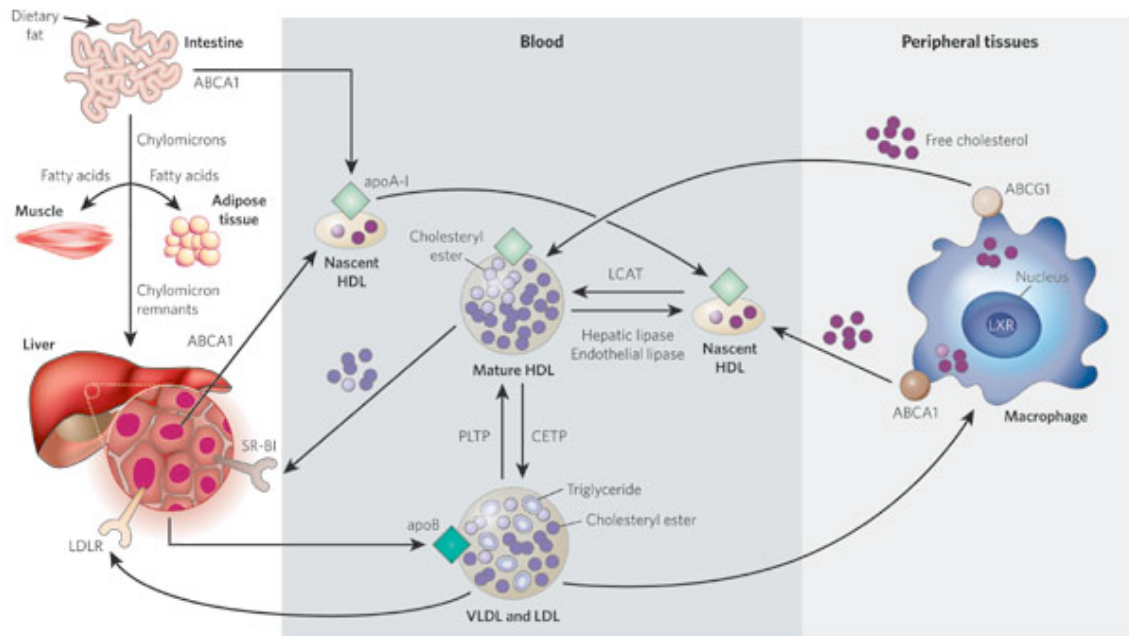
*Chylomicron remnants only.

(Adaptado de Feher MD, Richmond W, 1997, pag. 8 (115))

Os ácidos gordos são armazenados no tecido adiposo sob a forma de TG. Quando são necessários, são hidrolisados pela lipase hormono sensível, inibida pela insulina e estimulada pelos glicocorticóides, hormonas tiroideias e de stress.

Os restantes lípidos e apoproteínas da camada superficial das quilomicra são transferidos para as HDL nascentes, ficando as remanescentes das quilomicra, ricas em colesterol e apoE, são captadas pelos hepatócitos, através de receptores próprios, que reconhecem esta apoproteína, mas também pelo receptor LDL e LRP (LDL receptor related protein). Na ausência de apoE, as remanescentes acumulam-se em circulação. Nos hepatócitos, os componentes lipídicos são armazenados, catabolizados ou secretados, como componentes das VLDL endógenas.

As VLDL são lipoproteínas ricas em TG, com uma fracção pequena de colesterol e fosfolípidos. São sintetizadas no fígado com a apoB-100, dependendo da apoE para a interacção com os TG (116). Depois de entrarem em circulação, adquirem apoC-I, II, III e apoE. As dimensões da apoE são determinadas pelo seu conteúdo em TG. Pela acção da LPL, as VLDL libertam colesterol e ácidos gordos que têm o mesmo destino já referido atrás. Sob a acção da CETP (cholesteryl ester transfer protein), que promove a troca de colesterol por TG, as VLDL recebem esteres de colesterol dando origem às IDL.



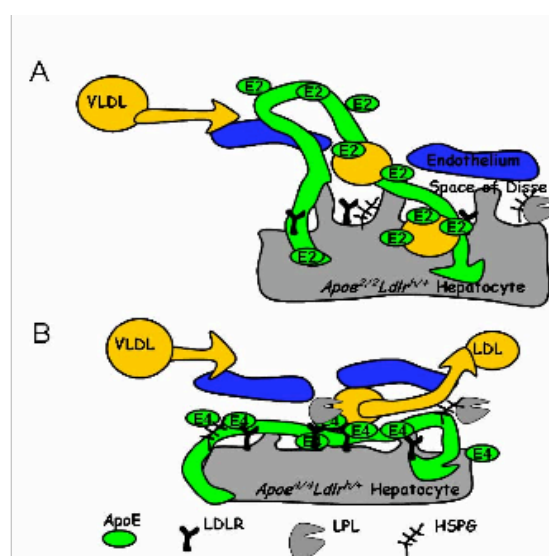
(Adaptado de *Nature* **451**, 904-913(21 February 2008))

As IDL podem ser captadas pelo fígado em processo mediado pela apoE ou são hidrolisadas pela lipase convertendo-se em VLDL, que por sua vez se ligam a receptores específicos, 60 a 70% do total, e as restantes são metabolizadas pelo fígado.

AS VLDL poderão seguir duas vias: as grandes partículas, ricas em TG, são transformadas em grandes remanescentes, ricas em apoE, são catabolizadas pelos receptores de LDL, sem serem transformadas em LDL(117) As partículas mais pequenas e ricas em colesterol originam remanescentes mais pequenas, pobres em apoE que se mantêm mais tempo em circulação devido a menor actividade para receptores de LDL(117), estas acabam por ser hidrolisadas pela lipase hepática e contêm a maior parte de apoB100.

Ao contrário deste metabolismo rápido das VLDL, as LDL levam mais tempo em circulação e funcionam próximo do nível de saturação dos seus receptores. Como já vimos, o papel da apoE, que se detalha numa rubrica posterior, é fundamental para a interacção com o receptor LDL. Em doentes com apoE2, ou sem apoE o metabolismo das IDL com apoB100 pára ao nível do estadio de remanescentes. Mutações nos receptores originam a hipercolesterolemia familiar.

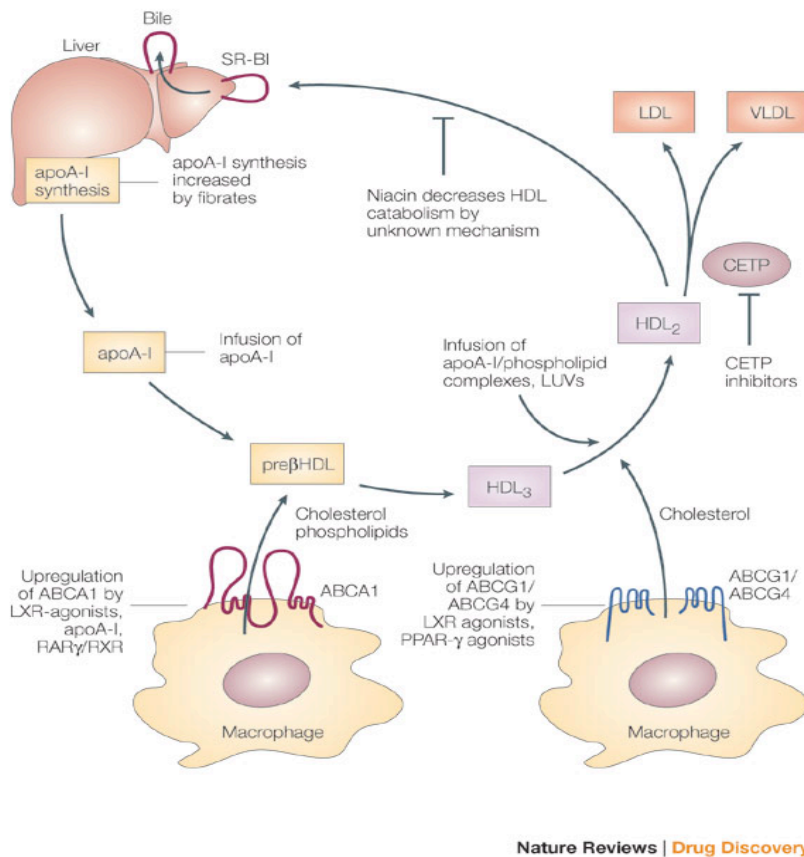
Os doentes com aumento dos TG, com ou sem diabetes, têm uma baixa afinidade para os fibroblastos (118), o que poderá condicionar a resposta inflamatória e diminuição do seu reconhecimento pelos receptores da LDL (119).



(Adaptado de Altenburg, Arterios Thromb Vasc Biol,2008(119))

As outras lipoproteínas HDL resultam essencialmente de componentes vindos da hidrólise de outras lipoproteínas, como fosfolípidos e apoA-I, apo A-II e, ou apoA-IV, e apoE, formando as HDL nascentes (HDL3). Por inclusão de esteres de colesterol proveniente das células por acção da LCAT, tornam-se esféricas e são as HDL2, podendo ligar-se a apoC-II e apoCIII ficando com estas armazenadas.(120)

As HDL podem entregar o colesterol ao fígado, directa ou indirectamente, através do mecanismo das apoB100 e CETP. Sob acção da lipase hepática são recicladas no hepatócito as HDL2, voltando a HDL3, cedendo apoC e apoE às quilomicra e VLDL.(121) Os esteres de colesterol das HDL podem ser transferidos para outros tecidos sem internalização da proteína pelo *selective cholesterol uptake*. (122)



(Adaptado de *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 193-205 March 2005)

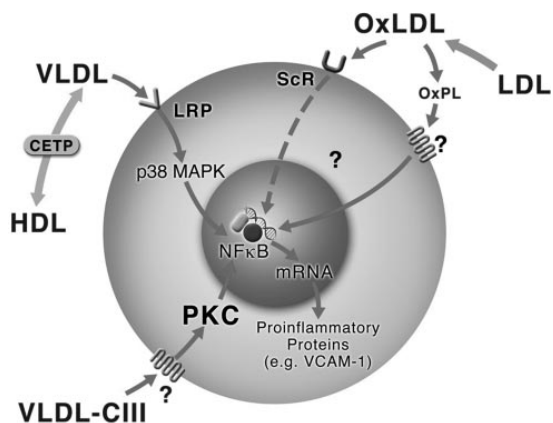
Segue-se, na próxima rubrica, o detalhe do metabolismo das lipoproteínas e inflamação, em que será mais detalhada a composição e relações com o metabolismo da imunidade inata e adquirida.

Lipoproteínas e Inflamação

VLDL Efeitos pró-inflamatórios

As acções pró-inflamatórias das LDL são bem conhecidas desde há muito, no entanto, a informação relativa às lipoproteínas ricas em triacilglicerois é mais escassa e actualmente em aberta discussão. Em 1999, Dichtl e colaboradores reportaram a activação, em células endoteliais, do NF- κ B pelas VLDL.(123) No entanto, estes resultados devem ser analisados com cuidado, pois as Lipoproteínas podem ligar-se a lipopolissacáridos bacterianos ou contaminantes laboratoriais que, mesmo em concentrações mínimas, podem provocar a activação do NF- κ B. Já Ting e colaboradores não encontraram uma relação directa entre as VLDL e a activação deste factor, mas verificaram, porém, uma potenciação do efeito das citocinas.(124)

Estas acções ocorrem na dependência do LRP, com conseqüente activação das vias da ERK1/2, da p38 MAP cínase, NF- κ B e CREB.(125, 126) A equipa de Norata identificou diferentes especificidades, atendendo ao facto de as VLDL poderem ficar retidas na parede arterial e sofrerem aí oxidação. (127, 128) Assim, as VLDL activam predominantemente a via ERK1/2, enquanto as VLDL-ox activam preferencialmente a via da p38 MAP cinase. NF- κ B e CREB são activados de forma igual por ambas as formas lipoproteicas.(129) A via da ERK1/2 induz a expressão de genes envolvidos na proliferação celular e sobrevivência, já a activação prolongada da p38 MAPK, pelas VLDL-ox, pode levar a inflamação e morte celular. As regiões reguladoras de vários genes envolvidos na inflamação contêm os elementos de resposta ao CREB e ao AP-1 que apresentam a sua actividade estimulada pelas VLDL. (125)



(Adaptado de Libby, Circ.Res.2007)

Outro mecanismo parece ser a activação no NF- κ B pela apoCIII através de uma proteína G, com transdução via PKC.(130, 131) Esta apolipoproteína activa os monócitos promovendo a sua aderência a células endoteliais, (131), quer através do aumento de expressão de VCAM-1, ou diminuição da eNOS e activação do NF- κ B. (130, 132)

Como resultado final, ocorre uma maior libertação de citocinas, com carácter pró-inflamatório(133) e disfunção endotelial (adesão endotelial (134) e resposta inflamatória endotelial (125)).

A activação dos genes responsáveis por esta resposta inflamatória parece ser mais potente nos indivíduos com hipertrigliceridémia, do que naqueles com normogliceridémia. (125) A activação do CREB, via p90RSK e MSK-1, também parece seguir o mesmo padrão.

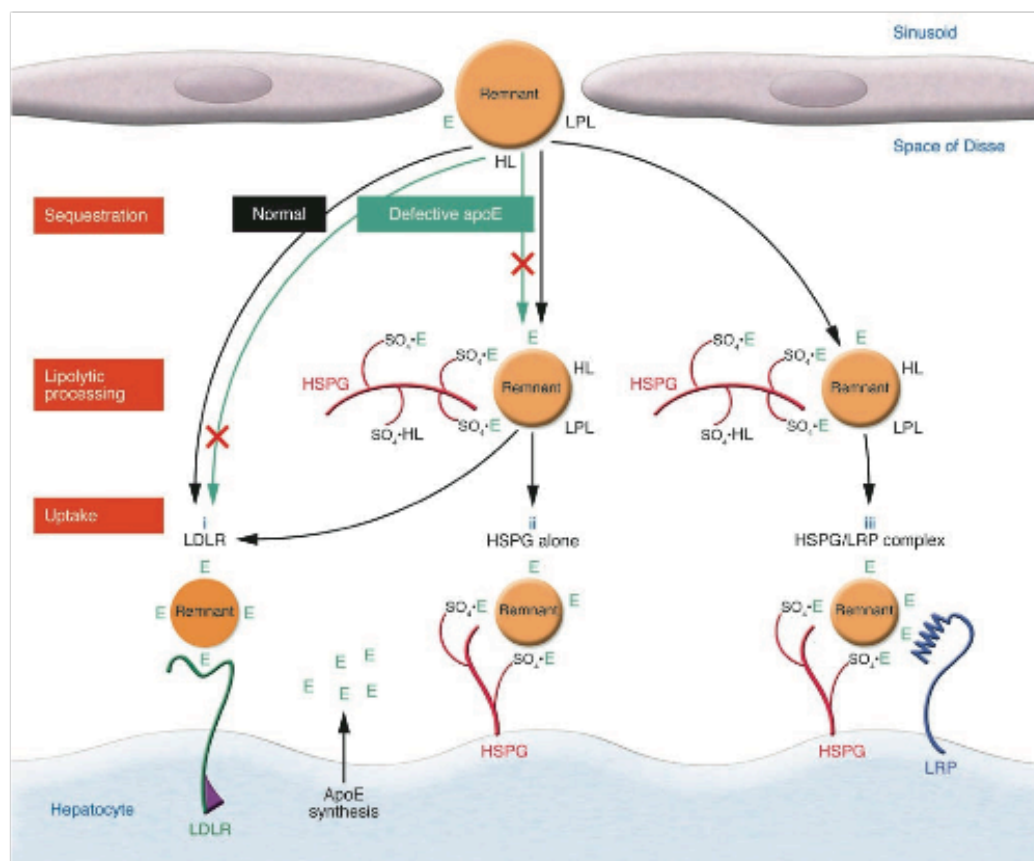
Não obstante dos estudos já efectuados permitirem estabelecer uma relação entre as lipoproteínas ricas em triacilglicerois e a inflamação, torna-se ainda necessário esclarecer alguns aspectos de transdução de sinal em causa, assim como clarificar até que ponto o NF- κ B é sujeito a activação directa por parte das VLDL, além da activação basal que esta molécula, pivô da inflamação, mantém.

Remanescentes

Estas partículas, como as restantes lipoproteínas, estão relacionadas com a inflamação dependendo para isso da quantidade de apoE e apoB100 que aparece na sua composição. Derivam das VLDL e quilomicra, os maiores transportadores de triglicéridos do plasma. A acção da lipoproteína lipase e do CETP na VLDL e quilomicra produzem lipoproteínas remanescentes com menor quantidade de triglicéridos e aumento de esteres de colesterol e apoE. Em comparação com as lipoproteínas nascentes, ricas em triglicéridos, as remanescentes são mais pequenas, com maior densidade e mais esteres de colesterol, o que parece conferir-lhes mais propriedades potencialmente aterogénicas.(135)

Sabe-se que os níveis de remanescentes são aterogénicos, modificando o risco cardiovascular, estando bem demonstrado na hiperlipoproteinémia de tipo III, em que existe deficiência da apoE, esta não se liga aos receptores de apoE e apoB, resultando numa clearance diminuída de partículas remanescentes (Mahley,1985) (136). A variante mais comum da apoE, apoE2(R158C), actua como um factor

desencadeante e que requer uma outra patologia para levar a uma acumulação de remanescentes (obesidade, hipotireoidismo, menopausa)(137, 138). A maior parte dos homocigotos para a E2 não tem alterações lipídicas. Esta variante da apoE também tem uma ligação deficiente ao LDLR (receptor de LDL), ao LRP (proteína relacionada com o LDLR) e aos proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG). Diferentes variantes foram encontradas e o que as torna aterogénicas é a sua capacidade de se ligarem aos HSPG.



(Adaptado de Mahley, J Clin Invest. 117:94-98(2007))

O risco aterogénico está ligado à quantidade de partículas que ficam ligadas à íntima das paredes arteriais. Por sua vez, o endotélio é um órgão metabolicamente activo com importantes funções no controle do tónus vasomotor, permeabilidade, coagulação, crescimento de células de tecido muscular liso, e respostas inflamatórias (139, 140). Existe evidência de que as remanescentes podem induzir vários factores inflamatórios derivados das células endoteliais (141). Os factores inflamatórios são observados, por exemplo, nos doentes diabéticos, em que o aumento dos triglicéridos pós-prandial, se acompanha de aumento de TNF- α e IL-6, relacionados com o estado

inflamatório pós-prandial(135). O TNF- α pode induzir diminuição de sintetase endotelial de óxido nítrico, diminuindo assim a vasodilatação endotelial. Estes factores inflamatórios podem ter origem no recrutamento de monócitos e macrófagos, com aumento de MCP-1, no aumento de adipocinas do tecido adiposo, levando a um estado de inflamação crónica e, por fim, como já foi referido, a alterações na produção de citocinas pelas células endoteliais. Em outras situações inflamatórias, como a esclerose múltipla, o nosso modelo de estudo, também deverão verificar-se alterações de alguns destes parâmetros já referidos.

LDL e Inflamação

Durante a inflamação, além da alteração nos lípidos e lipoproteínas, também a composição destas muda (112).

As alterações das LDL referem-se, especialmente, ao aumento das lipoproteínas mais pequenas e densas. Estas são aterogénicas dada a sua susceptibilidade à oxidação, e podem assim penetrar no endotélio e ligar-se aos proteoglicanos da íntima, melhor do que uma LDL de maiores dimensões.

A afinidade para os receptores de LDL é também menor (maior quantidade de apoB100), diminuindo o seu catabolismo(142) Nigon F (113). O facto de serem oxidadas resulta em captação rápida pelos macrófagos, levando a maior acumulação de colesterol nestas células.

A oxidação da LDL tem um papel muito importante na aterosclerose mas, para o nosso trabalho, tem mais interesse, embora não seja dissociável, o papel na inflamação. Os marcadores de peroxidação lipídica estão aumentados no soro de animais tratados com LPS (lipopolissacárido) (Memon, 2000) (143) sendo a LDL isolada destes animais mais susceptível à oxidação *in vitro*, levando à observação da resposta das LDL aos processos infecciosos.

Outro marcador inflamatório, que se liga à LDL oxidada e aos fosfolípidos oxidados, é a Proteína C reactiva, já descrita anteriormente. Esta proteína aumenta também a recaptação pelos macrófagos, promovendo a formação de células esponjosas usando a LDL oxidada. (Chang, PNAS, 1999)(144)

Durante a infecção e inflamação, aumenta a sPLA2 (secretory nonpancreatic phospholipase A2) que hidroliza os fosfolípidos na LDL na posição *sn*-2, dando origem a ácidos gordos polinsaturados que podem por sua vez ser oxidados.

No ser humano, a maior parte da actividade da PAF-AH associa-se à LDL (70%). Esta molécula degrada o PAF produzido em quantidade aumentada na inflamação e infecção, e hidroliza a fosfatidilcolina associada à lipoproteína, dando uma molécula aterogénica (REF) levando a pensar que, durante a reacção de fase aguda, existe realmente uma modificação das lipoproteínas tornando-as pró-inflamatórias.(145)

A LDL circulante está enriquecida em vários esfingolípidos incluindo esfingomiéline, ceramida e GlcCer, durante esta fase inflamatória (REF). Quando a esfingomiéline da LDL chega à parede arterial pode, em parte, ser convertida em ceramida pela esfingomiélinase. A ceramida promove a agregação de lipoproteína, estimulando a captação de LDL pelos macrófagos.

No endotélio, as LDL modificadas estimulam as células para exprimirem a MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) que, por sua vez, recruta monócitos da circulação para a parede arterial (146) (147). As LDL modificadas promovem ainda a diferenciação dos monócitos em macrófagos (148). Os macrófagos vão exprimir uma quantidade de receptores scavenger, com capacidade para se ligarem às LDL modificadas, tornando, como já foi dito, o macrófago em célula esponjosa. O macrófago secreta ainda uma quantidade apreciável de citocinas como o TNF- α e a IL-1, estimulando a produção de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina. Estas proteínas de adesão celular ligam-se aos monócitos do endotélio, tornando-os disponíveis para a MCP-1. Os macrófagos também segregam factores de crescimento e metaloproteínases que levam a proliferação celular e destruição da matriz.

Por outro lado, para o nosso trabalho, interessa também o papel das LDL oxidadas presentes na microglia e macrófagos em estádios precoces da EM (149). Quando há ruptura da BHE, as LDL oxidadas podem promover a activação da imunidade, desmielinização e toxicidade neuronal.(150)(Horkko 2000)

Lp(a)

Esta lipoproteína, apesar de não ter sido estudada directamente no nosso trabalho, merece uma menção dadas as relações que tem com as LDL oxidadas, com o plasminogénio e, portanto, com a inflamação.

A Lp(a) é um complexo macromolecular agregado à LDL, com uma glicoproteína de grandes dimensões, ligada por uma ligação bissulfito à apoB100. Tem uma estrutura “multikringle” semelhante ao plasminogénio. A sua estrutura em “Kringles”, cada um com 80 aminoácidos é extremamente variável ao contrário da apoB100, tendo variações de tamanho e polimorfismos de origem genética e com base nas repetições de Kringles IV de tipo 2(151).

De início, foi considerada como fazendo parte do mecanismo de transporte de colesterol de origem hepática, independentemente da dieta e metabolismo dos triglicéridos.(152) Sendo os principais destinos deste colesterol as gónadas, os níveis de hormonas sexuais poderiam exercer um efeito de retroacção negativa na síntese desta lipoproteína.

O locus genético da apo(a) é o mesmo do plasminogénio, levando à inibição do mecanismo de fibrinólise por competição com o plasminogénio para os receptores nas células endoteliais, macrófagos, monócitos e fibrina, inibindo a produção de plasmina, inibindo a secreção de t-PA, inibindo a acção activadora do plasminogénio por parte deste.(153)

A Lp(a) interage com as plaquetas através da GPIIb, contribuindo para um outro mecanismo de agregação plaquetária, independente da oxidação da LDL.

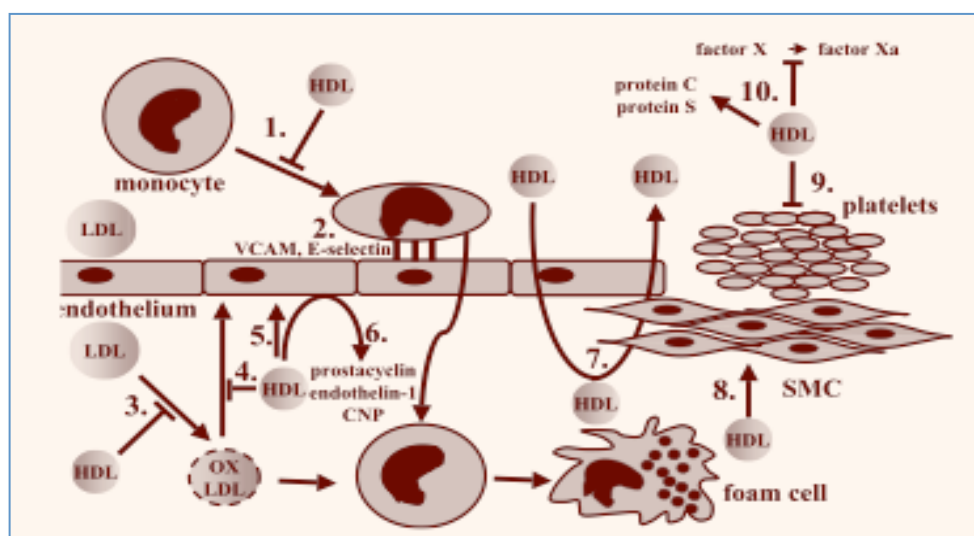
Tal como a LDL, esta apoproteína poderá, no futuro, correlacionar-se com as alterações encontradas na esclerose múltipla. Alguns autores (154) compararam os níveis de Lp(a) durante as fases de actividade da doença em que se encontravam valores mais elevados desta apoproteína, e após terapêutica com interferão β 1, em que encontraram uma subida dos valores no primeiro ano de administração da droga. Estes factos podem explicar-se pela indução feita sobre a Lp(a) pela IL-6, sendo este efeito também modulado por outras citocinas, como por exemplo o interferão.

Estes trabalhos reforçam pois a ideia de que existe uma interligação entre o metabolismo lipídico e imunitário.

HDL e Inflamação

A lipoproteína de elevada densidade (HDL) é uma partícula esférica (diâmetro de Stokes 7.4-12 nm, densidade $1.063 < d < 1.21$ g/ml) formada por um núcleo hidrofóbico (principalmente de ésteres de colesterol e uma pequena quantidade de triacilgliceróis) rodeado por uma mono camada de fosfolípidos, colesterol não esterificado e apoproteínas (155-158). Das últimas, destacam-se a apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, apoJ, apoM. Estas proteínas e enzimas como a lecitina: colesterol acil transferase (LCAT), a paraoxonase (PON-1 e PON-3) (159), fosfolipase A₂ associada à lipoproteína (Lp-PLA₂ ou PAF-AH) (160), glutatíão selenoperoxidase (GSPx), proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) constituem, pelo menos, 30 % da lipoproteína (155, 161). A proteína de fase aguda positiva, amilóide sérico A (ASA), a α_1 -antitripsina, ceruloplasmina e o amilóide- β também podem ser transportados pela HDL, sobretudo durante a inflamação. (162, 163)

A função *major*, classicamente atribuída à HDL, é a promoção do efluxo de colesterol das células e o respectivo transporte para o fígado, o chamado “transporte reverso do colesterol”. Além de colesterol, lipopolissacáridos bacterianos e vitaminas também podem ser transportadas. Actualmente, outras funções são atribuídas à HDL de que se destacam as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-apoptóticas e antitrombóticas.



(Adaptado de Nofer et al., 2002(164))

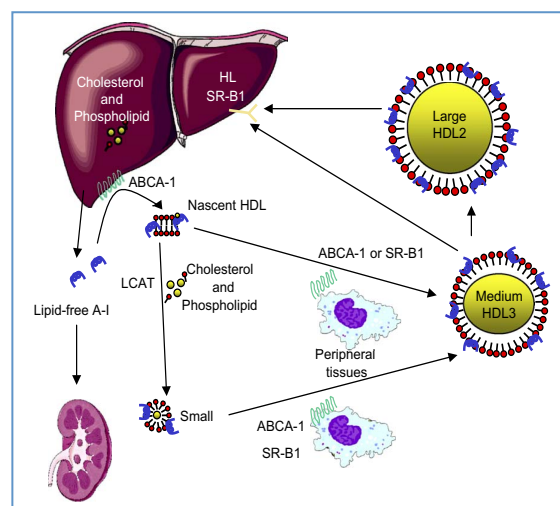
Propriedades Anti-Inflamatórias da HDL

Esta função é mediada sobretudo através das proteínas e enzimas, permanentes ou transitórios, que constituem a partícula de HDL. De seguida, vão ser descritos os componentes da HDL e respectivas propriedades com relevância na Inflamação.

APOPROTEÍNA A-I

É um polipéptido com 243 aminoácidos e peso molecular de 28 KDa, secretada pelo fígado e intestino delgado na forma de pré-proteína (165-168). Aquela, sintetizada pelo intestino, é incorporada nas quilomicra e remanescentes conjuntamente com a apoA-IV. Ao atingirem a circulação sanguínea, estas proteínas são transferidas para as HDL.(169)

Observa-se uma correlação entre os níveis de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, a HDL e o catabolismo da apoA-I (170). Aquando de baixos valores de quilomicra e VLDL, a actividade da CETP está diminuída, propiciando a formação de HDL's ricas em ésteres de colesterol, esféricas e com elevada capacidade de fixação de apoA-I, como já referido, pelo menos duas moléculas, daqui resultam menos apoA-I dissociadas disponíveis para catabolismo renal. As HDL serão também em maior número. Quando elevados níveis de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis estão presentes, verifica-se o oposto: 1) maior actividade da CETP; 2) consequente depleção HDL em ésteres de colesterol, com HDL's mais pequenas e em menor número; 3) maior dissociação da apoA-I e 4) por fim, este aumento de apoA-I

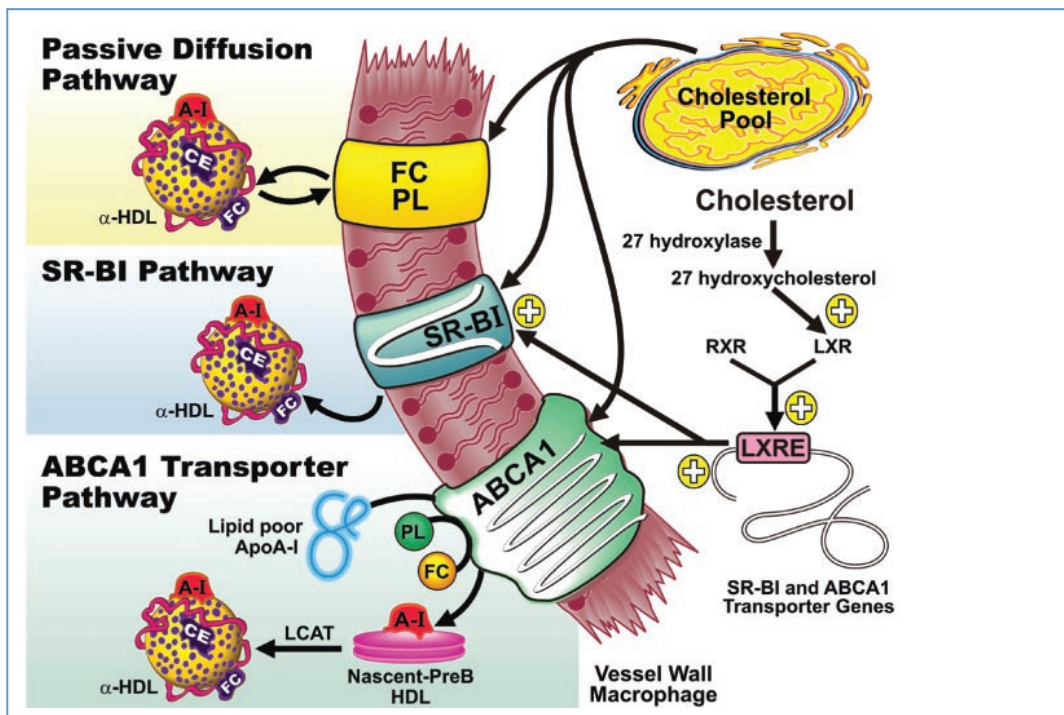


(Adaptado de Norata et al., 2006(171))

livre leva a um aumento do seu catabolismo (170)

A apoA-I desempenha múltiplas e vitais funções na HDL entre as quais:

- a) Estimula o efluxo de colesterol, promovendo o transporte reverso do colesterol (172, 173). Para este fim, interage com a ABCA1(174);
- b) É uma potente activadora da LCAT (175-177);
- c) Activadora da HL (178);
- e) Reduz a oxidação das LDL (179-181). A apoA-I inibe vários passos, necessários à formação de peróxidos lipídicos que promovem a inflamação.



(Adaptado de Brewer, 2004(182))

APOPROTEÍNA J

A apoJ, também conhecida como clusterina, é uma glicoproteína heterodimérica com 427 aa (183, 184) que se associa com a paraoxonase e ApoA-I, numa subpopulação específica da HDL. (185) A apoJ é uma proteína de fase aguda, elevando-se após a administração de endotoxinas ou IL-1.(186) Encontra-se elevada também nos processos de cicatrização e nas lesões ateroscleróticas.(187)

São funções conhecidas da apoJ:

- a) Regulação do complemento (188);
- b) Regulação da apoptose (189);
- c) Transporte lipídico (190);
- d) Protecção das membranas (191);
- e) Inibibe a oxidação das LDL (192).

APOPROTEÍNA M

É uma apolipoproteína de 188 aa, recentemente descoberta, pertencente à superfamília das lipocalinas e exclusivamente sintetizada pelo fígado e rim, associa-se predominantemente à HDL.(193, 194)

São funções prováveis para apoM:

- a) Anti-aterogénica. Parece desempenhar um papel importante nas fases iniciais do metabolismo HDL, nomeadamente no efluxo de colesterol (195);
- b) Inflamatória. A sua síntese é estimulada pelo PAF e pela leptina (196, 197).

PAF-AH

A PAF-AH plasmática é um enzima monomérico de 43 KDa secretada sobretudo pelos macrófagos. Aproximadamente 70% deste enzima encontra-se associado às LDL, enquanto o restante se associa às HDL.

O PAF é um fosfolípido biologicamente activo envolvido na inflamação, anafilaxia e reprodução. Este é inactivado pela PAF-AH, que remove o grupo acetil da posição sn-2 do PAF.

Este enzima regula os níveis de PAF plasmáticos desempenhando funções:

- a) Anti-inflamatórias (198);
- b) Anti-alérgicas (199);

- c) Antioxidantes, pela metabolização dos fosfolípidos oxidados, facilitando a hidrólise de ácidos gordos de cadeia curta oxidados da posição sn-2 (199, 200).

PARAOXONASE

A paraoxonase-1 (PON-1) é um enzima, secretado pelo fígado, de 354 aa, com uma massa molecular de 43KDa.(201) A PON-1 pode ligar-se reversivelmente aos organofosforados, procedendo à sua metabolização. Constitui assim, o principal meio de protecção do sistema nervoso contra a neurotoxicidade provocada pelos organofosforados que entram em circulação, visto estes causarem inibição irreversível de importantes enzimas, como a pseudocolinesterase e acetilcolinesterase. Foi neste contexto que a PON-1 foi descoberta e o seu nome reflecte a sua capacidade para hidrolizar a paraoxona, um metabolito do insecticida paratião.

Na HDL pensa-se que a PON-1 hidrolise os fosfolípidos de cadeia curta oxidados provenientes das LDL.(202) Para a actividade e estabilidade deste enzima é crítica a interacção com a ApoA-1.(203). Nalgumas doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistémico existe diminuição dos níveis da PON acompanhando anticorpos antiHDL,(204) podendo também neste contexto estar alterada na EM

São funções da PON-1:

- a) Antioxidante. Pela hidrólise de peróxidos lipídicos(202) e de peróxido de hidrogénio(163);
- b) Hidrólise da homocisteína tiolactona;(205, 206)
- c) Promoção do efluxo de colesterol via ABCA1; (207)
- d) Anti-inflamatória. Pelo bloqueio dos efeitos pró-inflamatórios das LDL moderadamente oxidadas, conduzindo a uma menor expressão de MCP-1 e, por conseguinte, inibição da quimiotáxia monocitária. (147)

PROTECÇÃO ENDOTELIAL

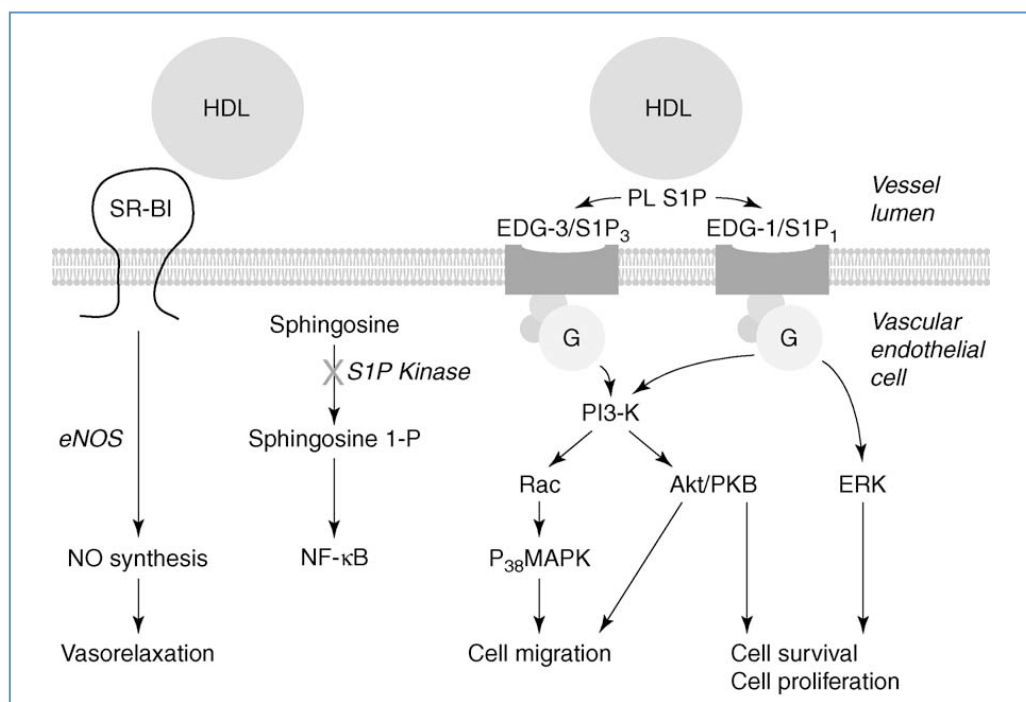
O papel das células endoteliais durante a inflamação é crítico e de particular importância nas doenças inflamatórias.

Além da promoção do efluxo de colesterol e da acção antioxidante, a HDL constitui um importante estímulo anti-inflamatório nas células vasculares.

A HDL inibe, a nível transcripcional, a expressão induzida por citocinas de moléculas de adesão celular como a E-Selectina, V-CAM e I-CAM. (208, 209) Estes efeitos parecem ser modulados pelos lisoesfingolipidos, presentes na HDL, particularmente a esfingosina-1-fosfato (S1P). (160, 210) Outros efeitos da HDL são hoje também atribuídos à S1P:

- Inibição da expressão de moléculas de adesão celular, que conduzem a menor interação dos monócitos com as células endoteliais e musculares lisas (208, 209);
- Inibição da apoptose de células endoteliais (211);
- Indução da eNOS(212) e PGI₂(213);
- Antagoniza o efeito inibitório sobre o vaso-relaxamento induzido pela lisofosfatidilcolina, um dos produtos mais importantes da oxidação das LDL(214);
- Inibição da migração de células musculares lisas induzida por factores de crescimento(215, 216);
- Estimulação da vasculogénese(217).

Estes efeitos são mediados pelos receptores S1P₁, S1P₂ e S1P₃



(Adaptado de Alenezi, et al., 2004 (218))

A prostaciclina (PGI₂) é outro vasodilatador produzido pelo endotélio, que actua em sinergia com o NO. A sua síntese parece ser estimulada pelas HDL(213). A

síntese de PGI₂ depende de dois factores. Primeiro, HDL suprime as células endoteliais com ácido araquidónico (213). Segundo, a HDL induz a síntese de cicloxigense 2, que é um enzima crucial para a síntese de prostanoídes pelas células endoteliais(209).

A HDL parece ainda modular a síntese de dois importantes factores endoteliais: a endotelina-1(219) e o péptido natriurético C(220). Este último promove a vasodilatação, inibição da proliferação das células musculares lisas e também a inibição da secreção de ET-1.

Outra característica muito importante das HDL é a sua forte actividade antitrombótica. Sobre a hemostase primária salienta-se efeito ser mediado pelo NO, PGI₂, mas também pela redução de PAF produzido pelas células endoteliais (221). Por outro lado, como já referido atrás, a HDL transporta enzimas como a LCAT, PAF-AH e PON-1, todas capazes de catabolizar o factor activador plaquetário. Foi ainda demonstrado que a HDL inibe a secreção dos α grânulos e grânulos densos, mediada pelo ADP e trombina (222, 223). A HDL também mostrou ser capaz de inibir a ligação do fibrinogénio às plaquetas induzida pela trombina. Existe uma relação inversa entre os níveis de HDL e o factor de von Willebrand.

Relativamente à hemostase secundária e terciária, salienta-se a inibição da activação do factor X (224), estimulação da activação da APC (164) e uma aparente correlação negativa com os níveis de t-PA e PAI-1(225).

Propriedades Pró-Inflamatórias da HDL

Um corpo crescente de evidências sugere que, em situações próprias, as HDL tornam-se disfuncionais, facilitando o recrutamento leucocitário e fenótipos de activação celular. Portanto, a HDL pode perder as suas propriedades protectoras e tornar-se pró-inflamatória num contexto de inflamação sistémica, tal como provaram van Lenten e colaboradores (62) ao demonstrarem diminuição das propriedades anti-inflamatórias num contexto de resposta de fase aguda.

Múltiplas doenças que têm sido associadas a HDL disfuncionais incluem doença coronária, síndrome metabólica, doença renal crónica, apneia obstrutiva do sono, cirurgia, infecções e algumas doenças reumatológicas. A título de exemplo, é hoje sabido que uma sépsis ou mesmo uma infecção por vírus influenza podem diminuir a concentração de HDL em 50% (226).

Múltiplos mecanismos conferem características pró-inflamatórias à HDL. Nos tópicos seguintes serão apresentados aqueles que mais consenso apresentam na actualidade.

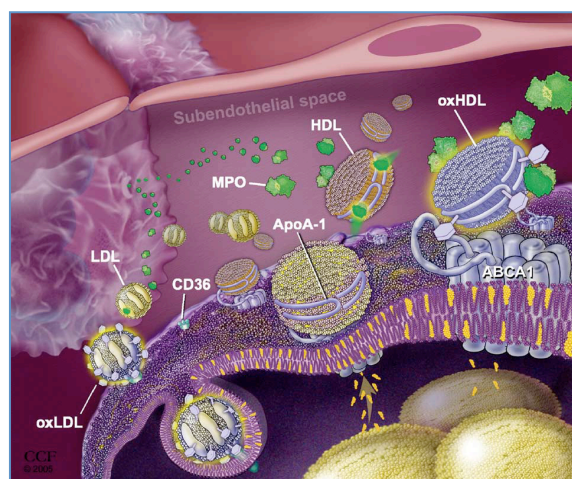
GLICAÇÃO DA HDL

A glicação parece contribuir para a génese destas características anómalas. A glicação parece ter particular importância no contexto de diabetes e resistência à insulina. Hedrick e colaboradores(227) demonstraram que a incubação da PON-1 numa solução de glicose diminuía a actividade deste enzima em 35%. Assim, este grupo demonstrou que a glicação enzimática afecta consideravelmente a capacidade antioxidante da HDL.

MODIFICAÇÃO DA HDL PELA MIELOPEROXIDASE

Um trabalho recente demonstrou a modificação da apoA-I, quer na circulação sistémica, quer nas placas ateroscleróticas, pela mieloperoxidase, que cataliza a nitração e cloração desta molécula (228). Esta alteração parece ocorrer com alguma selectividade, já que os níveis de nitrotirosina e clorotirosina encontrados na ApoA-I plasmática são cerca de 100 vezes superiores àqueles encontrados noutras proteínas típicas (1). A formação destes aductos em resíduos de tirosina diminuem, de forma acentuada, a capacidade de a ApoA-I promover o efluxo de colesterol via a ABCA1 (228). Os processos funcionais subjacentes a esta situação parecem ser a diminuição da ligação lipídica à apoA-I e a diminuição da actividade da ABCA-1 nos macrófagos (229).

Apesar de já se conhecerem os resíduos de tirosina que são alvo de nitração e cloração, Y166 e Y192, nas hélices 7 e 8, respectivamente, e que esta se dá de



(Adaptado de Nicholls et al., 2005(228))

forma dose-dependente, primeiro o resíduo Y192(1), a relação entre estes locais e as alterações das funções da HDL e ApoA-I ainda permanecem por esclarecer. Embora haja uma correlação entre estas modificações e a perda funções da HDL, ainda não foi possível estabelecer uma relação causal. Continua também por determinar se existem vias alternativas, independentes à mieloperoxidase, capazes de provocar a nitração da HDL.

Lípidos e Patogenia da Esclerose Múltipla

Introdução

A patologia da EM é normalmente descrita como um processo auto-imune levando a desmielinização, que tem como base a lesão da mielina por autoanticorpos. O aspecto autoimune está documentado no que diz respeito às proteínas da mielina mas a imunidade lipídica está menos estudada(230-233). No entanto, o conhecimento dos lípidos que fazem parte da constituição da mielina, são muito importantes para a compreensão do desenvolvimento de anticorpos durante a desmielinização inflamatória.(230)

A mielina contém cerca de 70 a 80 % de lípidos. A constituição em triglicéridos, ácidos gordos livres e esteres de colesterol é mínima. Estes últimos só se acumulam num breve período antecedendo a mielinização ou em condições patológicas. Os fosfolípidos e colesterol são mais abundantes na substância branca do que na cinzenta. (Sena, 1983). Cerca de 50% dos lípidos totais da substância branca pertencem à constituição da mielina. No início do desenvolvimento, a composição da substância branca e cinzenta é a mesma mas, depois, graças à maior quantidade de galactolípidos que se acumulam na substância branca, esta passa a ter uma percentagem de 25 a 30%, enquanto na substância cinzenta temos 5 a 10%. Em contraste, os fosfolípidos são mais abundantes na substância cinzenta (70%), onde os gangliósidos estão largamente concentrados.

Os neurónios estabelecem as suas conexões morfofuncionais através de sinapses concentradas na substância cinzenta. Entre essas áreas encontra-se a substância branca onde os axónios são envolvidos pela bainha de mielina, embora esta também envolva axónios na substância cinzenta. (Sena A, Ferret-Sena V.,2010, para publicação). Na EM, o processo de desmielinização atinge a substância branca e algumas áreas da substância cinzenta, sendo as lesões independentes(234). Existe

também um processo de degenerescência neuro-axonal independente da desmielinização(25).

Os axónios possuem um complexo citoesqueleto necessário para a integridade metabólica, morfológica e funcional do neurónio através de transporte axonal e fundamental para a plasticidade sináptica e processos regenerativos (Sena A, Ferret-Sena V.,2010, para publicação).

Também os neurónios e os oligodendrócitos, por estímulos inflamatórios, expressam moléculas MHC (major histocompatibility complex) classe I permitindo a apresentação antigénica a células TCD8+. Outro mecanismo prende-se com o colesterol neuronal, envolvendo os astrócitos. O seu derivado, 24 S-hidroxicolesterol (24S-OH), é específico do cérebro e com origem primariamente nos neurónios. Sendo excretado e doseado no soro é um sinal inibitório para a síntese do colesterol pelos astrócitos, que são a principal fonte desta molécula para a sinaptogénese e a regeneração axonal, sendo associado ao processo neurodegenerativo(235). Os níveis de 24S-OH alterados encontram-se nas demências vasculares, doença de Alzheimer e EM. O transporte no cérebro faz-se sobretudo à custa da apoA-1 e apoE as apoproteínas mais abundantes no liquor. Os astrócitos são indispensáveis para a sinaptogénese, sintetizam colesterol, que associado à apoE, é fornecido aos neurónios.

A apoE tem sobretudo origem astrocitária, mas também será sintetizada pela microglia, oligodendrócitos e também pelos neurónios (pelo menos em certos contextos).

A sua produção por estas células está aumentada em situações de lesão, activação inflamatória ou por estimulação pelo A β e terá um papel regenerativo neuronal e anti-inflamatório.

A isoforma E 4 fornecerá menor capacidade trófica ou regenerativa e não só na sua expressão neuronal.

Apresentamos de seguida, em mais detalhe, as relações da apoE com a EM. ApoE na Esclerose Múltipla

A apoproteína identificada em 1973, bioquimicamente, teve o seu papel definido enquanto ligada a partículas contendo fosfolípidos e colesterol, e na ligação específica a receptores de membrana na regulação do metabolismo lipídico.

Esta apolipoproteína, das menos abundantes no plasma, existe em todas as Lipoproteínas excepto nas mais pequenas LDL (138).

Depois de ser secretada como componente da VLDL a apoE redistribui-se, enriquecendo as quilomicra, as remanescentes e as HDL.

A apoE tem múltiplas funções, tais como, interagir com a lipase hepática para modular a lipólise dos triglicéridos, ligar-se ao sulfato de heparano, à LRP (receptor da proteína de ligação à LDL) e à proteína com ele relacionada para facilitar a internalização das lipoproteínas plasmáticas. Está também associada à maturação da HDL (Koo,1985). Existe ainda uma apoE não associada a lipoproteína, produzida pelos hepatócitos e macrófagos que assegura a pronta disponibilidade do ligando para as remanescentes que aumentam, permitindo uma recaptação mais eficaz destas partículas (Ji 1994a).

No meio intracelular, ainda podemos considerar as funções da ApoE biologicamente relevantes parecendo contribuir para a incorporação dos triglicéridos nas lipoproteínas para formar VLDL (236).

A apoE internalizada pode escapar à via de degradação lisossomal podendo, assim, contribuir para a secreção de lipoproteínas, captação das remanescentes e efluxo de colesterol da célula (237).

É um factor importante no transporte, captação e redistribuição do colesterol, sendo um aspecto da remodelação e reparação do tecido neuronal.

Esta proteína, normalmente estudada no metabolismo lipídico, tem 299 aminoácidos, 34-kDa, tem 3 isoformas, designadas E2, E3, E4, codificadas por alelos distintos no cromossoma 19.

As isoformas distinguem-se pela troca de um único aminoácido no resíduo 112 e 158: E3 (Cys¹¹² Arg¹⁵⁸), E4 (Arg¹¹² Arg¹⁵⁸) e E2 (Cys¹¹² Cys¹⁵⁸).

A frequência do alelo ApoE4 foi associada ao aparecimento de doença de Alzheimer em idades mais jovens e com prognóstico pior em doenças

neuroinflamatórias como a esclerose múltipla. A apoE4 é também associada com pior prognóstico nas lesões cerebrais por traumatismo e ao aumento da resposta inflamatória nos doentes com bypass cardiopulmonar.

A função da ApoE no metabolismo lipídico resulta da associação com lipoproteínas e a sua acção é mediada pela ligação aos receptores das LDL.(238) A apoE é um ligando para os 7 membros da família dos receptores de LDL (LDLR)(239). Estes são: o receptor 2 da apoE (ApoER2), o receptor das VLDL (VLDLR), o factor de crescimento epidermóide (EGF), a proteína de repetição (MEGF7), a megalina, a proteína relacionada com a LDL (LRP1), a proteína relacionada 1-b (rpl1b).

Papel da apoE na Inflamação

Esta apolipoproteína é que o SNC produz em maior quantidade nos astrócitos. De uma forma independente do seu papel no metabolismo lipídico, a apoE modula as respostas de imunidade inata e adquirida *in vivo* e *in vitro*.(240) O mecanismo pelo qual a apoE exerce essas funções permanece controverso.

A apoE parece ligar-se a receptores de alta afinidade e iniciar uma resposta de sinal dependente do Ca nas células imunocompetentes⁽²⁴¹⁾.

A apoproteína desempenha um papel na modificação das respostas inflamatórias no cérebro, de tal modo que, o ratinho transgénico com expressão de apoE4 tem aumentos significativos das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL6, comparados com os que expressam apoE3, sugerindo um efeito específico desta isoformas nas propriedades imunomoduladoras da ApoE (242). As isoformas desta apoproteína, estudadas na neurite experimental, parecem ter um papel na estabilização do citoesqueleto, especificamente na reunião dos microtubulos (243), sendo que a ApoE 3 estimula a polimerização da β tubulina e estabiliza a formação de microtúbulos nas culturas de neurónios, enquanto a destabiliza a reunião dos microtúbulos(244) .

ApoE na Neurodegenerescência

A apoE tem um papel imunomodulador modificando as respostas inflamatórias no SNC e este alelo está associado com doença degenerativa do SNC como a doença de Alzheimer em idade mais jovem e também no aparecimento de doença cardiovascular.

Tem sido posta a hipótese das isoformas da apoE afectarem a formação da placa amilóide, o metabolismo da proteína amilóide $\beta(A\beta)$ ou ambos.

A apoE4 livre forma um complexo estável in vitro com a proteína $A\beta$, enquanto isso não acontece com a ApoE3.

No entanto, as isoformas referidas, quando ligadas aos lípidos, comportam-se de modo inverso em termos de ligação às placas de amilóide, talvez por isso a apoE3 seja um dos mecanismos que impede a acumulação de $A\beta$ neurotóxicas, dado que são eliminadas através da ligação à apolipoproteína.

A apoE está associada à existência de placas amiloidóticas no cérebro dos doentes com Alzheimer, sabendo-se que a apoE4 forma complexos insolúveis com o péptido $A\beta$, e que a apoE3 é muito menos reactiva será um facto que explica os agregados de miofibrilas encontrados nestes doentes e que evoluem para placas.

Além destes mecanismos, o facto de a isoforma E3 ter funções como antioxidante, o que não acontece com a E4, foi estudado no ratinho transgénico que expressa E4 nas células do hipocampo. Nestas, encontram-se mais lisossomas os quais, por vezes, sofrem ruptura de membrana e saída dos enzimas lisossomais para a célula, dando origem a vacúolos e, posteriormente, fenómenos de apoptose e degenerescência neuronal.(245)

Os mecanismos de inibição do enzima de degradação da $A\beta$, neprilina, nos ratinhos que expressam apoE3 e apoE4, resultam em aumento da $A\beta$ no cérebro. A nucleação e a agregação de $A\beta$ no cérebro dos ratinhos foram afectadas pelo tipo de genótipo ApoE4 e estão associados a deficits cognitivos.(246)

ApoE e Esclerose Múltipla

Dado que a reparação do tecido neuronal e a imunomodulação são responsáveis pela restauração das funções do SNC depois das recidivas da esclerose múltipla, o genótipo da ApoE poderá influenciar a evolução clínica da EM. De um modo geral, a apoE 3 e apoE 2 são eficazes na protecção e reparação do tecido neuronal, enquanto a apoE4 não parece ser eficaz.(247)

A apoE 3 liga-se à proteína tau impedindo a fosforilação desta. A hiperfosforilação leva a uma impossibilidade de ligação aos microtúbulos e leva a depósitos de proteína tau intracelulares (aglomerados neurofibrilares).

Vários estudos defendem a teoria que diz ser o alelo apoE4 mais comum nos doentes do que na população controle e Hogg et al confirmaram a hipótese. Os dados estatísticos dos artigos consultados (242) não demonstram associação entre os vários tipos clínicos e este alelo. Fazekas et al encontraram número de recidivas maior nos possuidores de apoE4, mas outros discordam, mesmo na mesma população.

Esta associação foi comprovada por alguns estudos mas a maior parte não permitiu estabelecer umnexo de causalidade. Seria melhor aumentar o número de amostras com apoE 4, em doentes de EM, e fazer estudos prospectivos que serão mais precisos, obtendo dados mais fiáveis (242).

Os compostos no tabaco e a própria nicotina têm efeitos imunossupressores sistémicos, inibem activação da microglia, inibem o recrutamento de neutrófilos durante a inflamação.

Metabolismo Lipídico e Esclerose Múltipla

O metabolismo lipídico é crucial para a mielinização porque os lipídios são fundamentais para a síntese e manutenção da membrana de mielina e os estudos genéticos revelam novas facetas da mielinogénese e sua manutenção, relevantes para a EM. Por exemplo, a inactivação da esqualeno sintetase interrompe a síntese de colesterol nos oligodendrócitos levando a hipomielinização do SNC, a qual melhora com a idade talvez devido a transferência de colesterol de células não afectadas(248). Poderíamos mencionar outras alterações, mas recentemente interessa nos o enzima fosfolipase A2 (PLA2), que hidroliza fosfolípidos para libertar ácidos gordos e lisofosfolípidos e parece estar relacionado com a inflamação e desmielinização.(249).

A inibição PLA2 reduz a hidrólise de fosfolípidos e a libertação de ácidos gordos pró-inflamatórios, podendo tornar-se um alvo para terapêutica de EM.(230).

A partir dos anos 50, muitos estudos foram efectuados na mielina e substância branca desta doença, suportando a hipótese de uma maturação anormal da sua

composição, incluindo lipídica, poder susceptibilizar o desenvolvimento de uma reactividade imunitária(250).

Mais relevantes para a abordagem do nosso trabalho são os estudos observando alterações séricas associadas ao metabolismo lipoproteico e dos ácidos gordos.

Estes trabalhos observaram alterações no perfil lipoproteico e actividade da paraoxonase-1(251, 252), da concentração de apoE (253) e da composição em ácidos gordos que ficam associados à actividade ou forma clínica da EM. Foi ainda observada a presença de LDL oxidada de origem plasmática nas lesões de desmielinização (150) e sua participação no controlo do processo neuroinflamatório(254).

Os ácidos gordos polinsaturados foram utilizados como opção terapêutica na EM e outras doenças inflamatórias autoimunes. Alguns estudos tentaram demonstrar a relação entre alimentação em gorduras saturadas e o risco de desenvolvimento de EM, (255, 256). Algumas conclusões têm sido pouco consistentes, dado que, só mais tarde, foi contemplada a hipótese de a quantidade de vitamina D ter influenciado os resultados, como já foi referido no capítulo de introdução deste trabalho. No entanto, parece haver uma relação benéfica entre os ácidos gordos ómega 6 e ómega 3 e o seu potencial efeito anti-inflamatório, pela inibição competitiva do ácido araquidónico, cujos metabolitos são pró-inflamatórios (257). Por outro lado, a produção de prostaglandinas anti-inflamatórias E1 e E2, derivadas do ácido ómega 6, pode inibir a interleucina 2 e o interferão γ , podendo inibir também a função linfocitária através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias (258, 259). Podem ainda ser agonistas de receptores activados dos proliferadores de peroxisomas (PPARs) (260), que regulam os genes da inflamação e de alguns passos do metabolismo lipídico. Apesar de todas estas evidências bioquímicas, serão necessários mais estudos.

Foram estudados, desde há vários anos, os lípidos na EM para tentar determinar o seu papel nos anticorpos antimielina. Os glicoesfingolípido têm papel importante nas patologias neurológicas (261), assim como os mais recentes cerebrosídeos acetilados, (262) e anticorpos monoclonais que promovem remielinização e saem do âmbito deste trabalho.

Capítulo 4

Fundamentos e Objectivos de Estudo

Das revisões atrás efectuadas, poderemos aqui fazer uma breve síntese e comentário crítico, fundamentando os objectivos do nosso trabalho.

A EM é uma entidade patológica e clínica heterogénea. É sobretudo modulada por linfócitos T mas, para a sua patogénese contribuem variadamente outras células do sistema imunitário.

Desconhecem-se as causas da reactividade celular imunitária, sendo para alguns autores, possível que estas sejam secundárias a uma susceptibilidade ou disfunção metabólica.

Na sua forma ou estágio mais frequente de surto-remissão, há substancial evidência patológica e terapêutica para a importância da infiltração celular do SNC através da lesão da barreira hemato-encefálica.

Contudo, este panorama não é evidente numa fase secundária progressiva e nas formas primárias progressivas. Para estas formas ou estádios de evolução progressiva das incapacidades e não associadas a surtos, tem-se responsabilizado a persistência de um processo inflamatório crónico de disfunção da imunidade inata.

Nestas formas ou estádios predomina um processo neurodegenerativo.

Noutras doenças, tidas como primariamente neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e a de Parkinson, tem sido recentemente realçada a importância dos mecanismos inflamatórios para a sua patogénese. No entanto, hoje é aceite que o processo neurodegenerativo se inicia também nas fases mais precoces da EM com surto-remissão. Não estará também uma disfunção inflamatória implicada primariamente na sua génese e reactividade da imunidade adaptativa e exacerbações clínicas da doença? Havendo uma estreita interacção dos mecanismos imunitários com os metabólicos, não poderá existir uma alteração do metabolismo, associada a eventual susceptibilidade à doença? No fundo, o interferão β é uma citocina fisiológica libertada por expressão das células da imunidade inata e a sua administração

terapêutica tem um efeito acentuado na redução do número e severidade dos surtos na maioria dos doentes. O sucesso destas terapêuticas evidencia a importância dos mecanismos de imunidade inata na regulação das fases iniciais, e mecanismos auto-imunes da doença.

Por outro lado, a ineficácia do interferão β em controlar o processo neurodegenerativo realça a persistência e não resolução da disfunção inflamatória e eventualmente metabólica, associada à génese da doença. É o processo neurodegenerativo, e não os episódios de surtos clínicos, que tem sido recentemente sublinhado como o mais conotado com a progressão das incapacidades neurológicas, que é por isso pouco afectado pelas terapêuticas actuais.

Entre as alterações metabólicas, associadas ao processo inflamatório, realçamos as relacionadas com o metabolismo do colesterol, lipídico e lipoproteico. Estas estão largamente documentadas na aterosclerose e doença vascular isquémica.

Contudo, mais importante do que isso para a nossa temática, existe crescente evidência para um papel crucial desse metabolismo na regulação em geral das respostas imunitárias e, em particular, de uma sua alteração poder ser o factor de susceptibilidade ao desenvolvimento da EM.

Perante este “estado da arte”, com o nosso trabalho pretendemos contribuir para o esclarecimento do papel do metabolismo lipoproteico, nos processos inflamatórios da EM.

Para o efeito, utilizamos essencialmente duas estratégias. Por um lado, a análise dos doentes clinicamente estacionários e, previamente a qualquer terapêutica imunomoduladora, comparativamente a sujeitos controle, clinicamente normais e de idade não significativamente diferente. Por outro lado, a análise dos parâmetros inflamatórios e lipoproteicos nos doentes, antes da terapêutica com interferão β , e comparativamente com a sua análise nos mesmos doentes após terem iniciado um tratamento. Para alguns marcadores, tivemos oportunidade de aprofundar o seu significado com a análise em contextos particulares, ou seja, sua relação com surtos clínicos, a severidade da progressão das incapacidades ou a presença de anticorpos neutralizantes da acção do interferão β (NAb's). Devido à frequência desta patologia no sexo feminino, as vantagens de uma homogeneidade da população em estudo e a influência de variáveis associadas ao sexo na patogenia da doença e nos marcadores

bioquímicos avaliados, o nosso trabalho reporta-se, quase exclusivamente, a doentes daquele sexo.

Uma particular atenção foi dada à presença de hábitos tabágicos devido à sua possível interferência no resultado das análises efectuadas e à sua recente implicação com o risco para o desenvolvimento e, possivelmente, progressão da própria EM.

Pelas razões expostas nos capítulos precedentes, este trabalho expõe os resultados das determinações analíticas bioquímicas de alguns parâmetros seleccionados e seu possível significado nos mecanismos da inflamação e no metabolismo lipoproteico.

Como marcadores de metabolismo inflamatório estudámos: fibrinogénio, ferritina, LDL oxidadas, ácido úrico, neopterinina, leptina e adiponectinas.

Para o estudo do metabolismo lipoproteico, determinaram-se a concentração de triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL, colesterol das partículas remanescentes, apoA-1, apoB, apoE e fenótipos da apoE.

Com a análise do fibrinogénio e ferritina pretendemos inquirir dois dos mecanismos actualmente mais invocados para a patogénese da doença mas de significado desconhecido para os mecanismos de acção do interferão β . Por um lado, a implicação da cascata da coagulação e fibrinólise, em particular, no processo lesional da barreira hematoencefálica. Por outro lado, a implicação do metabolismo do ferro e as suas relações com a actividade da heme oxigenase, sugerido por prévios trabalhos estar diferentemente alterada nas formas com surtos relativamente às formas primárias progressivas. Com o ácido úrico e LDL oxidada inquirimos o significado do stress oxidativo na sua patogénese e intervenção terapêutica.

A avaliação da LDL oxidada oferece-nos, para além disso, um elo elevado de reflexão sobre as relações do processo inflamatório com o metabolismo lipoproteico, a principal temática do nosso trabalho.

Estas relações são reguladas pela leptina e adiponectina. Publicações de outros autores têm implicado a leptina na génese da doença. Contudo, estes trabalhos não têm analisado, nestes doentes, as relações com o metabolismo lipoproteico e não são concludentes sobre o seu significado para os efeitos do interferão β . Neste trabalho, a análise da leptina foi efectuada para esclarecer esses aspectos,

concomitantemente com as determinações de neopterinina, tida como um marcador de resposta ao interferão β . Embora considerada de crescente relevância nestes processos inflamatórios crónicos, desconhece-se o eventual envolvimento da adiponectina na EM. A análise desta adipocina foi, por isso, efectuada em conjunto com o perfil lipoproteico, num estudo que efectuámos em doentes, previamente e após terapêutica com interferão β .

Este estudo inclui a análise do colesterol das partículas remanescentes, também nunca estudadas nesta patologia e cuja concentração será eventualmente regulada pela adiponectina.

No que respeita ao metabolismo lipoproteico, particular importância foi dada à inclusão do valor da apoE e do exame dos seus fenotipos dada a sua especial relevância para os processos neuroinflamatórios crónicos neurodegenerativos incluindo a EM.

No próximo capítulo, será descrita a metodologia utilizada neste trabalho. Na parte seguinte, os resultados obtidos e publicados serão apresentados e brevemente discutidos de seguida.

Subsequentemente e antecedendo uma conclusão geral, estes serão discutidos globalmente tendo em consideração os objectivos deste trabalho e a interrogação a que ela se propõe contribuir para responder: Que contributo poderá ter o metabolismo lipoproteico para o processo inflamatório sistémico de doentes com EM?

Estas determinações analíticas foram efectuadas no Departamento de Bioquímica da faculdade de Ciências Médicas de Lisboa. A presença de anticorpos neutralizantes do interferão β (NAb's) foi efectuada no Institute for Inflammation Research de Copenhaga, em trabalho de colaboração com o seu responsável Prof. K. Bendtzen.

No próximo capítulo descrevemos detalhadamente a metodologia utilizada neste trabalho.

PARTE II – MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo 1. Material

População

As investigações apresentadas nesta tese foram realizadas em doentes assistidos na Consulta e Esclerose Múltipla do Hospital dos Capuchos, pertencente ao Centro Hospitalar de Lisboa Central. Os doentes foram caracterizados clinicamente de acordo com o sexo, idade, início da doença e sua forma clínica (de surto-remissão, secundária progressiva ou primária progressiva), índice anual de surtos, grau de incapacidade (EDSS) e da sua severidade (MSSS). Foram anotadas as medicações em curso ou instituídas e os hábitos tabágicos. As determinações bioquímicas foram efectuadas em amostras de sangue por punção venosa do sangradouro, após 12 horas de jejum e, pelo menos, após um mês de eventual terapêutica com esteróides. Foram também estudados sujeitos controle clinicamente normais. Todos os doentes assinaram um consentimento informado e os estudos efectuados foram aprovados pela Comissão de Ética.

Capítulo 2. Métodos

Métodos Laboratoriais

Colesterol Total

Esta molécula foi doseada em soro por método colorimétrico enzimático num analisador automático de química clínica Roche / Hitachi 911, pelo método CHOD-PAP, a 37° C, usando 6 calibradores e, como soro controle, o fornecido pela entidade referida, o Precinorm/Precipath. O equipamento automático realiza uma curva de calibração de 6 pontos, a partir da qual são extrapolados os resultados do colesterol nas amostras.

O limiar de sensibilidade é de 3mg/dl e os valores de colesterol são validados conforme as indicações das normas internacionais para controle de valores de colesterol na população.

Triglicéridos

Foram determinados por um método colorimétrico enzimático, GPO-PAP, num analisador de química clínica Roche/Hitachi 911. O método baseia-se no trabalho de Wahlefeld utilizando uma lipase lipo-proteica de micro-organismos para a hidrólise rápida e completa de triglicéridos em glicerol, com oxidação subsequente para fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio gerado reage, então, com 4-aminofenazona e 4-clorofenol, sob a acção catalítica da peroxidase, e produz uma coloração vermelha (reacção de viragem segundo Trinder). Usa-se calibrador para curva a 2 pontos. O soro de controle Precinorm/ Precipath para controle de qualidade fornecido pela mesma casa comercial.

HDL colesterol

Foi determinado este analito por teste enzimático homogéneo, para amostras de soro e plasma, num analisador automático de química clínica Roche/Hitachi 911.

Usou-se um método colorimétrico enzimático homogéneo de determinação directa do colesterol HDL no soro e no plasma, utilizando enzimas modificadas por PEG (polietilenoglicol) e sulfato de dextrano. Quando modificadas por PEG, as enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase apresentam actividades catalíticas selectivas face às fracções de lipoproteínas. Este método foi padronizado com o método de referência indicado do CDC (método de comparação indicado). É feita uma calibração a 2 pontos e usado controle da casa comercial, (Roche) Precinorm e Precipath HDL/LDL-C. O intervalo de medição varia entre 3 e 120mg/dL. Os valores do plasma devem ser convertidos por um factor para serem equivalentes aos factores em soro.

Apo A-I

As determinações foram efectuadas por imunoturbidimetria, para determinação quantitativa em soro e plasma, num analisador automático Roche de química clínica.

Princípio do teste: os anticorpos anti-apolipoproteína A-I reagem com o antigénio na amostra e formam complexos antigénio/anticorpo. Estes, após a aglutinação, são determinados por turbidimetria.

É utilizado um calibrador padronizado para o material de referência IFCC SP-07, que é usado com diluição por NaCl a 0,9% para obter 5 padrões de concentrações conhecidas. O controle é feito com Precinorm L e Precipath L (Roche).

Os valores de referência são, para o sexo masculino, 104 a 202 mg/dL e, para o sexo feminino, de 108 a 225 mg/dL. O intervalo de medição situa-se entre 20 a 400 mg/dL.

Apo B

As determinações foram efectuadas por imunoturbidimetria, para determinação quantitativa em soro e plasma, num analisador automático Roche de química clínica.

Princípio do teste: os anticorpos anti-apolipoproteína B reagem com o antigénio na amostra e formam complexos antigénio/anticorpo. Estes, após a aglutinação, são determinados por turbidimetria.

É utilizado um calibrador padronizado para o material de referência IFCC SP-07, que é usado com diluição por NaCl a 0,9% para obter 5 padrões de concentrações conhecidas. O controle é feito com Precinorm L e Precipath L (Roche).

Os valores de referência são, para o sexo masculino 66 a 133 mg/dL e, para o sexo feminino, de 60 a 117 mg/dL. O intervalo de medição situa-se entre 20 a 400 mg/dL.

Ácido Úrico

Foi usado um teste enzimático para a determinação quantitativa do ácido úrico num analisador de química clínica da Roche.

Usou-se um teste colorimétrico enzimático, desenvolvido por Town, e modificado por Siedel. Baseia-se no desdobramento do ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogénio. Usou-se um padrão de acordo com as normas de química clínica e controlos Precinorm U e Precipath U, da firma Roche.

Os valores de referência são, para o sexo masculino, 3,4 a 7,0 mg/dL e, para o sexo feminino, de 2,4 a 5,7 mg/dl.

Leptina

Para a determinação desta citocina usa-se um método de radioimunoensaio, para a determinação em soro e plasma. O kit pertence à firma IBL Hamburg e é desenhado como ensaio homólogo, usando um Ac anti leptina humana altamente purificado. Os padrões e o marcador são preparados com leptina humana. Usa-se leptina marcada com Iodo ¹²⁵ (<3μCi), para o anticorpo.

Princípio do Procedimento

Neste Radioimunoensaio, uma concentração fixa de antigénio marcado é posta em incubação com uma diluição constante de anti-soro, de tal modo que, a concentração de epitopos do antigénio para ligação ao anticorpo é limitada, ou seja apenas 50% da concentração do tracer total se pode ligar ao anticorpo.

Se o antigénio não marcado se adicionar ao sistema, há competição entre o antigénio marcado e não marcado para um número constante de epitopos no anticorpo, logo, a quantidade de marcador ligado ao anticorpo diminui, enquanto a concentração de antigénio não marcado aumenta.

Faz-se a medição depois de separar o anticorpo ligado ao marcador livre e contar num contador gama. A separação é feita com reagente de precipitação, PEG (polietilenoglicol e soro cabra anti-coelho IgG com os solventes adequados).

Uma curva de calibração é estabelecida com padrões de leptina humana de quantidades crescentes, e o valor da concentração das amostras é calculada a partir dessa curva.

O limite de sensibilidade é de 0,5 ng/ ml, e o limite de linearidade é de 100 ng/ml.

Os valores de referência devem ser indexados ao índice de massa corporal (IMC), sendo para IMC de 18 a 25: Para o sexo masculino $3,8 \pm 1,8$ μg/L e para o sexo feminino $7,4 \pm 3,7$ μg/L.

Metaloproteinase 9

As determinações de MMP-9 foram efectuadas por método de enzimoimunoensaio, em kit da firma R&D. Usou-se uma técnica de ensaio imunoenzimático tipo “sandwich”, sendo um anticorpo monoclonal específico para MMP-9 que é imobilizado numa microplaca. Os standards e amostras são pipetados para os poços e o MMP-9 da amostra é capturado pelo Anticorpo imobilizado na placa. Depois de lavagem para eliminar substâncias estranhas, junta-se Ac específico policlonal ligado a enzima. Depois de nova lavagem, adiciona-se o substrato e desenvolve-se cor em proporção à quantidade de MMP-9. O desenvolvimento de cor é parado, e a intensidade de cor é medida. A sensibilidade é de 0,156 ng/ ml. A distribuição de valores tem um leque muito variado mas vão desde 169 a 705 ng/ml. O limite de detecção é de 0,156ng/ml.

Princípio do Procedimento

Usou-se como amostra soro ou plasma. Quando se usa plasma devemos ter o cuidado de que não haja contaminação com plaquetas que, por vezes, podem escapar a uma centrifugação pouco cuidada e a sua existência pode levar a resultados pouco reprodutíveis uma vez que as plaquetas activadas podem libertar MMP-9.

Preparação da amostra

As amostras de soro foram diluídas em Diluente Calibrador RD5-10 (10µl de amostra com 990µl de Diluente). As amostras de plasma foram diluídas no mesmo Diluente (10µl de amostra com 390µl de Diluente).

Nota: o trabalho foi efectuado com máscara facial e luvas para evitar contaminação da amostra.

Neopterin

Usou se um kit comercial da IBL Hamburg, para a determinação de neopterin no soro.

Princípio do Procedimento

É um ensaio imunoenzimático de fase sólida, baseado no princípio básico de uma ELISA competitiva. Uma quantidade desconhecida de antígeno na amostra e uma quantidade fixa de antígeno marcado com enzima competem com os epitópos de ligação do anticorpo (anti neopterin de coelho). Ambos os complexos antígenos-anticorpo ligam-se aos poços das microtiras revestidas com anticorpo de cabra anti-coelho. O antígeno não ligado é removido pela lavagem. A intensidade da cor desenvolvida depois da incubação com substrato é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra. Os resultados são extrapolados após leitura numa curva construída com standards.

No soro os valores deverão ser <2,5ng/mL.

Amostras

Usamos 10µl de calibradores, controles e amostras que foram pipetados directamente nos poços de microtiras revestidas com anticorpo.

1. Pipetaram-se de seguida 100µl de Conjugado enzimático, acabado de preparar em cada poço. Junta-se 50µl de anti-soro a cada poço. Tapou-se com folha adesiva preta e incubou, no escuro, num agitador horizontal a 500 rpm à temperatura ambiente durante 90 minutos;
2. De seguida destapa-se e efectua lavagem (3 vezes) com 250µl de tampão de lavagem;
3. Pipetam-se então 150µl de Solução Substrato, incubando 10 minutos à temperatura ambiente;
4. Obtém-se a paragem da reacção com Solução de Paragem (H₂SO₄) que se adiciona na quantidade de 150µl aos poços de reacção;
5. A densidade óptica é medida a 450nm dentro de 15 minutos e os valores são obtidos por extrapolação de curva obtida por computador.

LDL oxidada

Usou-se um kit comercial Mercodia, Oxidized LDL ELISA, de Suécia, sendo efectuada em soro.

Princípio do Procedimento

Usou-se um imunoensaio de ligação dupla de fase sólida em que dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra dois determinantes antigénicos separados na molécula de apolipoproteína B oxidada.

Durante a incubação, a LDL oxidada nas amostras reage com os anticorpos anti LDL oxidada ligada aos poços de microtitulação.

Depois de lavagem junta-se peroxidase conjugada com anticorpo anti apolipoproteína B que reconhece a apolipoproteína ligada à fase sólida.

Depois, faz-se uma nova incubação e junta-se substrato (TMB). A reacção é interrompida depois de adicionado um ácido. Usam-se 5 calibradores e controlos fornecidos pela casa comercial, o Mercodia Oxidized LDL kit.

Os valores de referência vão de 26 a 117 U/L (são usadas unidades arbitrárias relativas).

Lipoproteínas Remanescentes

Usou se um kit comercial para determinação das lipoproteínas remanescentes, RLP-Cholesterol (JIMRO) II, Japan.

Princípio do Procedimento

Baseia-se no uso de 2 anticorpos monoclonais (Mab) para isolar lipoproteínas remanescentes. O primeiro (JI-H) é dirigido contra a ApoB-100 humana e reconhece um epitopo perto da apoB-51 remove a LDL, Lp(a) e as VLDL nascentes. O segundo anticorpo (H-12) é dirigido contra a apo A-I, e remove o HDL. Os anticorpos monoclonais são conjugados a esferas de sepharose-4Be separam as lipoproteínas

ligadas das lipoproteínas remanescentes que ficam na fracção não ligada. O Colesterol na fracção não ligada é quantificado por ensaio imuno-enzimático. A fracção não ligada contém essencialmente CM remanescentes e VLDL remanescentes enriquecidas com esteres de colesterol e apo E. As lipoproteínas remanescentes isoladas por este ensaio migram na zona β ou pré β lenta em gel de agarose, enquanto as VLDL reconhecidas pelo anticorpo monoclonal JI-H tem motilidade pré.

Estas lipoproteínas remanescentes têm propriedades aterogénicas: são captadas pelos macrófagos e inibem o relaxamento vascular dependente do endotélio e o aumento da agregação plaquetária.

Amostras

1. Preparação do gel de imuno-separação, com agitação e 3 lavagens;
2. Preparação das soluções stock de colesterol com tampão RPL do kit;
3. Procedimento do ensaio enzimático, usando microesferas de aço, gel de imuno-separação e depois de agitação em Photal mixer, usa-se o sobrenadante para ser lido em ensaio enzimático num aparelho Hitachi de Química Clínica.

Os limites de detecção, percentil 75, são $<7,2\text{mg/dl}$, no sexo feminino e $<8,7\text{mg/dl}$ no sexo masculino, no estudo de Framingham, sendo a média de $6,8\pm 2,3\text{mg/dl}$ no sexo feminino e $8,0\pm 3,7\text{mg/dl}$ no sexo masculino.

ApoE

O doseamento foi efectuado em amostras de soro não congelado, e utiliza-se o kit comercial da SEBIA, HYDRAGEL LP E.

Este kit permite o doseamento da apoE total no soro humano por electroimunodifusão em meio moderadamente alcalino (pH 7,6). Os geles contêm um anticorpo monoespecífico anti-apoE. Após a migração, os picos obtidos são corados com violeta ácido. O excesso de corante é eliminado com uma solução ácida. As medidas dos picos corados, reportados a um soro padrão calibrado em apoE,

permitem o doseamento das partículas apoE. É feita uma curva de calibração com 4 pontos em cada placa e controle com soro padrão liofilizado, adquirido à parte (soro de controle SEBIA).

Os valores de referência são, para sexo masculino, entre 13 e 76 mg/l de apoE total e, para o sexo feminino, <ou = a 94 mg/l.

FENOTIPAGEM DA APOLIPOPROTEINA E

Objectivo da análise

O método analítico para isoformas desta apolipoproteína polimorfa pelo qual se obtém a fenotipagem baseia-se na diferença de carga das E2, E3, E4, codificadas por 3 alelos e2, e3, e4 do gene que se encontra no cromossoma 19, sendo separadas as moléculas por focagem isoelétrica em função do seu ponto isoelétrico

Produto a analisar

Plasma recolhido com EDTA

Colheita

Para evitar a peroxidação das lipoproteínas plasmáticas, o sangue é colhido para tubos contendo EDTA, que complexa os metais pesados, como o ferro e o cobre.

Preparação e conservação da amostra

Centrifugar 20 minutos a 4°C a 3500 r.p.m.

O plasma pode ser conservado até 72 horas a +4°C

Para conservações mais prolongadas, é necessário utilizar antiproteases como conservante.

Adicionar 14 µL de mistura de conservante por cada ml de plasma, (previamente preparada e conservada em aliquotas no congelador).

Separar em 3 aliquotas e conservar até 6 meses a -20°C ou a -80°C, para conservação mais prolongada.

Fundamento do Método

As isoformas da Apo E (E2, E3, E4) apresentam diferentes cargas, que são postas em evidência, quando são submetidas a focagem isoelétrica (IEF) que separa as moléculas em função do seu ponto isoelétrico. Sendo a Apo E uma glicoproteína das lipoproteínas plasmáticas, é necessário em primeiro lugar separar os lípidos das apolipoproteínas, utilizando Tween 20. Para facilitar a interpretação, devem pré tratar-se as amostras com neuraminidase.

Esquema da técnica:

- Pré tratamento das amostras
- Pré focalização, (para estabelecer o gradiente de pH)
- Focalização
- Transferência para nitrocelulose
- Saturação
- Revelação imunológica

Preparação do Gel de Agarose

Utilizando uma tira de Gel bond como suporte, preparar uma placa de 26 x 12.5 x 0.5 cm de gel, contendo

2.4 g de sorbitol, 0.4 g de agarose IEF, 16.6 mL de água destilada, 7.18 g de ureia, e 312.5 µl de Anfolinas 5 - 7 ; 4 - 6.5 e 4 - 6.

Colocar o gel a 4°C, durante pelo menos 3 noites

Após uma pré-focagem de 30 minutos a 1500 Volts, 3W, 50mA, aplicam-se 3.5 µl de amostras e controlos, previamente tratadas com Tween 20 a 5% e neuraminidase.

Iniciar a migração a + 12°C, 1500 Volts, 4W, 50 mA, durante 3 horas.

Transferir para uma tira de nitrocelulose com as dimensões do gel

Saturar em Albumina bovina 10 g/l.

Fixar o 1º Anticorpo (Ac. Anti Apo E) durante uma noite.

Após lavagem, mergulhar a nitrocelulose no 2º Anticorpo (anti-goat IgG peroxydase conjugate) durante 2 horas.

Lavar, e revelar com diaminobenzidina, em de tampão fosfato 10 X e H₂O₂ a 30%.

Em caso de dúvida, repetir ou fazer genotipagem.

Ferritina

O ensaio utilizado foi o da firma ABBOTT Diagnosticas Division com tecnologia CMIA (Chemoluminescent particules immunoassay)

O método utilizado é baseado na quimioluminescência de micropartículas, sendo um imunoensaio em 2 tempos, num analisador automático.

Num primeiro passo, a amostra desconhecida e as partículas paramagnéticas revestidas de anticorpo anti -eritinasão combinadas.

A ferritina na amostra liga-se às micropartículas revestidas de anticorpo anti ferritina

Depois da lavagem, é adicionado um conjugado acridinium, anti-ferritina, no passo seguinte da técnica.

São, a seguir, adicionadas as soluções pré Trigger (peróxido de hidrogénio) e Trigger (hidróxido de Na) à mistura anterior.

A reacção quimioluminescente que se produz é medida em unidades de Luz relativas RLUs. Existe uma relação directa entre a quantidade de ferritina na amostra e os RLUs detectados pelo sistema óptico do ARCHITEC, o analisador automático usado.

Os controlos e calibradores são os do fabricante mencionado e adequados ao analisador já referido.

O limite inferior de detecção é de 1 ng / ml e usaram-se os valores de referência do laboratório onde foi efectuado o ensaio.

Fibrinogénio

Esta determinação foi efectuada em amostras de plasma citratado, por método de coagulometria, em analisador automático ACL, da firma IL.

O fibrinogénio é determinado através de reagente, tromboplastina de cérebro de coelho, com concentração de iões de cálcio ideal de acordo com as normas de certificação de tromboplastina, as quais permitem um alto grau de sensibilidade e fiabilidade. São usados controle normal, controle anormal baixo, anormal alto e controle baixo.

Adiponectina

Esta molécula também chamada Acrp30, é uma hormona secretada pelos adipócitos tendo concentrações entre 0,5 a 30 µg/ml, sugerindo-se que existam diversas formas em circulação, monómeros, formas globulares etc.

No entanto, pensa-se que as formas mais comuns existentes são estruturas multiméricas.

Foi usado para estas determinações um kit comercial, Mercodia Adiponectina ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden.

Este kit é um imunoensaio de fase sólida, em que dois anticorpos monoclonais são dirigidos para determinantes antigénicas separadas da molécula de adiponectina.

Durante a incubação, a adiponectina na amostra reage com os anticorpos anti-adiponectina ligados aos poços de microtitulação.

Princípio do Procedimento

Após a lavagem, junta-se um conjugado de peroxidase anti-anticorpos contra adiponectina. Depois da segunda incubação e lavagem, o conjugado ligado é detectado por solução de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina).

A reacção é parada com ácido clorídrico, sendo lida em espectrofotómetro como reacção colorimétrica de ponto final.

Dada a existência de várias formas em circulação, como já foi referido antes, o método referencia três formas multiméricas dominantes como sendo as que são detectadas pelo método e que dão os valores referidos. Estas conclusões basearam-se em características como, dimensões, ponto isoeléctrico e carga, apresentados pelas diversas formas multiméricas. O limite de detecção é de 1,25 ng/ml.

Os valores considerados de referência são entre 5 e 30 μ /ml, no laboratório do Departamento de Bioquímica, uma vez que cada um deve estabelecer os próprios.

Anticorpos Neutralizantes (Nab's)

Para a execução desta técnica, realizada no Laboratório do Institute for Inflammation Research, Prof Klaus Bendtzen, apresentamos um breve resumo.

São semeadas células MC-5, um subclone de células A549, em microplacas, numa concentração de 10 000 por poço e incubadas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Interferão β foi adicionado com 10LU/mL, correspondendo a 3 IU IFN-beta /mL (1 LU representa a quantidade de interferão induzindo 50% de protecção contra infecção viral).

As preparações de interferão β foram pré-incubadas, durante uma hora, com soro diluído do paciente a 5%, num volume de 100 μ l e depois transferido para as células MC-5. Depois de 24 horas, o efeito antiviral do interferão foi medido usando

azul de tetrazolium. Para evitar falsos positivos e falsos negativos, foi incluído em cada análise, um controle para actividade antiviral endógena e toxicidade sérica.

Foi medida a capacidade de neutralização (a percentagem de interferão adicionado que foi neutralizada pelo Nab) em cada amostra.

Métodos Estatísticos

Foi realizado o estudo descritivo de todas as variáveis contínuas, incluindo médias (desvios padrão) ou medianas (distância interquartil), e frequências relativas e absolutas para as variáveis qualitativas. Para a comparação de valores médios entre os grupos, foi usado o T-Teste para amostras com distribuição normal. Para a análise de variância, foram utilizados o teste ANOVA ou o teste de Bonferroni / Dunn para amostras em distribuição normal, o teste Wilcoxon para amostras com distribuição não-normal. Para análise de valores emparelhados, foram utilizados o T-Teste ou o teste de Kruskal-Wallis, para amostras de distribuição normal ou não, respectivamente.

Para análise de variáveis qualitativas, foram utilizados o teste qui-quadrado ou o teste de Fischer.

Modelos de regressão logística univariados foram usados para estudar associações entre variáveis qualitativas e contínuas em variáveis resposta binárias. Modelos de regressão logística multivariados foram usados para ajustar essas mesmas análises com potenciais confundidores. Odds ratios (OR) foram calculados para estes modelos logísticos. Para todas as análises foi assumido um intervalo confiança de 95% e um nível de significância de 5%

PARTE III – RESULTADOS

Nesta secção são apresentados os resultados dos estudos efectuados e suas conclusões após breve introdução. A sua discussão será integrada numa perspectiva de conjunto dos trabalhos realizados, na próxima parte desta tese.

ESTUDO 1. E1

O fibrinogénio plasmático em doentes com esclerose múltipla após terapêutica com interferão β . Multiple Sclerosis 2004; 10; P562 (Abstract)

Breve Introdução

Foram estudados 50 sujeitos do sexo feminino com EM, em fase de surto-remissão ou secundária progressiva, e 49 sujeitos controle do mesmo sexo e grupo etário. Foram determinados os valores de fibrinogénio no plasma, antes, 6 e 12 meses depois, da terapêutica com interferão. Os doentes foram tratados com Rebif (24), Avonex (15), e Betaferon (11).

Resultados

Os valores de fibrinogénio aumentaram significativamente aos 6 meses de tratamento (390 ± 111 mg/dL) e, ao fim de um ano (374 ± 84 mg/dL) depois do início do tratamento, em comparação com os valores basais ($345 \pm 88,4$) e com os controlos normais ($310,9 \pm 120,3$) Tabela 1.

Um aumento significativo do fibrinogénio plasmático foi encontrado como resposta à terapêutica com Rebif, aos 6 e 12 meses em comparação com os valores pré tratamento.

Tabela 1 Níveis de fibrinogénio no plasma de mulheres com Esclerose Múltipla, antes e após terapêutica com β interferão, e nos controlos

	Idade	Baseline	6 meses	12 meses
Controlos <i>n</i> = 49	42,18 ±15,1	310,9 ± 120,3	—	—
Pacientes (EM) <i>n</i> = 50	39,22 ± 11,2	345,4 ± 88,4	390,2 ^{a) c)} ± 111,2	374,0 ^{b) d)} ± 88,4

As concentrações de fibrinogénio encontram-se em mg/dl (valores da média e desvio padrão)

a) $p = 0,0010$

b) $p = 0,0032$: pacientes vs controlos

c) $p = 0,0009$: pacientes aos 6 meses vs baseline

d) $p = 0,0200$: pacientes aos 12 meses vs baseline

Tabela 2 Níveis de fibrinogénio no plasma de mulheres com Esclerose Múltipla antes e após terapêutica com β interferão 1a (Rebif e Avonex) e Interferão 1b (Betaferon)

	Baseline	6 meses	12 meses
Rebif <i>n</i> = 24	333,8 ± 69,6	389,6 ^{a)} ± 116,4	366,7 ^{b)} ± 83,4
Avonex <i>n</i> = 15	338,7 ± 113,0	356,0 ± 82,5	353,3 ± 89,6
Betaferon <i>n</i> = 11	380,0 ± 87,2	438,2 ± 124,7	418,2 ± 68,2

As concentrações de fibrinogénio encontram-se em mg/dl (valores da média e desvio padrão)

a) $p = 0,0081$: 6 meses vs Baseline

b) $p = 0,042$: 12 meses vs Baseline

Conclusão

Os resultados sugerem que o tratamento com interferão β pode aumentar o fibrinogénio plasmático em doentes com EM. Vários trabalhos demonstram evidência experimental do elo entre o fibrinogénio e a imunidade celular.(263). O fibrinogénio induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias(264), enquanto vários estímulos inflamatórios podem aumentar o fibrinogénio. Podemos, por isso, pôr a hipótese de que o aumento dos níveis de fibrinogénio, pós tratamento com interferão β , poderá estar relacionado com alguns efeitos pró-inflamatórios do medicamento. Por outro

lado, a permeabilidade aumentada da barreira hematoencefálica na EM poderá estar relacionada com a saída de fibrinogénio(265). O tratamento com interferão tem demonstrado melhorar a continuidade da barreira hematoencefálica, através do seu efeito nas junções celulares. (265). Será portanto, licito sugerir que o aumento do fibrinogénio plasmático com a terapêutica com interferão β poderá estar relacionado com os efeitos benéficos do tratamento esta citocina.

ESTUDO 2. E2

A LDL oxidada no soro de doentes com esclerose múltipla de surto-remissão Multiple Sclerosis 2006:12;S1-S228 P 601 (Abstract)

Breve Introdução

O estudo foi realizado em 25 doentes em surto-remissão e com uma população controle de 15 indivíduos. As LDL oxidadas foram determinadas, antes (remissão), e 6 meses depois do início do tratamento com interferão β (n=12) e acetato de glatirâmero (n=5). Em 8 doentes, as LDL oxidadas foram determinadas em remissão e em fase de surto clínico, antes da terapêutica com esteróides.

Resultados

Os doentes de EM não tratados tinham valores de LDL oxidadas mais altos do que os controlos. Estes níveis foram normalizados com os tratamentos de imunomodulação Tabela 1.

Antes do tratamento, uma tendência para valores mais altos foi encontrada nos fumadores (82 ± 17 U/L), em comparação com os não fumadores ($64,17 \pm 15,84$ U/L) ($p= 0,06$). Os valores de LDL oxidadas desceram em todos os doentes, menos em 3, dos quais um fumador, após 6 meses de tratamento.

O nível de LDL oxidadas era mais elevado (30%) durante os surtos (figura 1), do que em fase de remissão. Não se encontraram associações entre as LDL oxidadas e outros parâmetros clínicos, incluindo a idade de início da doença, duração, número de surtos, EDSS, MSSS, e uso de contraceptivos orais.

Tabela 1 Níveis de LDL Oxidada no soro de doentes de EM antes e após 6 meses de terapia imunomoduladora.

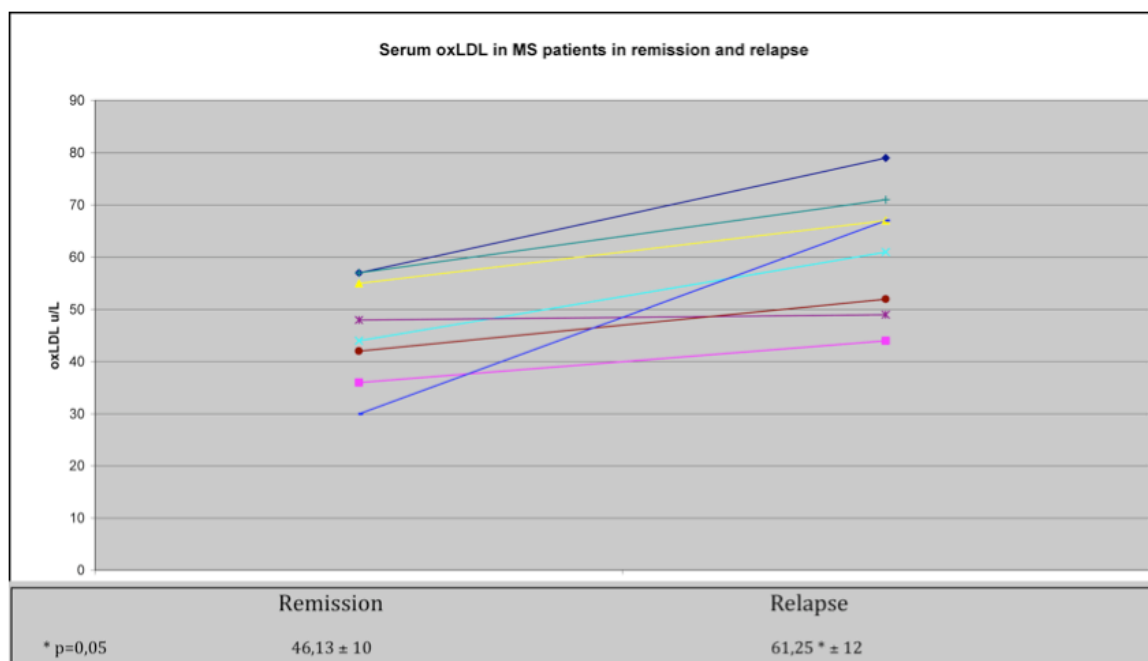
	Idade	F/M	Fumadores
Controlos	39.6 ± 9.03	13/2	20%
Pacientes (EM)	35.0 ± 8.05	17/0	29%
	Controlos	Antes da Terapêutica	Após a Terapêutica
OxLDL (U/L)	54.4 ± 15.86	69.41 ± 17.75*	56.06 ± 22.55**

Valores de médias e desvio padrão

*p = 0.0182, pacientes vs controlos

**p = 0.0078, antes da terapêutica vs após terapêutica

Figura 1- Valores de LDL oxidadas em doentes de EM, em surto e remissão



Conclusões

Este estudo confirma o papel do stress oxidativo na patogenia da EM(266), (267). Os nossos resultados são compatíveis com aumento das espécies reactivas de oxigénio nos doentes em remissão, ainda aumentados nos períodos de surto, indicando uma associação entre os níveis das LDL oxidadas e a actividade clínica da doença. Estes estudos são compatíveis com os observados no tecido cerebral dos pacientes de EM,(254) que implicam estas lipoproteínas na evolução da lesão e reparação celular.(150). As LDL oxidadas induzem a formação de radicais livres de

oxigénio, formação e activação de quimiocinas, podem aumentar a permeabilidade da barreira hemtoencefálica.(266, 268). Sendo assim, as LDL oxidadas poderão promover a invasão neuroinflamatória, contudo, a sua captação por macrófagos nas lesões poderá induzir a expressão de moléculas antiinflamatórias(254).

O interferão β diminui a produção de espécies reactivas de oxigénio pelos monocitos da circulação periférica(269), enquanto o acetato de glatirâmero aumenta o nível de ácido úrico no plasma dos doentes com EM(270). A redução de LDL oxidadas por estes agentes, observada nos doentes, poderá contribuir para os efeitos benéficos destes tratamentos. Por outro lado, estes resultados sugerem que os mecanismos destinados a aumentarem os níveis de antioxidantes e diminuírem os níveis de LDLoxidadas poderão ter um efeito terapêutico benéfico nestes doentes. O tratamento com estatinas diminui as LDL oxidadas, os radicais livres de oxigénio, existindo evidência preliminar do seu uso benéfico na EM.(271, 272)

ESTUDO 3. E3

O interferão β aumenta os níveis de ferritina sérica em doentes com esclerose múltipla

Journal of Neurology 2007 :254 () ; P 652 (Abstract)

Multiple Sclerosis 2008: 14; 857-59

Breve Introdução

Foram determinados níveis de ferritina sérica em doentes de surto-remissão, 37 do sexo feminino e 16 do sexo masculino e em 38 sujeitos controle, 28 do sexo feminino e 10 do sexo masculino. Foram executadas determinações analíticas em doentes clinicamente estáveis, antes, e após 12 meses de terapêutica com interferão. Na terapêutica usou-se: Betaferon n= 24, Rebif n= 17, Avonex n=12. Determinaram-se igualmente as concentrações da hemoglobina e da bilirrubina total, testes de função tiroideia e hepática.

Resultados

Como assinalado na tabela, as concentrações de ferritina, hemoglobina e bilirrubina não foram significativamente diferentes em comparação com os encontrados na população controle estudada. Nos doentes e nos controlos normais, os níveis médios de ferritina eram mais altos no sexo masculino do que no sexo feminino, uma condição fisiológica já conhecida ($P < 0,0001$).

Nos doentes, após 1 ano de tratamento com interferão, os níveis de ferritina eram significativamente mais altos no sexo feminino e no sexo masculino, em comparação com a linha de base ($71,4 \pm 58,6$ em comparação com $43,4 \pm 29,9$ ng/mL, $P = 0,0006$ e $216,0 \pm 124,3$ em comparação com $127,8 \pm 74,9$ ng/mL, $P = 0,0022$, respectivamente). Os resultados foram similares para as várias formas de interferão utilizadas. O uso de contraceptivos orais e tabagismo não foram associados aos níveis de ferritina nos doentes e nos sujeitos controle.

Tabela 1 Níveis de ferritina, hemoglobina e bilirrubina no soro e dados clínicos de pacientes de EM, antes da terapêutica com interferão e 12 meses após o seu início.

Indivíduos	Ferritina (ng/mL)	Hemoglobina (g/dL)	Bilirrubina (mg/dl)	Idade	EDSS	Anual relapse rate
MULHERES						
Controlos n=28	41.7 ± 25.8	13.1 ± 0.7	0.5 ± 0.2	34.5 ± 12.3	--	--
Pacientes						
Baseline n=37	43.4 ± 29.9	13.3 ± 0.8	0.6 ± 0.2	34.5 ± 11.0	1.52 ± 1.0	0.9 ± 0.5
12 meses n=37	71.4 ± 58.6*	13.1 ± 0.9	0.6 ± 0.2	--	1.6 ± 1.1	0.4 ± 0.6
HOMENS						
Controlos n=10	132.4 ± 96.8	14.9 ± 0.9	0.9 ± 0.3	32.0 ± 4.1	--	--
Pacientes						
Baseline n=16	127.8 ± 74.9	14.9 ± 0.9	0.8 ± 0.2	30.8 ± 6.7	1.8 ± 1.3	1.0 ± 0.4
12 meses n=16	216.0 ± 124.3 **	14.6 ± 0.8	0.8 ± 0.4	--	1.7 ± 1.2	0.6 ± 1.1

Valores das médias e desvio padrão
EDSS, *Expanded Disability Satuts Scale*

*P =0.0006

**P =0.0022, em comparação com a baseline

Conclusões

A expressão de ferritina é supra-regulada, entre outros factores, pelo ferro, oxidantes, hipoxia e algumas citocinas, tendo um papel importante como molécula na lesão inflamatória e como antioxidante,(273). Como tal, será lógico pôr a hipótese de que a indução dos níveis de ferritina pelo interferão β possa estar associada à redução do perfil de oxidação e inflamação que se observa no decorrer do tratamento.

Embora a activação da heme-oxigenase-1 (HO-1) seja um mediador da indução de ferritina os estudos inflamatórios (273), o facto dos níveis de hemoglobina e bilirrubina não serem alterados não suporta o seu envolvimento naquela indução pelo interferão β . De facto, este contraria activação da HO-1 pelos estímulos inflamatórios(274).

Os resultados apresentados estão de acordo com uma possível interacção do interferão β com a homeostase do ferro sérico. Pensa-se que a ferritina protege contra o stress oxidativo nos processos inflamatórios por sequestrar o ferro, o qual é tóxico

no estado livre ou com ligações de fraca intensidade (273, 275). Em experiências animais, a administração de quelantes de ferro reduziu a inflamação em 3 modelos de esclerose múltipla.(70). Daí concluir-se que mais trabalhos serão necessários, para saber se a ferritina, supra-regulada pela administração de interferão, reflecte um aumento do turnover do ferro ou um aumento da ferritina sintetizada “de novo” no estado de apoferritina. É interessante notar que, nos pacientes com hepatite C crónica, a resposta ao interferão é menos favorável e é acompanhada por valores de base de ferritina mais elevados.(276).

Em conclusão, o estudo apresentado indica que a terapêutica com interferão aumenta os níveis séricos de ferritina nos doentes com EM. Mais estudos são necessários para avaliar o papel da ferritina na EM e o seu interesse na monitorização das terapêuticas imunomodulatórias, não esquecendo o papel fundamental do ferro e da ferritina no metabolismo da inflamação.

ESTUDO 4. E4

O metabolismo das lipoproteínas remanescentes e adiponectina está alterado em doentes com esclerose múltipla de surto-remissão.

Multiple Sclerosis, 2009: 15 ;P 674 (Abstract)

Breve Introdução

A população estudada neste trabalho consistiu em 35 doentes do sexo feminino ($31,8 \pm 9,7$ anos de idade) em remissão e 40 pessoas do sexo feminino, como controlos normais ($34,8 \pm 8,6$ anos de idade). Em 21 doentes foram determinados vários parâmetros do metabolismo lipídico, antes do tratamento, e 12 meses depois do interferão $\beta 1b$. Foram determinados em todos o índice de massa corporal, relação cintura-anca, hábitos tabágico e uso de pílula anticoncepcional. Os parâmetros determinados foram colesterol-RPL, colesterol total, triglicéridos, LDL, HDL e adiponectina.

Resultados

As características clínicas e demográficas são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 características demográficas e clínicas dos controlos e das doentes de surto-remissão

	Idade	BMI	Contracep.Orais	Fumadoras
Controlos n=40	34,8±8,6	23,3±3,5	16(40)	10(28)
Pacientes n=37	31,8 ± 9,7	22,7±3,6	13(37)	6(15)

Valores de médias e desvio-padrão

Os valores de colesterol-RPL e adiponectina das doentes eram mais altos, comparativamente aos valores dos controlos ($8,3 \pm 6,5$ mg/dL versus $5,2 \pm 1,3$ mg/dL, $p= 0,001$ para as remanescentes e $11.1 \pm 5,3$ mg/L, versus $7,7 \pm 2,1$ mg/L, $p= 0,001$, respectivamente). ver Tabela 2

O tratamento com interferão β diminuiu os valores de lipoproteínas remanescentes em relação ao valor basal, o qual de $7,8 \pm 5,6$ mg/dL, passou a ter o valor de $5,3 \pm 2,0$ mg/dL, $p < 0,001$. Os valores de adiponectina não sofreram alterações significativas (Tabela 3) com o tratamento.

Em relação a outras variáveis, podemos ver que as HDL diminuíram também pós-tratamento ($62,3 \pm 18,0$ mg/dl, versus $55,1 \pm 17,0$ mg/dl), $p < 0,001$. Os níveis de triglicéridos, ao contrário, aumentaram ($86,9 \pm 43,6$ mg/dl versus $113,1 \pm 43,9$ mg/dl pós-tratamento com interferão, $p= 0,002$), o que está de acordo com o que foi referido atrás, no capítulo de lipoproteínas, em que, devido ao catabolismo da apoA1 e actividade do CETP aumentada, quando aumentam os triglicéridos, existe uma diminuição das HDL.

Tabela 2 níveis de lípidos plasmáticos e adiponectina em controlos e doentes de surto-remissão sem tratamento

	Controlos n=40	Pacientes n=35
Triglicéridos mg/dL	$81,3 \pm 34,8$	$93,5 \pm 49,2$
Colesterol Total mg/dL	$188,6 \pm 39,3$	$197,6 \pm 39,9$
LDL-Colesterol mg/dL	$117,6 \pm 36,3$	$120,5 \pm 36,7$
HDL Colesterol mg/dL	$54,7 \pm 13,2$	$59,2 \pm 16,1$
RLP Colesterol mg/dL	$5,2 \pm 3,7$	$8,3 \pm 6,5^*$
Adiponectina mg/dL	$7,7 \pm 2,1$	$11,1 \pm 5,3^*$

* $p= 0,001$ (valores de médias e desvio padrão)

Tabela 3 níveis de lípidos plasmáticos e adiponectina em controlos e doentes de surto-remissão antes e 12 meses depois do tratamento com interferão β

	Pré-tratamento n=21	Pós interferão n=21
Triglicéridos mg/dL	86,9 \pm 34,6	113,9 \pm 43,1 *
Colesterol Total mg/dL	197,5 \pm 41,4	185,7 \pm 44,3
LDL-Colesterol mg/dL	117,6 \pm 35,6	109,6 \pm 33,6
HDL Colesterol mg/dL	62,3 \pm 18,0	55,1 \pm 17,0 **
RLP Colesterol mg/dL	7,8 \pm 5,6	5,3 \pm 2,0 **
Adiponectina mg/dL	8,9 \pm 3,4	9,0 \pm 2,4

*p= 0,002 (valores de médias e desvio padrão); **p< 0,001

Conclusões

Estes resultados sugerem que a EM de surto-remissão está associada a um metabolismo anormal das lipoproteínas remanescentes e da adiponectina. O aumento do colesterol das remanescentes poderá estar relacionado com a promoção da actividade inflamatória (277) (135). A sua redução com a administração de interferão pode relacionar-se com o benefício da terapêutica. A adiponectina tem um papel anti-inflamatório com níveis plasmáticos elevados em muitas situações inflamatórias (99) (103), podendo significar uma forma de contrariar a acção das citocinas pró-inflamatórias.(99).

O envolvimento desta adipocina na regulação do metabolismo lipoproteico, incluindo das remanescentes (101), é consistente com esta interpretação e sugere a persistência de uma alteração deste metabolismo com a terapêutica.

Na verdade, esta induz também uma alteração do perfil lipoproteico (aumento dos triglicéridos e redução das HDL) típico da resposta de fase aguda.

ESTUDO 5. E5

O polimorfismo da apoE interage com o hábito tabágico na progressão da esclerose múltipla

Multiple Sclerosis 2005 : S138 ; P 533 (Abstract)

European Journal Neurology 2009, 16: 832-837

Breve Introdução

Neste trabalho, foi usada uma população de 205 doentes com diagnóstico de EM de acordo com os critérios de MacDonald revistos. Foram escolhidos doentes com pelo menos 1 ano de evolução da doença, entre os 15 e 62 anos, sendo os dados recolhidos antes de qualquer terapêutica imunomodulatória ou imunossupressora. O grau de incapacidade e progressão clínica da doença foram avaliados com as duas escalas, já explicadas atrás, na primeira parte, que são a EDSS e a MSSS. O questionário sobre hábitos tabágicos considerou como fumadores todos os que fumavam mais de 5 cigarros/dia.

Resultados

As variáveis clínicas e demográficas nos diferentes subgrupos de apoE, de todas as doentes estão comparadas na tabela 1

Tabela 1 Características clínicas e demográficas de doentes de acordo com os polimorfismos da ApoE

	Total (n = 202)	E3/E3 (n = 157)	E3/E4 (n = 26)	E4 versus E3 (P-valor)	E2/E3 (n = 19)	E2 versus E3 (P-valor)
Idade	38.69 ± 10.35	38.98 ± 10.26	38.42 ± 10.9	0.802	36.68 ± 10.65	0.363
Idade – início dos primeiros sintomas	31.95 ± 9.59	32.08 ± 9.41	32.12 ± 10.11	0.990	30.63 ± 9.92	0.528
Duração da doença em anos ^a	5.0 (2.0-10.0)	5.0 (2.0-10.0)	5.0 (2.0-9.0)	0.927	3.0 (2.0-8.25)	0.368
Surtos Anuais	0.87 ± 0.62	0.88 ± 0.64	0.88 ± 0.59	0.980	0.79 ± 0.54	0.547
EDSS	2.57 ± 1.57	2.61 ± 1.61	2.75 ± 1.47	0.666	2.08 ± 1.35	0.164
MSSS	4.24 ± 2.49	4.24 ± 2.50	4.59 ± 2.19	0.530	3.77 ± 2.85	0.423
Curso da Doença, n (%)						
RRMS	161 (79.7)	122 (77.7)	21 (80.7)		18 (94.7)	
SPMS	22 (11.1)	19 (12.1)	3 (11.5)	0.916	0	0.187
PPMS	19 (9.4)	16 (10.2)	2 (7.7)		1 (5.2)	
Fumadores, n (%)	72 (35.6)	51 (32.5)	11 (42.3)		10 (52.6)	
Fumadores desde que idade	17.29 ± 3.74	17.25 ± 3.83	16.64 ± 2.25	0.623	18.2 ± 4.71	0.471
Fumadores há quantos anos	20.93 ± 8.76	21.78 ± 9.49	19.91 ± 5.84	0.521	17.7 ± 7.07	0.182

Salvo indicação em contrário, os valores são expressos como média ± desvio padrão. Grupos comparados através da análise da variância e do teste Bonferroni/Dunn. A proporção das formas da doença foram comparados através de χ^2 . EDSS (Expanded Disability Status Scale): MSSS, Grau de Severidade da Esclerose Múltipla: RRMS- Surto-remissão, SPMS-secundária Progressiva, PPMS-primária progressiva. ^a expresso como mediana (percentil 25-75) ; p calculado com base em transformações logarítmicas dos dados

Encontrou-se a seguinte distribuição de fenótipos E3/E3 (76,6%), E4/E3 (12,7%) e E2/E3 (9,3%). Três doentes com fenótipo E2/E4 foram excluídos da análise. Não se encontraram homozigotos para E2 ou E4. As frequências foram as encontradas na população de Portugal e nos países do Sul da Europa(278).

Não se observam diferenças clínicas associadas a polimorfismo da apoE.

A idade de início do hábito tabágico e o número de anos desse consumo eram semelhantes nos três subgrupos genéticos.

Tabela 2 Características Clínicas nos alelos dos da ApoE estratificados de acordo com a condição ou não de fumadores

	<i>IDADE</i>	<i>IDADE</i> início dos primeiros sintomas <i>ONSET</i>	<i>DURAÇÃO DA DOENÇA</i>	<i>ANNUAL RELAPSE RATE</i>	<i>EDSS</i>	<i>MSSS</i>
TOTAL						
NS (130)	38.95 ± 11.31	31.74 ± 10.08	5.0 (2.0-10.0)	0.84 ± 0.68	2.72 ± 1.60	4.38 ± 2.51
SM (72)	38.2 ± 8.5	32.35 ± 8.76	4.0 (2.0-8.5)	0.92 ± 0.50	2.31 ± 1.50	4.03 ± 2.44
P valor	0.636	0.666	0.274	0.390	0.075	0.335
E3/E3						
NS (106)	38.94 ± 10.93	31.47 ± 9.93	5 (2.0-10.0)	0.85 ± 0.69	2.69 ± 1.57	4.27 ± 2.49
SM (51)	39.04 ± 8.96	33.37 ± 8.29	3.0 (2.0-7.75)	0.95 ± 0.52	2.46 ± 1.67	4.23 ± 2.52
P valor	0.956	0.238	0.180	0.344	0.403	0.917
E4/E3						
NS (15)	39.8 ± 13	34.07 ± 11.43	5.0 (2.25-5.75)	0.87 ± 0.69	3.27 ± 1.68	5.40 ± 2.22
SM (11)	36.5 ± 7.35	29.45 ± 9.37	6.0 (2.0-11.75)	0.91 ± 0.44	2.05 ± 0.72	3.47 ± 1.66
P valor	0.463	0.284	0.830	0.860	0.033	0.023
E2/E3						
NS (9)	37.56 ± 13.93	31.0 ± 10.17	3.0 (1.0-10.25)	0.78 ± 0.62	2.33 ± 1.66	3.94 ± 3.05
SM (10)	35.9 ± 7.28	30.3 ± 10.22	3.5 (2.0-6.0)	0.80 ± 0.48	1.85 ± 1.03	3.61 ± 2.81
P valor	0.745	0.883	0.794	0.931	0.450	0.808

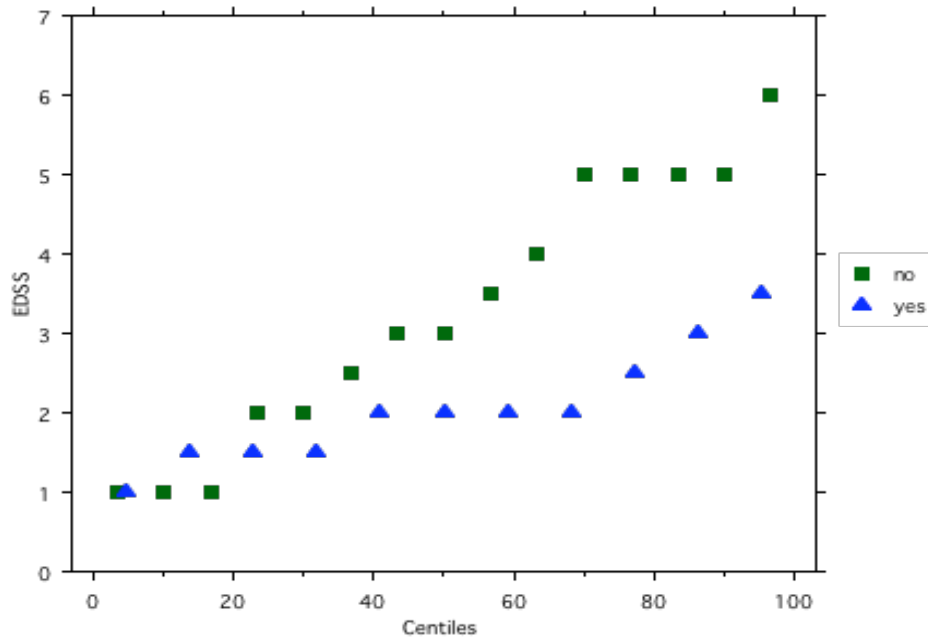
Salvo indicação em contrário, os valores são expressos como média ± SD. Os Grupos NS (não fumadores) vs SM (Fumadores) comparados através da análise da variância e do teste Bonferroni/Dunn. EDSS (Expanded Disability Status Scale) MSSS Grau de Severidade da Esclerose Múltipla. ^a expresso como mediana (percentile 25-75) ; p calculado com base em transformações logarítmicas dos dados

Os doentes foram então estratificados de acordo com os hábitos tabágicos como se pode ver na Tabela 2.

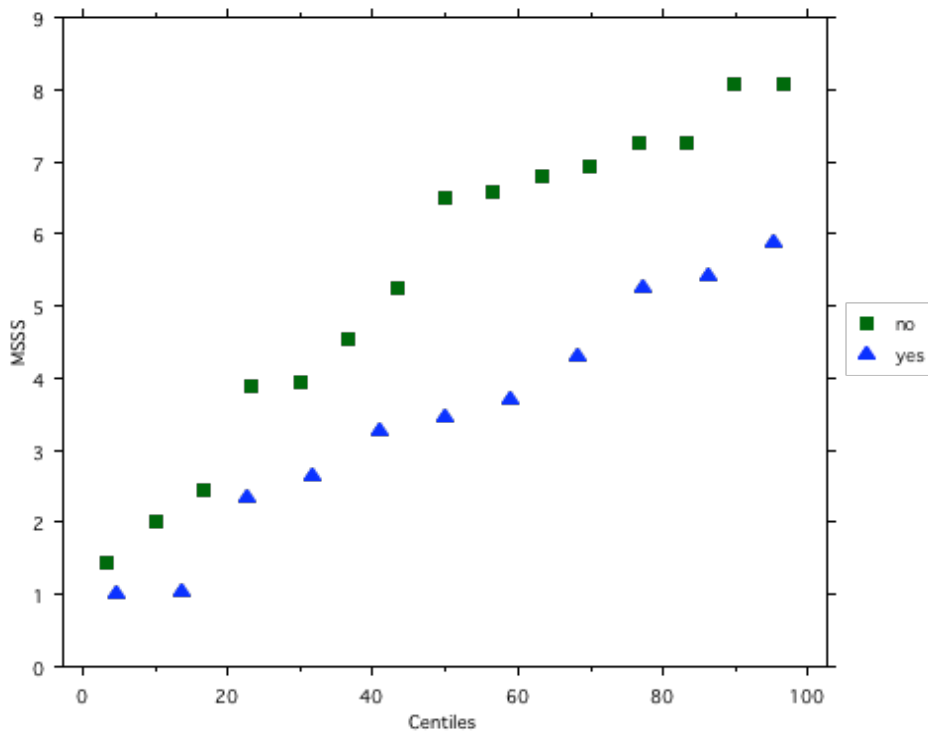
Não foram encontradas diferenças clínicas significativas entre fumadores e não fumadores e naqueles com o fenotipo E3 / E3 e E2 / E3.

Nos doentes com a isoforma E4, os fumadores tinham um EDSS mais baixo (p = 0,033) e um MSSS mais baixo (p = 0,023), em comparação com os não fumadores. Nestes indivíduos, em metade dos não fumadores, encontrou-se um valor de EDSS e MSSS acima de 3,5 e 6, respectivamente, e nenhum dos fumadores estava acima desses limiares. Figura 1.

GráficoA



GráficoB



Valores de percentil na escala EDSS(a) e MSSS(b) nos não fumadores (quadrados) e fumadores (triângulos) dos doentes portadores do alelo ApoE4

Conclusões

De acordo com outros estudos já existentes, não encontramos diferenças clínicas significativas associadas a alelos de apoE (279). Estudos anteriores, de duração inferior a 5 anos, mostraram efeitos deletérios do alelo E4 na integridade estrutural do cérebro(242). No entanto, não houve alterações clínicas significativas ligadas a este facto. Os restantes estudos, de uma forma geral, não relacionaram o alelo E4 com os hábitos tabágicos. O nosso estudo põe a hipótese de o facto de o doente ser fumador poder influenciar o impacto deste alelo na progressão clínica da doença na fase inicial.

O facto de se observar um grau de progressão mais baixo (MSSS) e de incapacidade (EDSS) nos fumadores, portadores do alelo E4, em relação aos portadores não fumadores, parece sugerir que existe um factor de neuroprotecção ligado ao fumo de tabaco. Os resultados de vários estudos em relação a esta situação são discordantes mas devemos ter em conta o desenho de cada estudo, incluindo ou não, a idade de início do consumo de tabaco, o número de cigarros/dia, e outras, nomeadamente o sexo, e diferenças no metabolismo dos componentes do tabaco.(280). A nicotina tem efeitos imunossupressivos sistémicos,(281) inibe a activação da microglia(282) o recrutamento de leucócitos(283, 284) durante a inflamação, tem propriedades antioxidantes e antiexcitotóxicas (284). Estes efeitos são mediados pelos receptores nicotínicos colinérgicos $\alpha 7$. Podemos especular que nos doentes com EM a nicotina poderá contrariar a lesão neuroinflamatória e tecidual cerebral associada à FapoE4, facilitando os circuitos colinérgicos nicotínicos. Em síntese, os nossos resultados sugerem um envolvimento dos receptores nicotínicos na patogénese da EM sendo de explorar agentes terapêuticos com actuação nos receptores nicotínicos.

Este estudo está limitado ao sexo feminino e pela sua análise transversal de resultados, sendo necessários mais estudos para confirmação destas conclusões.

Estudo E 6 (E 6)

A influência dos níveis plasmáticos da apoE e dos hábitos tabágicos na indução de anticorpos neutralizantes para interferão β

(artigo enviado para publicação, *Journal of Neurology*)

Breve Introdução

Neste trabalho, estudou-se uma população de 31 indivíduos do sexo feminino, com EM de surto remissão de acordo com os critérios de McDonald, e que iniciaram tratamento com interferão. Foram feitas avaliações clínicas, imediatamente antes, e na altura da administração de interferão. Os hábitos tabágicos e outras medicações foram também anotados. Nenhum dos doentes fez tratamento com hipolipemiantes.

Os doentes tinham pelo menos 24 meses de tratamento com interferão quando a pesquisa de anticorpos foi pedida. Nos doentes com resposta fraca ou nula ao tratamento, foi tido em conta o número de surtos que apareceram e a progressão da doença. Os NAb foram determinados por causa da progressão da doença ou/e porque os pacientes sofreram um ou mais surtos durante os 2 últimos anos.

Os doentes do sexo masculino foram excluídos dado o baixo número. Os doentes foram tratados com interferão β 1 (Rebif) ou interferão β 1-b (Betaferon).

Os pacientes foram considerados NAb positivos se tiveram dois resultados positivos em amostras de sangue colhidas com intervalo de pelo menos 6 meses.

As lipoproteínas e os marcadores inflamatórios foram analisados nas mesmas amostras de sangue. Determinaram-se as concentrações dos triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL, apoA-1, apoB, apoE, ácido úrico, neopterin e leptina e ferritina. Os perfis de lipoproteínas plasmáticas foram analisados, em todos os doentes, antes da terapêutica com interferão β . Os marcadores lipoproteicos e inflamatórios foram ainda determinados numa população controle do sexo feminino e mesmo grupo etário.

Resultados

Como se pode verificar na **Tabela 1**, também não existiam diferenças clínicas nos 2 grupos de doentes, os que desenvolveram NABs e os que permaneceram negativos. Dezoito doentes (58%) foram tratados com Rebif e e treze doentes (45%) com Betaferon. Onze de 31 doentes (35%) tornaram-se NAB-positivos.

Tabela 1- Características demográficas e clínicas das pacientes de EM antes do início do tratamento com interferão β , e a altura em que se determinaram os NAB

	Antes do Tratamento		p-value	No momento da análise de Nab		p-value
	Mantiveram-se Nab -negativos (n=20)	Tornaram-se Nab-positivos (n=11)		Nab-negativo (n=20)	Nab-positivo (n=11)	
Idade: Média em anos (SD)	39 (9.8)	42 (9.3)	0.38	44 (10)	47 (9.5)	0.41
Idade Início: Média em anos (SD)	31 (9.3)	36 (9.3)	0.14			
Duração da Doença: Média em anos (SD)	8.9 (7.6)	6.5 (4.7)	0.36	13.9 (7.9)	12 (5.7)	0.36
Duração Tratamento: Média em anos (SD)				5.05 (1.9)	4.9 (2.8)	0.87
Taxa de Surto Anuais: Média (SD)	0.83 (0.41)	1.14 (0.67)	0.13	0.68 (0.57)	0.95 (0.65)	0.23
EDSS score: Média (SD)	3.3 (1.3)	3.2 (1.5)	0.86	4.8 (1.3)	4.2 (1.5)	0.21
MSSS score: Média (SD)	5.1 (2.2)	5.2 (2.2)	0.84			
Fumadores: n (% do total)	6 (30)	7 (64)	0.13	6 (30)	7 (64)	0.13
Doentes sob Outra Medicação: n (% do total)	4 (20)	3 (27)	0.67	3 (15)	2 (18)	0.83
IFN-beta Preparation						
Rebif				13 (65)	5 (45)	0.45
Betaferon				7 (35)	6 (54)	0.45

INF: Interferon; NAB: Anticorpo neutralizante; SD: Desvio Padrão; EDSS: Expanded Disability Status Scale; MSSS: Grau de Severidade de Esclerose Múltipla.

p-valores calculados através do T-Teste e do teste Fisher

Na **Tabela 2** são apresentados os valores das concentrações de lípidos e marcadores inflamatórios no momento da análise dos NABs. Comparados com os que se tornaram NAB positivos, os que permaneceram negativos tinham valores de apoE mais elevados (OR: 0,95,95% CI: 0,91-1,0, p=0,04) assim como de neopterin (OR: 0,72, 0,95, 95% CI: 0,55-0,95, p=0,02).

Tabela 2 - Perfil de lipoproteínas plasmáticas e marcadores inflamatórios nas doentes com EM NAb-negativas e NAb-positivas

	NAb-negativo (n=20)	NAb-positivo (n = 11)	OR	P – value
Triglicéridos (mg/dL)	112 (95-152)	125 (122-184)	1,00 (0,99 , 1,02)	0,48
Colesterol total (mg/dL)	209 (190-220)	236 (176-248)	1,01 (0,99 – 1,03)	0,52
LDL colesterol (mg/dL)	136 (120-149)	149 (89-166)	1,00 (0,98 , 1,02)	0,93
HDL colesterol (mg/dL)	47 (41-58)	48 (45-51)	1,00 (0,93 , 1,07)	0,94
Apolipoproteína A-I (mg/dL)	147 (130-165)	158 (135-191)	1,03 (0,99 , 1,06)	0,11
Apolipoproteína B (mg/dL)	90 (76-103)	108 (80-118)	1,04 (0,99 , 1,09)	0,1
Apolipoproteína E (mg/dL)	76 (66-87)	53 (50-84)	0,95 (0,91 , 0,998)	0,04
Neoptreína (mg/dL)	12 (9-14)	7 (4-10)	0,72 (0,55 , 0,95)	0,02
Ferritina (mg/dL)	70 (26-223)	60 (30-70)	0,99 (0,98 , 1,00)	0,12
Leptina (mg/dL)	19 (9-34)	11 (6-17)	0,95 (0,89 , 1,01)	0,12
Acido Urico (mg/dL)	4.3 (3.5-4.9)	3.9 (3.3-4.4)	0,76 (0,39 , 1,48)	0,42
Index de Massa Corporal (Kg/m ²)	27 (21-31)	23 (21-30)	0,96 (0,83 , 1,11)	0,56

OR: Odds ratio; NAB: Anticorpo neutralizante; LDL: proteína de baixa densidade; HDL: Proteína de Alta Densidade. Dados apresentados como medias com distancias interquartil

p-valores calculados através da análise de regressão logística.

Antes do começo da terapêutica, os doentes que mais tarde se mantiveram NAb negativos tinham também níveis de apoE mais elevados do que aqueles doentes que se tornaram NAb positivos (OR: 0,95, 95% CI: 0,91-1,00,p=0,03) como se pode ver:

Tabela 3 – Perfil lipoproteico plasmático na EM em pacientes antes da terapêutica com interferão β

	Remained Nab-negative (n=20)	Became NAB-Positive (n=11)	OR	p-value
Triglicéridos (mg/dL)	113 (67-135)	94 (83-147)	1.00 (0.99, 1.03)	0.33
Total Colestrol (mg/dL)	200 (170-228)	213 (193-228)	1.01 ((0.99, 1.04)	0.38
LDL Colestrol (mg/dL)	126 (108-149)	136 (117-160)	1.01 (0.98, 1.03)	0.58
HDL Colestrol (mg/dL)	56 (49-60)	52 (42-67)	0.99 (0.92, 1.06)	0.68
Apolipoproteína A-I (mg/dL)	157 (141-168)	155 (134-166)	0.99 (0.96, 1.03)	0.74
Apolipoproteína B (mg/dL)	96 (87-119)	107 (88-118)	1.02 (0.98, 1.05)	0.29
Apolipoproteína E (mg/dL)	83 (68-107)	67 (47-74)	0.95 (0.91, 0.995)	0.03

Consultar legenda das tabelas 1 e 2.

As isoformas apoE4 e a apoE2 estavam presentes em 10 % e 15% dos doentes sem NAb, e em 18% e 9%, daqueles que desenvolveram NAb, $p=0,52$ e $p=0,64$, respectivamente.

Quando ajustados para a apoE, os hábitos tabágicos tornam-se significativamente associados com a produção de NAb (OD:5,6, 95% CI: 1,3-86,9, $p=0,03$).

Não foram encontradas associações entre apoE e o fumo de tabaco, nem entre os surtos (antes e depois do tratamento) e os níveis de apoE.

Se executarmos a dicotomização dos níveis de apoE pelo valor da sua mediana, níveis $<74\text{mg/L}$, parecem estar associados com taxas de surtos mais elevadas antes do tratamento ($p=0,02$), mas não com taxa de surtos pós tratamento ($p=0,56$).

Nas tabelas 4 e 5 apresentam-se os resultados nos doentes, comparativamente aos obtidos nos sujeitos controle.

Tabela 4 Perfil de lipoproteínas plasmáticas e marcadores inflamatórios em pacientes de esclerose múltipla NAb positivos e NAb negativos e controlos

	Nab Negativo (n=20)	Nab Positivo (n=11)	Controlos (n=39)	Valor de P para comparação entre Nabs negativos e controlos	Valor de P para comparação entre Nabs positivos e controlos	Valor de P para comparação entre controlos e doentes de EM
Triglicéridos (mg/dL)	112 (97, 152)	125 (122, 184)	80 (56, 125)	0.007	0.004	0.001
Total (mg/dL)	209 (190, 220)	236 (176, 248)	201 (168, 225)	0.42	0.24	0.23
Colesterol (mg/dL)	136 (120, 149)	140 (89, 166)	122 (96, 158)	0.46	0.49	0.37
Colesterol (mg/dL)	47 (41, 58)	48 (45, 51)	51 (45, 58)	0.17	0.17	0.10
ina A (mg/dL)	147 (130, 165)	158 (135, 191)	152 (138, 166)	0.26	0.27	0.85
ina B (mg/dL)	90 (76, 103)	108 (80, 118)	77 (67, 93)	0.11	0.02	0.02
ina E (mg/L)	76 (66, 87)	53 (50, 84)	66 (55, 75)	0.02	0.50	0.11
Neopterin (ng/mL)	12 (9, 14)	7 (4, 10)	4.0 (3.6, 5.0)	0.002	0.01	< 0.001
Ferritina (ng/mL)	70 (26, 223)	60 (30, 70)	47 (19, 65)	0.01	0.78	0.03
Leptina (ng/mL)	19 (9, 34)	11 (6, 17)	19 (11, 32)	0.75	0.13	0.29
Acido Úrico (ng/mL)	4.3 (3.5, 4.9)	3.9 (3.3, 4.4)		0.06	0.56	0.10
Index (Kg/m ²)	27 (21, 31)	23 (21, 30)	23 (21, 27)	0.06	0.42	0.09
Idade	39.2 (9.8)	42.4 (9.3)	38.5 (11.5)	0.81	0.31	0.48

Todas as comparações foram feitas usando análise de regressão logística, com excepção da idade em que foi usado um T-test

Tabela - 5 Perfil de lipoproteínas plasmáticas em doentes de esclerose múltipla e controlos antes da terapêutica com interferão

	Mantiveram-se Nab-negativos (n=20)	Tornaram-se Nab-positivos (n=11)	Controlos (n=39)	Valor de P para comparação entre Nabs negativos e controlos	Valor de P para comparação entre Nabs positivos e controlos	Valor de P para comparação entre todos doentes EM
Triglicéridos (mg/dL)	113 (67, 135)	94 (83, 147)	80 (56, 125)	0.12	0.04	0.03
Colesterol (mg/dL)	200 (170, 228)	213 (193, 228)	201 (168, 225)	0.83	0.32	0.50
LDL (mg/dL)	126 (108, 149)	136 (117, 160)	122 (96, 158)	0.73	0.40	0.49
HDL (mg/dL)	56 (49, 60)	52 (42, 67)	51 (45, 58)	0.29	0.76	0.37
Apo A (mg/dL)	157 (141, 168)	155 (134, 166)	152 (138, 166)	0.52	0.91	0.61
Apo B (mg/L)	96 (87, 119)	07 (88, 118)	77 (67, 93)	0.01	0.01	0.001
Apo E (mg/L)	83 (68, 107)	67 (47, 74)	66 (55, 75)	0.004	0.59	0.04

Conclusões

O objectivo do desenho deste estudo foi o de investigar se o perfil lipoproteico plasmático na EM, em doentes tratados com interferão β , estava associado ao risco de desenvolverem NAb.

Constatámos a intervenção de uma associação entre baixas concentrações plasmáticas de apoE e o risco de produção de NAbs

Assim, o nosso trabalho sugere que existem diferenças inatas no metabolismo da apoE que podem estar associadas ao risco de desenvolvimento de NAbs. Esta evidência é ainda suportada pelo facto de vários artigos terem demonstrado os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios da apoE.(285). No nosso estudo, a associação observada entre os baixos níveis de apoE e o risco para a produção de NAbs poderá estar relacionado com os seus efeitos imunossupressores. Apesar de os níveis de apoE serem, em parte, influenciados pelos seus polimorfismos(286) não verificámos isto no presente estudo.

Os nossos resultados podem sugerir que uma resposta supra-regulada adaptativa da apoE plasmática à actividade sistémica inflamatória terá um efeito contra o desenvolvimento de NAbs, e possivelmente inibidora da reactividade imunitária humoral em geral. Na verdade, os doentes que produzem NAbs têm maior susceptibilidade para o desenvolvimento de anticorpos auto-reactivos, incluindo antinucleares e antitiroideos(287)

O envolvimento sugerido da influência do metabolismo lipoproteico no aparecimento de NAbs pode ter particular relevância no contexto da terapia com estatinas nestes doentes(288), além da interferência da estatinas na terapêutica com interferão(289).

Os nossos estudos confirmam trabalhos prévios que demonstram uma diminuição nos níveis de neopterin nos doentes NAb-positivos(290).

Não foram encontradas diferenças noutros parâmetros inflamatórios tais como o ácido úrico, ferritina e leptina. De assinalar, comparavelmente aos controles, uma redução da apoB em ambos os grupos de doentes e uma tendência para concentrações mais elevadas de triglicéridos no grupo que desenvolveu anticorpos.

Devemos ainda referir que, apesar do risco imunológico associado à apoE parecer independente do uso de tabaco, a análise por multivariância sugere que o hábito tabágico pode estar associado à indução de NAbs nestes doentes. O fumo de tabaco estimula respostas inflamatórias e promove a formação de autoanticorpos nas doenças autoimunes(291) e induz citrulinização nas proteínas, que podem

desencadear a resposta imune nos indivíduos com determinados haplotipos HLA-DR (292).

Em conclusão, os resultados suportam um envolvimento do metabolismo lipoproteico associado à apoE na disfunção imunitária da EM.

PARTE IV - DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os nossos resultados demonstram que o interferão β induz uma elevação sérica proteínas de fase aguda, como o fibrinogénio e a ferritina.(E1, E3)

Esta constatação é semelhante ao observado por outros autores para o amilóide sérico A e para a PCR (47). O tratamento induz igualmente um aumento da neopterina sérica (E6), marcador de activação macrofágica e reconhecido indicador da acção do interferão β (293). Os nossos resultados confirmam a sua redução na presença de anticorpos neutralizantes do medicamento (NABs).(E6)

É interessante notar que outros marcadores de resposta de fase aguda podem já estar aumentados no estado basal, em doentes não tratados, como o amilóide sérico A e a leptina com o interferão β , reduzindo o nível da primeira, como já referido na introdução. Por outro lado, não observámos que o medicamento possa alterar significativamente os níveis de leptina (E6).

No seu conjunto, estes resultados sugerem que o interferão β terá propriedades estimuladoras de uma selectiva activação inflamatória sistémica. Na verdade, a sua administração causa, em muitos doentes, um quadro tipo “ gripal “ que foi associado a uma mediação pela interleucina 6, indutora da síntese de proteínas de fase aguda como o PCR e o fibrinogénio. É possível que o aumento de fibrinogénio pelo interferão também possa reflectir uma restrição do processo lesivo da BHE associada à deposição de fibrina.

Por outro lado, observámos um aumento basal da LDL oxidada nesta patologia, comparativamente maior durante os surtos clínicos, do que nos períodos de remissão. Este aumento poderá reflectir um stress oxidativo associado ao seu estado inflamatório crónico, com uma elevação associada à reactividade autoimune, lesão da barreira hematoencefálica e promoção de surtos clínicos. A própria LDL oxidada poderá ter um papel fisiopatológico associado àquela lesão, génese de placas e controle da actividade inflamatória (294) .

A redução dos níveis de LDL oxidada pelo interferão β é, pois, consistente com a atenuação pelo tratamento da actividade auto imunitária, frequência de surto e génese de placas. Contudo, o significado da LDL oxidada, neste contexto, é incerta e complexa, pois foi demonstrado que ela inibe a reacção de imunidade inata via os TLR (células dendrítica favorecendo uma resposta Th 2, o que teoricamente poderá ser benéfico para a para EM.(295)

Recentemente, tem sido sublinhada a importância da geração de radicais livres de oxigénio na inibição da auto-reactividade das células T e protecção contra a auto-imunidade, inclusive na EM (296). É pois possível que a elevação das LDL oxidadas nos doentes não tratados não tenha um significado potencialmente lesivo, mas traduza uma reactividade protectora contra a autoimunidade. Será talvez a atenuação do processo de autoimunidade a causa, e não uma consequência, da redução da LDL oxidada pelo tratamento.

Em que medida as alterações discutidas relativamente ao stress oxidativo se podem relacionar com a indução da ferritina pelo interferão β ? Embora a ferritina seja um importante protector contra a geração de radicais livres, os seus níveis séricos não variam com a actividade da doença (surto-remissão), nem supostamente com a actividade da HO-1 (E3). É possível que este aumento reflecta um aumento do turnover do ferro (que tem sido implicado na doença) ou uma síntese proteica induzida pelo interferão. Os resultados não permitem concluir que este aumento (de nível muito variável com os doentes) esteja relacionado com os efeitos clínicos do tratamento. Estudos prospectivos, de longa duração, poderão esclarecer o seu eventual interesse na monitorização das respostas individuais ao tratamento.

Neste sentido, é interessante que níveis aumentados de ferritina foram observados em doentes com formas progressivas de EM (não respondendo ao interferão) e que um aumento basal de ferritina sérica foi associado a uma pobre resposta ao interferão α em doentes com hepatite C (E3). Estudos recentes têm sublinhado uma heterogeneidade da disfunção inflamatória da EM de surto remissão, consistente com uma heterogeneidade nas respostas ao tratamento com interferão β (benéfico ou ineficaz) (42). Poderá esta disfunção inflamatória estar associada a uma alteração do metabolismo lipoproteico plasmático? Os resultados, apresentados neste trabalho e a discutir em seguida, possibilitam fazer uma abordagem para responder a esta interrogação.

Ao longo deste trabalho, temos sublinhado a importância que o metabolismo do colesterol e lipoproteico, poderá ter na regulação das respostas imunitárias. Para além da evidência largamente documentada para a aterogénese, doenças tipicamente autoimunes como o lúpus eritematoso disseminado e artrite reumatóide associam-se a um perfil lipoproteico aterogénico (297, 298). Alterações a este nível metabólico poderão também manifestar-se no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo da mielina, e na reactividade imunitária associada à EM.(299). É particularmente intrigante a já assinalada relação de deficiência em vitamina D com o risco para a doença. Será esta constatação só um reflexo de uma disfunção da regulação do sistema imunitário pelo metabolismo do colesterol, lipídico ou lipoproteico, susceptibilizando o indivíduo à EM?

A evidência preliminar para um efeito benéfico da monoterapia com estatinas na actividade da EM poderá apoiar tal hipótese((107, 300). Da mesma forma, esta é consistente com os estudos implicando os PPARs no mecanismo de acção do interferão β e a possível utilização de agonistas dos PPARs nesta patogenia(107). Iguamente ela enquadra-se nos trabalhos associados aos estudos do amiloide sérico A, ácidos gordos e colesterol sanguíneo com a actividade da doença. Os nossos resultados apoiam esta hipótese sugerindo, em particular, um envolvimento do metabolismo das lipoproteínas remanescentes e da apoE.

A implicação deste metabolismo é sugerida, não só pelos resultados em doentes sem terapêutica, como na resposta observada sob tratamento com interferão β , o que poderá reforçar o seu eventual papel na patogénese da doença. As lipoproteínas remanescentes são partículas com propriedades pró-inflamatórias sendo o seu metabolismo modulado por citocinas incluindo como observámos neste trabalho, pelo interferão β .(E4)

Os estímulos inflamatórios desencadeiam múltiplas adaptações metabólicas, incluindo lipoproteicas, dirigidas para uma disponibilização de moléculas e substratos necessárias às defesas imunitárias. Entre essas consequências (nomeadamente pela inibição da lipoproteína lipase, lipase hepática, e internalização lipoproteica) existe também uma elevação das lipoproteínas remanescentes e ricas em triglicéridos e da ApoE sérica e redução da HDL (285). O facto de o nível de colesterol RLP estar aumentado nos doentes em remissão, não tratados, apoia a presença destes mecanismos nesta patologia associada à inflamação crónica. Por outro lado, o facto

do interferão β induzir uma normalização do colesterol RLP reforça a relação deste com a actividade inflamatória. Na verdade, as RLP induzem stress oxidativo e a expressão de mediadores associados à autoimunidade como moléculas de adesão e quimiocinas (MCP-1) (277), pelo que, a sua redução pelo tratamento poderá significar a sua implicação na patogénese da doença. Contudo, concomitantemente a este efeito o interferão β induz um aumento dos triglicéridos totais e redução do HDL, alterações tipicamente observadas na resposta de fase aguda.(E4)

Embora neste estudo não se tenha observado uma alteração significativa dos níveis de triglicéridos basais relativamente a sujeitos controle, noutra trabalho, observámos que tal poderá acontecer. No último estudo (E6) constatámos, para além de um aumento da apo B, alterações nas concentrações de triglicéridos e apoE poderão depender da população de doentes e suas diferenças na reactividade imunitária, investigada no nosso estudo relativamente à produção de NAbs. Estes trabalhos, documentam uma heterogeneidade metabólica lipoproteica nestes doentes e são consistentes com a sua referida heterogeneidade imunológica, sugerindo uma associação do metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicéridos e suas remanescentes, com essa disfunção imunitária. Embora o interferão β influencie esse metabolismo, ele não corrigirá a sugerida alteração basal a esse nível.

Em apoio desta hipótese, estão os resultados referentes à adiponectina, principal reguladora do metabolismo daquelas partículas lipoproteicas. De facto, aquela adipocina está aumentada nos doentes não tratados e os seus níveis não são alterados pela terapêutica. Estes resultados poderão levantar uma interrogação: será que essa sugerida alteração metabólica lipoproteica, que não é corrigida com a limitação da autoimunidade e surtos clínicos pelo interferão β , pode estar associada à persistência do processo inflamatório, progressão da neurodegenerescência e das incapacidades neurológicas?

Os resultados referentes à apoE (E5 e E6) possibilitam-nos abordar uma resposta. Na verdade, aquela é das principais componentes proteicas das partículas remanescentes e ricas em triglicéridos (VLDL e quilomicra), e das HDL com uma função fundamental no seu catabolismo (301). O seu aumento sérico, associado a estímulos inflamatórios, promoverá os seus efeitos imuno-supressores. Existe substancial evidência para a importância da apoE em patologia neurodegenerativa, em particular na doença de Alzheimer, para a qual se tem recentemente realçado a

implicação de mecanismos inflamatórios.(286) Analisámos a possível implicação desta apolipoproteína para a EM, com duas abordagens. Uma delas dirigiu-se a esclarecer a influência dos seus fenótipos na frequência de surtos, grau de incapacidade e sua progressão. (E5) Estas análises foram efectuadas em doentes sem tratamento e não revelaram qualquer influência daqueles fenótipos na frequência dos surtos. Contudo, a isoforma E4 revelou associar-se a uma maior progressão das incapacidades nos doentes não fumadores, comparativamente aos fumadores. Este resultado é consistente com o observado na doença de Alzheimer e apoia um papel da E4 nos processos neurodegenerativos.

Contudo, os resultados indicam que a influência da E4 é susceptível de ser modulada por agentes ambientais, neste caso, o fumo de tabaco. O consumo deste é hoje considerado um risco para desenvolver a EM, mas um estudo recente indica que esse risco não será conferido pela nicotina, a qual poderá ter mesmo um efeito protector.(302) A nicotina tem reconhecidos efeitos neurotróficos e anti-inflamatórios através de receptores nicotínicos $\alpha 7$.(283) Estando a isoforma E4 associada a maior reactividade inflamatória sistémica e cerebral, poderemos especular que nesses portadores o hábito tabágico poderá ter um efeito protector através da nicotina.(E5)

O facto de a apoE predominar nas lipoproteínas remanescentes e ricas em triglicéridos apoia a implicação deste metabolismo no processo degenerativo da EM. Neste processo e na fase progressiva da doença, como já assinalado, tem-se atribuído mais importância a uma disfunção da imunidade inata e reactividade da imunidade humoral mediada por linfócitos B. Contudo, esta existirá desde o início da doença e poderá ser mesmo a mais relevante para a génese das lesões nalguns doentes.

Numa segunda abordagem para clarificar o papel da ApoE na EM, analisámos por isso, a sua eventual relação com a reactividade imunitária humoral. Neste estudo, a apoE e seus fenótipos foram avaliados em conjunto com o perfil lipoproteico plasmático e o parâmetro de reactividade humoral escolhido foi a presença de anticorpos neutralizantes do interferão β (NAbs) (E6) Um aspecto importante é a população dos doentes estudados apresentar o mesmo grau de actividade, incapacidade e severidade da doença, excluindo portanto diferenças clínicas como responsáveis pelas eventuais alterações nas variáveis laboratoriais estudadas.

O interesse da análise dos resultados dos NAbs liga-se ainda ao facto de a sua indução nalguns doentes associar-se a uma maior actividade e progressão das lesões e incapacidade, podendo pois representar um parâmetro de susceptibilidade para uma reactividade humoral relevante para a sua patogénese. Apoiando esta hipótese, outros autores verificaram que os doentes desenvolvendo NAbs têm de facto maior tendência para produzirem outros autoanticorpos(287).

Os resultados evidenciaram que o grupo de doentes que, durante a terapêutica produziu NAbs, tinha no momento desta análise, como previamente à intervenção terapêutica, uma concentração de apoE plasmática inferior, comparativamente ao grupo que não desenvolveu anticorpos. Para além disto, baixas concentrações de apoE associaram-se a uma maior frequência de surtos clínicos. Embora a população utilizada neste estudo tenha sido pequena, não se observou uma associação com os fenótipos da apoE. Este resultado é interessante dado que, recentemente, baixas concentrações de apoE plasmática foram associadas a risco para a doença de Alzheimer independentemente dos seus fenótipos(286). Este facto suporta um papel da apoE, não só na reactividade imunitária, como possivelmente no processo neurodegenerativo da EM.

A análise multivariada sugere que o hábito tabágico também se associa à produção de NAbs, mas o risco conferido pela concentração plasmática de apoE é independente daquele.

Como atrás revisto,(301) os estímulos inflamatórios associam-se a um aumento e da apoE plasmática, promovendo os seus efeitos imunossupressores. Como atrás assinalado, os resultados sugerem que estes doentes são diferentes ou heterogéneos no seu metabolismo lipoproteico e que este se poderá associar à heterogeneidade da sua reactividade imunitária. Poderíamos especular que uma menor capacidade compensatória de elevação de apoE plasmática aos estímulos inflamatórios poderá predispor a uma maior reactividade imunitária, nomeadamente expressa na produção de NAbs. Esta interpretação é consistente com o efeito benéfico e imunossupressor da administração de miméticos da apoE na EAE. Em síntese, os resultados apoiam a implicação do metabolismo lipoproteico, em particular associado à apoE, na disfunção imunitária e no processo degenerativo da EM.

PARTE V – SÍNTESE E CONCLUSÃO

SÍNTESE

O nosso trabalho teve por objectivo investigar eventuais relações do metabolismo lipoproteico plasmático, com a actividade inflamatória sistémica de doentes com esclerose múltipla. O fundamento desta investigação liga-se ao facto de, noutras patologias, haver consistente evidência para a existência de alterações daquele metabolismo induzidas pelo processo inflamatório, nomeadamente mediadas por citocinas. Por outro lado, sabe-se que alterações primárias do metabolismo do colesterol, lipídico e lipoproteico podem influenciar as respostas imunitárias. Perante alguns resultados sugerindo alterações deste metabolismo na doença, partimos da hipótese que aquelas possam estar directamente implicadas na sua patogénese.

Adoptámos duas abordagens nesta investigação. Por um lado, a análise dos doentes comparativamente a uma população de controlo e, por outro, o estudo daqueles pré e pós-tratamento com interferão β .

Observámos que estes doentes têm níveis basais aumentados de LDL-oxidada, de colesterol de partículas remanescentes, adiponectina e de apolipoproteína B, comparativamente à população de controle, alterações compatíveis com a existência de uma reactividade inflamatória sistémica e stress oxidativo associado. O observado aumento da LDL-oxidada durante os surtos clínicos é com isso consistente. A redução da LDL-oxidada e do colesterol RLP pelo interferão indicam um efeito inibidor dessa actividade, presumivelmente relacionado com o processo autoimune e surtos clínicos, atenuado pela terapêutica. Contudo, o tratamento não altera os níveis aumentados de adiponectina. Esta observação pode traduzir a persistência de uma disfunção lipoproteica e actividade inflamatória, dadas as funções reguladoras daquele metabolismo e propriedades antiinflamatórias desta adipocina. Na verdade, o interferão induz também um aumento dos triglicéridos totais e redução de HDL, alterações típicas de resposta de fase aguda. Estas últimas alterações lipídicas são coerentes com o aumento sérico de mediadores inflamatórios provocados pelo interferão, incluindo o fibrinogénio, ferritina e neopterinina. Este cenário de alterações bioquímicas basais e influências nelas induzidas pelo interferão, a juntar à estimulação que este provoca de um perfil pró inflamatório, sugere uma primeira linha de **conclusões**:

Existirá na EM de surto-remissão uma disfunção lipoproteica basal que é influenciada mas não corrigida pelo interferão, presumivelmente em relação com a sua

restrição de actividade auto-imunitária. Para este efeito do medicamento (e possivelmente da sua secreção endógena) contribuirá uma estimulação de certas respostas inflamatórias. Estas estarão provavelmente deficientes nos doentes beneficiando do aporte desta citocina como terapêutica. Em síntese, os resultados suportam a hipótese de uma alteração do metabolismo lipoproteico implicando as partículas remanescentes poder contribuir para a disfunção imunitária da doença.

Estas conclusões são suportadas pelos resultados investigando uma possível associação do perfil lipoproteico com o risco de produção de anticorpos neutralizantes do interferão β (NAbs). Se agruparmos os doentes de acordo com distintas reactividades imunitárias (produção ou não de NAbs), documentamos que esses grupos poderão ser diferentes no metabolismo lipoproteico e essas diferenças poderem associar-se às suas distintas respostas imunitárias. Estes resultados habilitam-nos a uma segunda linha de **conclusões**:

- os doentes com EM de surto-remissão são heterogéneos no que respeita ao seu perfil lipoproteico. Diferenças no metabolismo lipoproteico associado à apoE poderão predispor a diferentes respostas imunitárias.

- O interferão tem reduzidos efeitos na progressão das incapacidades associadas a um processo degenerativo, para o qual se atribui menor relevância dos mecanismos de autoimunidade mediada por linfócitos T, relativamente a mecanismos de activação da imunidade inata e humoral (células B).

A ApoE é uma apolipoproteína abundante nas lipoproteínas remanescentes, tem propriedades imunossupressoras e tem sido consistentemente implicada no processo degenerativo da D. de Alzheimer. No nosso trabalho, observámos que esta apolipoproteína poderá estar implicada na doença a dois níveis. Por um lado, a isoforma E4 poderá conferir uma susceptibilidade para uma maior progressão das incapacidades, não para a frequência de surtos, presumivelmente favorecendo a actividade inflamatória associada ao processo neurodegenerativo. Por outro lado, a própria concentração da ApoE, independentemente dos seus fenótipos, poderá regular a reactividade imunitária humoral, com baixas concentrações favorecendo a produção de anticorpos (aqui documentada com anticorpos neutralizantes do interferão β , NAbs) surtos clínicos.

Contudo, uma observação da maior importância refere-se ao facto de estas implicações da ApoE poderem ser influenciadas pelo hábito tabágico. Por um lado, na restrita população portadora da isoforma E4 aquele poderá contrariar os efeitos deletérios deste alelo. Por outro lado, observámos que o hábito tabágico poderá conferir um risco acrescido para uma activação da imunidade humoral independente das concentrações de apoE.

Neste contexto, será relevante invocar para além da apoE4, baixas concentrações plasmáticas de apoE foram associadas a risco para desenvolvimento da doença de Alzheimer. Estes resultados sugerem uma última linha de conclusões: Alterações do metabolismo lipoproteico associado à apoE poderão estar implicadas na disfunção inflamatória associada ao processo neurodegenerativo da EM.

No seu conjunto, os resultados obtidos sugerem que uma mais apropriada compreensão das interacções do metabolismo lipoproteico com os processos imunitários poderá levar a novas abordagens terapêuticas e eventualmente preventivas da doença.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos neste trabalho sugerem que o metabolismo lipoproteico plasmático poderá estar implicado na patogénese imunitária da EM a dois níveis. Por um lado, por alterações susceptíveis serem moduladas pelo interferão β e, por isso, presumivelmente associadas ao processo autoimunitário de lesão da barreira hematoencefálica e a surtos clínicos. Por outro lado, por alterações presumivelmente mais relacionados com a actividade imunitária humoral, a progressão das incapacidades e lesão neurodegenerativa e não (ou pouco) influenciadas pelo interferão β . Estas conclusões, em parte especulativas, levantam muitas interrogações constituindo uma base de trabalho para investigações futuras.

Terão a ferritina, o fibrinogénio e outros marcadores inflamatórios induzidos pelo interferão β alguma relevância patogénica e de monitorização de uma resposta à medicação? Qual o papel da LDL oxidada? Terá esta só consequências lesivas ou será também um medidor anti-inflamatório e imunossupressor? Qual o significado das alterações lipídicas de fase aguda induzidas pelo interferão β e, em que medida, estas se relacionam com o metabolismo das remanescentes?

Em que medida os resultados sobre a apoE e as adipocinas estão relacionadas com o metabolismo lipoproteico e das remanescentes, em particular, se este último é modulado pelo interferão β ? As partículas remanescentes são heterogéneas e a apoE tem uma compartimentação diversa entre estas, a VLDL e a HDL, que é alterada por processos inflamatórios e dependente dos seus fenótipos. Para idêntica concentração total de apoE, a distribuição desta e o seu significado imunitário poderá diferir e poderá ser afectada pelo interferão β . Serão necessários estudos caracterizando melhor as partículas remanescentes (ricas e pobres em triglicéridos), a compartimentação da apoE entre estas e outras fracções lipoproteicas (como a apoE-HDL) e a sua relação com os fenótipos e regulação pelas adipocinas. Em que medida estes aspectos metabólicos se relacionam com o risco conferido pelo sistema HLA, pela deficiência em vitamina D e pelo hábito tabágico? Em que medida estes aspectos metabólicos se relacionam com o papel anti-inflamatório e, possivelmente, benéfico dos AGPI n-3, e das estatinas (que reduzem a LDL oxidada e colesterol-RPL)?

Em que medida estes aspectos metabólicos se relacionam com a implicação dos PPARs nos mecanismos de acção do interferão β e possível benefício de seus agonistas na doença? Em que medida as alterações documentadas a nível circulatório sistémico se relacionam com os processos inflamatório e degenerativo ocorrendo no sistema nervoso central? Estas são interrogações constituindo vias possíveis de investigação futura, que os resultados aqui apresentados poderão fundamentar. Elas terão importância não só para a compreensão desta doença e descoberta de novas medidas preventivas e terapêuticas para ela dirigidas. A sua elucidação invocará mecanismos básicos de interacção do metabolismo lipoproteico com os processos imunitários implicados em muitas e diversas patologia com grande impacto social e para a saúde humana.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Nicholls SJ, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Aug;15(6):212-9.
2. Hickey WF. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol*. 1999 Jul 1;98(1):37-44.
3. Sadovnick AD. European Charcot Foundation Lecture: the natural history of multiple sclerosis and gender. *J Neurol Sci*. 2009 Nov 15;286(1-2):1-5.
4. Frith JA. History of multiple sclerosis. An Australian perspective. *Clin Exp Neurol*. 1988;25:7-16.
5. Landtblom AM, Fazio P, Fredrikson S, Granieri E. The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Este (1794-1848). *Neurol Sci*. 2009 Oct 17.
6. Richards RG, Sampson FC, Beard SM, Tappenden P. A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis: implications for resource allocation and health economic models. *Health Technol Assess*. 2002;6(10):1-73.
7. Kremenchutzky M, Cottrell D, Rice G, Hader W, Baskerville J, Koopman W, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain*. 1999 Oct;122 (Pt 10):1941-50.
8. Poser CM. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1995;161:11-22.
9. Ferro J, Pimentel J. *Neurologia - Princípios, Diagnóstico e Tratamento* Lisboa: Lidel; 2006.
10. José SM. *Esclerose Múltipla*. 2006.
11. Broadley SA. Could vitamin D be the answer to multiple sclerosis? *Mult Scler*. 2007 Aug;13(7):825-6.
12. Ebers GC, Sadovnick AD, Veith R. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004 Sep 14;63(5):939; author reply
13. Holmoy T. Vitamin D status modulates the immune response to Epstein Barr virus: Synergistic effect of risk factors in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2008;70(1):66-9.
14. Ebers GC. Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004 Jun;10 Suppl 1:S8-13; discussion S-5.
15. Hayes CE, Donald Acheson E. A unifying multiple sclerosis etiology linking virus infection, sunlight, and vitamin D, through viral interleukin-10. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):85-90.
16. Nicot A. Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. *Front Biosci*. 2009;14:4477-515.
17. Schiffer RB, Weitkamp LR, Wineman NM, Guttormsen S. Multiple sclerosis and affective disorder. Family history, sex, and HLA-DR antigens. *Arch Neurol*. 1988 Dec;45(12):1345-8.
18. Dean G, Yeo TW, Goris A, Taylor CJ, Goodman RS, Elian M, et al. HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta. *Neurology*. 2008 Jan 8;70(2):101-5.
19. Kurtzke JF. Natural history and clinical outcome measures for multiple sclerosis studies. Why at the present time does EDSS scale remain a preferred outcome measure to evaluate disease evolution? *Neurol Sci*. 2000 Dec;21(6):339-41.
20. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444-52.

21. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005 Apr 12;64(7):1144-51.
22. Maschke M, Limmroth V. [Multiple sclerosis. Current aspects of the disease and treatment]. *Med Monatsschr Pharm*. 2003 Dec;26(12):404-8; quiz 9-10.
23. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005 Dec;58(6):840-6.
24. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*. 1996 Jul;6(3):259-74.
25. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain*. 2006 Jun;129(Pt 6):1507-16.
26. Friese MA, Fugger L. T cells and microglia as drivers of multiple sclerosis pathology. *Brain*. 2007 Nov;130(Pt 11):2755-7.
27. Maggs FG, Palace J. The pathogenesis of multiple sclerosis: is it really a primary inflammatory process? *Mult Scler*. 2004 Jun;10(3):326-9.
28. Trapp BD. Pathogenesis of multiple sclerosis: the eyes only see what the mind is prepared to comprehend. *Ann Neurol*. 2004 Apr;55(4):455-7.
29. Gallo V. Surprising synapses deep in the brain. *Nat Neurosci*. 2007 Mar;10(3):267-9.
30. Mastronardi FG, Moscarello MA. Molecules affecting myelin stability: a novel hypothesis regarding the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 2005 May 1;80(3):301-8.
31. Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*. 2005 May;128(Pt 5):1016-25.
32. Gonsette RE. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? *Mult Scler*. 2008 Jan;14(1):22-34.
33. Linker RA, Kieseier BC, Gold R. Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Nov;29(11):558-65.
34. Weinstock-Guttman B, Ransohoff RM, Kinkel RP, Rudick RA. The interferons: biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1995 Jan;37(1):7-15.
35. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol*. 1996 Mar;39(3):285-94.
36. Ziemssen T, Schrempf W. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*. 2007;79:537-70.
37. Schrempf W, Ziemssen T. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2007 Aug;6(7):469-75.
38. Ransohoff RM. Natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2007 Jun 21;356(25):2622-9.
39. Yoo JY, Desiderio S. Innate and acquired immunity intersect in a global view of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):1157-62.
40. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
41. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Dec;6(12):975-90.

42. Comabella M, Lunemann JD, Rio J, Sanchez A, Lopez C, Julia E, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 Sep 9.
43. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000 Oct 31;102(18):2165-8.
44. Szalai AJ. C-reactive protein (CRP) and autoimmune disease: facts and conjectures. *Clin Dev Immunol*. 2004 Sep-Dec;11(3-4):221-6.
45. Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J, de Maat MM, Szalai AJ, et al. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPAR α activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4188-94.
46. Sellner J, Greeve I, Mattle HP. Atorvastatin decreases high-sensitivity C-reactive protein in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 Aug;14(7):981-4.
47. Soilu-Hanninen M, Koskinen JO, Laaksonen M, Hanninen A, Lilius EM, Waris M. High sensitivity measurement of CRP and disease progression in multiple sclerosis. *Neurology*. 2005 Jul 12;65(1):153-5.
48. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*. 1999 Oct;265(2):501-23.
49. Zahedi K, Gonnerman WA, Debeer FC, Debeer MC, Steel DM, Sipe JD, et al. Major acute-phase reactant synthesis during chronic inflammation in amyloid-susceptible and -resistant mouse strains. *Inflammation*. 1991 Feb;15(1):1-14.
50. Jensen LE, Whitehead AS. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J*. 1998 Sep 15;334 (Pt 3):489-503.
51. Thorn CF, Whitehead AS. Differential transcription of the mouse acute phase serum amyloid A genes in response to pro-inflammatory cytokines. *Amyloid*. 2002 Dec;9(4):229-36.
52. Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18562-7.
53. Migita K, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yoshida Y, Yokoyama T, et al. Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. *FEBS Lett*. 2004 Jul 2;569(1-3):235-9.
54. Xu L, Badolato R, Murphy WJ, Longo DL, Anver M, Hale S, et al. A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1184-90.
55. Preciado-Patt L, Hershkovic R, Fridkin M, Lider O. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD4+ T cells. *J Immunol*. 1996 Feb 1;156(3):1189-95.
56. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):50-3.
57. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jan;66(1):9-26.
58. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jan;7(1):64-9.
59. Liang JS, Sloane JA, Wells JM, Abraham CR, Fine RE, Sipe JD. Evidence for local production of acute phase response apolipoprotein serum amyloid A in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*. 1997 Apr 4;225(2):73-6.
60. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):3186-90.

61. Hayat S, Raynes JG. Acute phase serum amyloid A protein increases high density lipoprotein binding to human peripheral blood mononuclear cells and an endothelial cell line. *Scand J Immunol.* 2000 Feb;51(2):141-6.
62. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2758-67.
63. Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC. Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 1995 May;36(5):1058-65.
64. Urieli-Shoval S, Cohen P, Eisenberg S, Matzner Y. Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues. Predominant localization to the epithelium. *J Histochem Cytochem.* 1998 Dec;46(12):1377-84.
65. Kindy MS, Yu J, Guo JT, Zhu H. Apolipoprotein Serum Amyloid A in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 1999 Oct;1(3):155-67.
66. Miida T, Yamada T, Seino U, Ito M, Fueki Y, Takahashi A, et al. Serum amyloid A (SAA)-induced remodeling of CSF-HDL. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr;1761(4):424-33.
67. Altieri DC, Duperray A, Plescia J, Thornton GB, Languino LR. Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem.* 1995 Jan 13;270(2):696-9.
68. Aksungar FB, Topkaya AE, Yildiz Z, Sahin S, Turk U. Coagulation status and biochemical and inflammatory markers in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2008 Apr;15(4):393-7.
69. East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML, Gveric D. A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2005 Aug;167(2):545-54.
70. LeVine SM, Lynch SG, Ou CN, Wulser MJ, Tam E, Boo N. Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Brain Res.* 1999 Mar 13;821(2):511-5.
71. Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest.* 2007 Feb;117(2):438-47.
72. Mitchell KM, Dotson AL, Cool KM, Chakrabarty A, Benedict SH, LeVine SM. Deferiprone, an orally deliverable iron chelator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler.* 2007 Nov;13(9):1118-26.
73. Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, et al. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med.* 1984 Jul 1;160(1):310-6.
74. Giese SP, Crone EM, Flavall EA, Amit Z. Potential to inhibit growth of atherosclerotic plaque development through modulation of macrophage neopterin/7,8-dihydroneopterin synthesis. *Br J Pharmacol.* 2008 Feb;153(4):627-35.
75. Schoedon G, Troppmair J, Fontana A, Huber C, Curtius HC, Niederwieser A. Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. *Eur J Biochem.* 1987 Jul 15;166(2):303-10.
76. Reibnegger G, Boonpucknavig V, Fuchs D, Hausen A, Schmutzhard E, Wachter H. Urinary neopterin is elevated in patients with malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(4):545-6.
77. Awandare GA, Hittner JB, Kremsner PG, Ochiel DO, Keller CC, Weinberg JB, et al. Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and

- blood mononuclear cell MIF transcripts in children with Plasmodium falciparum malaria. Clin Immunol. 2006 May;119(2):219-25.
78. Fuchs D, Hausen A, Kofler M, Kosanowski H, Reibnegger G, Wachter H. Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis. Lung. 1984;162(6):337-46.
79. Fuchs D, Unterweger B, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Hengster P, et al. Anti-HIV-1 antibodies, anti-HTLV-I antibodies and neopterin levels in parenteral drug addicts in the Austrian Tyrol. J Acquir Immune Defic Syndr. 1988;1(1):65-6.
80. Reissigl H, Schonitzer D, Honlinger M, Reibnegger G, Fuchs D, Dierich M, et al. [The significance of neopterin determination for transfusion medicine]. Beitr Infusionsther. 1988;21:211-9.
81. Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, Fruhwald FM, Zweiker R, Watzinger N, et al. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol. 1997 Sep;30(3):703-7.
82. Murr C, Winklhofer-Roob BM, Schroecksadel K, Maritschnegg M, Mangge H, Bohm BO, et al. Inverse association between serum concentrations of neopterin and antioxidants in patients with and without angiographic coronary artery disease. Atherosclerosis. 2009 Feb;202(2):543-9.
83. Shaw CE, Dunbar PR, Macaulay HA, Neale TJ. Measurement of immune markers in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients during clinical remission. J Neurol. 1995 Jan;242(2):53-8.
84. Giovannoni G, Lai M, Kidd D, Thorpe JW, Miller DH, Thompson AJ, et al. Daily urinary neopterin excretion as an immunological marker of disease activity in multiple sclerosis. Brain. 1997 Jan;120 (Pt 1):1-13.
85. Mattle HP, Lienert C, Greeve I. [Uric acid and multiple sclerosis]. Ther Umsch. 2004 Sep;61(9):553-5.
86. Dujmovic I, Pekmezovic T, Obrenovic R, Nikolic A, Spasic M, Mostarica Stojkovic M, et al. Cerebrospinal fluid and serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis. Clin Chem Lab Med. 2009;47(7):848-53.
87. Rentzos M, Nikolaou C, Anagnostouli M, Rombos A, Tsakanikas K, Economou M, et al. Serum uric acid and multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg. 2006 Sep;108(6):527-31.
88. Guerrero AL, Martin-Polo J, Laherran E, Gutierrez F, Iglesias F, Tejero MA, et al. Variation of serum uric acid levels in multiple sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment. Eur J Neurol. 2008 Apr;15(4):394-7.
89. Marchetti B, Morale MC, Brouwer J, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, et al. Exposure to a dysfunctional glucocorticoid receptor from early embryonic life programs the resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis via nitric oxide-induced immunosuppression. J Immunol. 2002 Jun 1;168(11):5848-59.
90. Sotgiu S, Pugliatti M, Sanna A, Sotgiu A, Fois ML, Arru G, et al. Serum uric acid and multiple sclerosis. Neurol Sci. 2002 Oct;23(4):183-8.
91. Massa J, O'Reilly E, Munger KL, Delorenze GN, Ascherio A. Serum uric acid and risk of multiple sclerosis. J Neurol. 2009 Oct;256(10):1643-8.
92. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J Leukoc Biol. 2000 Oct;68(4):437-46.
93. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. Atherosclerosis. 2006 Nov;189(1):47-60.
94. Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 5;102(14):5150-5.
95. Neuteboom RF, Verbraak E, Voerman JS, van Meurs M, Steegers EA, de Groot CJ, et al. Serum leptin levels during pregnancy in multiple sclerosis. Mult Scler. 2009 Aug;15(8):907-12.

96. Matarese G, Procaccini C, De Rosa V. The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis? *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):893-9.
97. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 29;97(5):2367-72.
98. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005 May;26(3):439-51.
99. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Dec;3(12):716-24.
100. Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarnier I, Scholmerich J, et al. Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA.* 2003 Oct 1;290(13):1709-10.
101. Chan DC, Watts GF, Ng TW, Uchida Y, Sakai N, Yamashita S, et al. Adiponectin and other adipocytokines as predictors of markers of triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Clin Chem.* 2005 Mar;51(3):578-85.
102. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Jun-Aug;18(3-4):313-25.
103. Peterlin BL, Alexander G, Tabby D, Reichenberger E. Oligomerization state-dependent elevations of adiponectin in chronic daily headache. *Neurology.* 2008 May 13;70(20):1905-11.
104. Braitch M, Nunan R, Niepel G, Edwards LJ, Constantinescu CS. Increased osteopontin levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2008 May;65(5):633-5.
105. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol.* 2008 Feb;194(1-2):7-17.
106. Shohami E, Mechoulam R. Multiple sclerosis may disrupt endocannabinoid brain protection mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 18;103(16):6087-8.
107. Drew PD, Xu J, Racke MK. PPAR-gamma: Therapeutic Potential for Multiple Sclerosis. *PPAR Res.* 2008;2008:627463.
108. Bright JJ, Walline CC, Kanakasabai S, Chakraborty S. Targeting PPAR as a therapy to treat multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2008 Dec;12(12):1565-75.
109. Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:129-57.
110. Westover EJ, Covey DF. The enantiomer of cholesterol. *J Membr Biol.* 2004 Nov;202(2):61-72.
111. Carvalho e Silva JM. Colesterol, Lípidos e Doença Vascular. Lisboa: Lidel; 2000.
112. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis.* 2000 Jun;181 Suppl 3:S462-72.
113. Gallin JI, Kaye D, O'Leary WM. Serum lipids in infection. *N Engl J Med.* 1969 Nov 13;281(20):1081-6.
114. Alaupovic P, Kostner G, Lee DM, McConathy WJ, Magnani HN. Peptide composition of human plasma apolipoproteins A, B and C. *Expos Annu Biochim Med.* 1972;31:145-60.
115. Michael D Feher MDF, William Richmond. *Lipids and Lipid Disorders.* 1997 1997:8.
116. Schaefer JR, Scharnagl H, Baumstark MW, Schweer H, Zech LA, Seyberth H, et al. Homozygous familial defective apolipoprotein B-100. Enhanced removal of

- apolipoprotein E-containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Feb;17(2):348-53.
117. Schaefer EJ, Levy RI. Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med.* 1985 May 16;312(20):1300-10.
118. Malloy MJ, Kane JP. Hypolipidemia. *Med Clin North Am.* 1982 Mar;66(2):469-84.
119. Altenburg M, Arbones-Mainar J, Johnson L, Wilder J, Maeda N. Human LDL receptor enhances sequestration of ApoE4 and VLDL remnants on the surface of hepatocytes but not their internalization in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jun;28(6):1104-10.
120. Ginsberg HN. Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. *Med Clin North Am.* 1994 Jan;78(1):1-20.
121. Spady DK. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation.* 1999 Aug 10;100(6):576-8.
122. Pittman RC, Knecht TP, Rosenbaum MS, Taylor CA, Jr. A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *J Biol Chem.* 1987 Feb 25;262(6):2443-50.
123. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, Ares MP, Banfi C, Calara F, et al. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res.* 1999 May 14;84(9):1085-94.
124. Ting HJ, Stice JP, Schaff UY, Hui DY, Rutledge JC, Knowlton AA, et al. Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res.* 2007 Feb 16;100(3):381-90.
125. Norata GD, Grigore L, Raselli S, Seccomandi PM, Hamsten A, Maggi FM, et al. Triglyceride-rich lipoproteins from hypertriglyceridemic subjects induce a pro-inflammatory response in the endothelium: Molecular mechanisms and gene expression studies. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Apr;40(4):484-94.
126. Libby P. Fat fuels the flame: triglyceride-rich lipoproteins and arterial inflammation. *Circ Res.* 2007 Feb 16;100(3):299-301.
127. Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Apr;15(4):534-42.
128. Mohr D, Stocker R. Radical-mediated oxidation of isolated human very-low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jul;14(7):1186-92.
129. Norata GD, Pirillo A, Callegari E, Hamsten A, Catapano AL, Eriksson P. Gene expression and intracellular pathways involved in endothelial dysfunction induced by VLDL and oxidised VLDL. *Cardiovasc Res.* 2003 Jul 1;59(1):169-80.
130. Kawakami A, Aikawa M, Nitta N, Yoshida M, Libby P, Sacks FM. Apolipoprotein CIII-induced THP-1 cell adhesion to endothelial cells involves pertussis toxin-sensitive G protein- and protein kinase C alpha-mediated nuclear factor-kappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):219-25.
131. Kawakami A, Aikawa M, Libby P, Alcaide P, Lusinskas FW, Sacks FM. Apolipoprotein CIII in apolipoprotein B lipoproteins enhances the adhesion of human monocytic cells to endothelial cells. *Circulation.* 2006 Feb 7;113(5):691-700.
132. Kawakami A, Osaka M, Tani M, Azuma H, Sacks FM, Shimokado K, et al. Apolipoprotein CIII links hyperlipidemia with vascular endothelial cell dysfunction. *Circulation.* 2008 Aug 12;118(7):731-42.
133. Sampedro MC, Motran C, Gruppi A, Kivatinitz SC. VLDL modulates the cytokine secretion profile to a proinflammatory pattern. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jul 13;285(2):393-9.

134. Endemann G, Pronzcek A, Friedman G, Lindsey S, Alderson L, Hayes KC. Monocyte adherence to endothelial cells in vitro is increased by beta-VLDL. *Am J Pathol.* 1987 Jan;126(1):1-6.
135. Zheng XY, Liu L. Remnant-like lipoprotein particles impair endothelial function: direct and indirect effects on nitric oxide synthase. *J Lipid Res.* 2007 Aug;48(8):1673-80.
136. Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):94-8.
137. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999 Jan;40(1):1-16.
138. Mahley RW, Nathan BP, Bellosta S, Pitas RE. Apolipoprotein E: impact of cytoskeletal stability in neurons and the relationship to Alzheimer's disease. *Curr Opin Lipidol.* 1995 Apr;6(2):86-91.
139. Stansby G, Shukla N, Hamilton G, Jeremy J. Comparison of prostanoid synthesis in cultured human vascular endothelial cells derived from omentum and umbilical vein. *Eur J Vasc Surg.* 1991 Oct;5(5):501-6.
140. Shireman PK, Pearce WH. Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease. *AJR Am J Roentgenol.* 1996 Jan;166(1):7-13.
141. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet.* 1994 Apr 2;343(8901):831-6.
142. Hurt-Camejo E, Camejo G. [Why are plasmatic apoB lipoproteins atherogenic? The hypothesis of response to retention]. *Invest Clin.* 2001 May;42 Suppl 1:43-73.
143. Memon RA, Staprans I, Noor M, Holleran WM, Uchida Y, Moser AH, et al. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1536-42.
144. Chang MK, Bergmark C, Laurila A, Horkko S, Han KH, Friedman P, et al. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25;96(11):6353-8.
145. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004 Jul;45(7):1169-96.
146. Xiao Q, Elovson J, Schumaker VN. Rat McA-RH7777 cells efficiently assemble rat apolipoprotein B-48 or larger fragments into VLDL but not human apolipoprotein B of any size. *J Lipid Res.* 2000 Jan;41(1):116-25.
147. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991 Dec;88(6):2039-46.
148. Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;87(3):904-8.
149. Meuwissen M, van der Wal AC, Niessen HW, Koch KT, de Winter RJ, van der Loos CM, et al. Colocalisation of intraplaque C reactive protein, complement, oxidised low density lipoprotein, and macrophages in stable and unstable angina and acute myocardial infarction. *J Clin Pathol.* 2006 Feb;59(2):196-201.
150. Newcombe J, Li H, Cuzner ML. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994 Apr;20(2):152-62.

151. Scanu AM. Lp(a) lipoprotein--coping with heterogeneity. *N Engl J Med.* 2003 Nov 27;349(22):2089-90.
152. Dionyssiou-Asteriou A, Katimertzi M. Endogenous testosterone and serum apolipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis.* 1993 Apr;100(1):123-6.
153. Dangas G, Mehran R, Harpel PC, Sharma SK, Marcovina SM, Dube G, et al. Lipoprotein(a) and inflammation in human coronary atheroma: association with the severity of clinical presentation. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Dec;32(7):2035-42.
154. Sena A, Pedrosa R, Ferret-Sena V, Almeida R, Andrade ML, Morais MG, et al. Interferon beta1a therapy changes lipoprotein metabolism in patients with multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med.* 2000 Mar;38(3):209-13.
155. Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atheroscler Suppl.* 2003 Mar;4(1):21-9.
156. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999 Aug;145(2):227-38.
157. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis.* 2003 Jun;168(2):195-211.
158. O'Connor PM, Zysow BR, Schoenhaus SA, Ishida BY, Kunitake ST, Naya-Vigne JM, et al. Prebeta-1 HDL in plasma of normolipidemic individuals: influences of plasma lipoproteins, age, and gender. *J Lipid Res.* 1998 Mar;39(3):670-8.
159. Cabana VG, Reardon CA, Feng N, Neath S, Lukens J, Getz GS. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *J Lipid Res.* 2003 Apr;44(4):780-92.
160. Nofer JR, Geigenmuller S, Gopfert C, Assmann G, Buddecke E, Schmidt A. High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 10;310(1):98-103.
161. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb 1;23(2):160-7.
162. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006 Sep;58(3):342-74.
163. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 2001 Apr-May;11(3-4):155-61.
164. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 2002 Mar;161(1):1-16.
165. Brewer HB, Jr., Fairwell T, LaRue A, Ronan R, Houser A, Bronzert TJ. The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978 Feb 14;80(3):623-30.
166. Karathanasis SK, Zannis VI, Breslow JL. Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Oct;80(20):6147-51.
167. Bisgaier CL, Glickman RM. Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins. *Annu Rev Physiol.* 1983;45:625-36.
168. Koppaka V, Axelsen PH. Lipoprotein A-I structure. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 Oct;9(7):192-5.
169. Ng DS, Vezina C, Wolever TS, Kuksis A, Hegele RA, Connelly PW. Apolipoprotein A-I deficiency. Biochemical and metabolic characteristics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Dec;15(12):2157-64.
170. Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1743-52.

171. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Jul;16(5):371-86.
172. Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jan;26(1):12-9.
173. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005 Jun 24;96(12):1221-32.
174. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*. 1999 Aug;22(4):336-45.
175. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, Yamashita S, Miller M, Franceschini G, et al. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res*. 2007 Mar;48(3):592-9.
176. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972 Feb 25;46(4):1493-8.
177. Soutar AK, Garner CW, Baker HN, Sparrow JT, Jackson RL, Gotto AM, et al. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 1975 Jul 15;14(14):3057-64.
178. Ramsamy TA, Neville TA, Chauhan BM, Aggarwal D, Sparks DL. Apolipoprotein A-I regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33480-6.
179. Davidson MH, Toth PP. High-density lipoprotein metabolism: potential therapeutic targets. *Am J Cardiol*. 2007 Dec 3;100(11 A):n32-40.
180. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*. 2000 Sep;41(9):1495-508.
181. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res*. 2000 Sep;41(9):1481-94.
182. Brewer HB, Jr. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Mar;24(3):387-91.
183. de Silva HV, Stuart WD, Park YB, Mao SJ, Gil CM, Wetterau JR, et al. Purification and characterization of apolipoprotein J. *J Biol Chem*. 1990 Aug 25;265(24):14292-7.
184. de Silva HV, Harmony JA, Stuart WD, Gil CM, Robbins J. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry*. 1990 Jun 5;29(22):5380-9.
185. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*. 1994 Jan 25;33(3):832-9.
186. Hardardottir I, Moser AH, Fuller J, Fielding C, Feingold K, Grunfeld C. Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamsters. *J Clin Invest*. 1996 Jun 1;97(11):2585-92.
187. Jordan-Starck TC, Lund SD, Witte DP, Aronow BJ, Ley CA, Stuart WD, et al. Mouse apolipoprotein J: characterization of a gene implicated in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 1994 Feb;35(2):194-210.
188. Tschopp J, French LE. Clusterin: modulation of complement function. *Clin Exp Immunol*. 1994 Aug;97 Suppl 2:11-4.
189. French LE, Wohlwend A, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):877-84.

190. Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995 Jul;27(7):633-45.
191. Aronow BJ, Lund SD, Brown TL, Harmony JA, Witte DP. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 15;90(2):725-9.
192. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest.* 1997 Apr 15;99(8):2005-19.
193. Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM). *J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31286-90.
194. Zhang XY, Dong X, Zheng L, Luo GH, Liu YH, Ekstrom U, et al. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization. *Acta Histochem.* 2003;105(1):67-72.
195. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med.* 2005 Apr;11(4):418-22.
196. Xu N, Zhang XY, Dong X, Ekstrom U, Ye Q, Nilsson-Ehle P. Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin-1alpha on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Apr 12;292(4):944-50.
197. Xu N, Nilsson-Ehle P, Ahren B. Correlation of apolipoprotein M with leptin and cholesterol in normal and obese subjects. *J Nutr Biochem.* 2004 Oct;15(10):579-82.
198. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature.* 1995 Apr 6;374(6522):549-53.
199. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jun 11;1301(3):161-73.
200. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, et al. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):774-82.
201. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1996 Apr;7(2):69-76.
202. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1581-90.
203. Gaidukov L, Tawfik DS. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I. *Biochemistry.* 2005 Sep 6;44(35):11843-54.
204. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002 Oct;46(10):2686-94.
205. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem.* 2000 Feb 11;275(6):3957-62.
206. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005 Jun;46(6):1239-47.
207. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis.* 2005 Mar;179(1):69-77.

208. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Sep;18(9):1450-5.
209. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, Oral B, et al. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Apr;19(4):910-7.
210. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, Ishizuka T, et al. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37457-67.
211. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):34480-5.
212. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(4):569-81.
213. Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1982 Jun 25;257(12):6653-5.
214. Galle J, Ochsen M, Schollmeyer P, Wanner C. Oxidized lipoproteins inhibit endothelium-dependent vasodilation. Effects of pressure and high-density lipoprotein. *Hypertension.* 1994 May;23(5):556-64.
215. Tamama K, Tomura H, Sato K, Malchinkhuu E, Damirin A, Kimura T, et al. High-density lipoprotein inhibits migration of vascular smooth muscle cells through its sphingosine 1-phosphate component. *Atherosclerosis.* 2005 Jan;178(1):19-23.
216. Damirin A, Tomura H, Komachi M, Liu JP, Mogi C, Tobo M, et al. Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 May;292(5):H2513-22.
217. Matsuo Y, Miura S, Kawamura A, Uehara Y, Rye KA, Saku K. Newly developed reconstituted high-density lipoprotein containing sphingosine-1-phosphate induces endothelial tube formation. *Atherosclerosis.* 2007 Sep;194(1):159-68.
218. Alenezi MY, Marcil M, Genest J. High-density lipoproteins: target for cardiovascular disease prevention. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* [doi: DOI: 10.1016/j.ddmec.2004.09.008]. 2004;1(2):159-64.
219. Ong AC, Jowett TP, Moorhead JF, Owen JS. Human high density lipoproteins stimulate endothelin-1 release by cultured human renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 1994 Nov;46(5):1315-21.
220. Sugiyama S, Kugiyama K, Matsumura T, Suga S, Itoh H, Nakao K, et al. Lipoproteins regulate C-type natriuretic peptide secretion from cultured vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):1968-74.
221. Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996 Jan;13(1):73-88.
222. Hassall DG, Owen JS, Bruckdorfer KR. The aggregation of isolated human platelets in the presence of lipoproteins and prostacyclin. *Biochem J.* 1983 Oct 15;216(1):43-9.
223. Nofer JR, Walter M, Kehrel B, Wierwille S, Tepel M, Seedorf U, et al. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jun;18(6):861-9.
224. Carson SD. Plasma high density lipoproteins inhibit the activation of coagulation factor X by factor VIIa and tissue factor. *FEBS Lett.* 1981 Sep 14;132(1):37-40.

225. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation*. 1996 Nov 1;94(9):2057-63.
226. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003 May;31(5):1359-66.
227. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, et al. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia*. 2000 Mar;43(3):312-20.
228. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(4):529-41.
229. Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, et al. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem*. 2005 Jan 7;280(1):38-47.
230. Podbielska M, Hogan EL. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *Mult Scler*. 2009 Sep;15(9):1011-29.
231. Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem*. 2007 Mar;100(6):1431-48.
232. Tzakos AG, Troganis A, Theodorou V, Tselios T, Svarnas C, Matsoukas J, et al. Structure and function of the myelin proteins: current status and perspectives in relation to multiple sclerosis. *Curr Med Chem*. 2005;12(13):1569-87.
233. Johns TG, Bernard CC. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem*. 1999 Jan;72(1):1-9.
234. Bo L, Geurts JJ, van der Valk P, Polman C, Barkhof F. Lack of correlation between cortical demyelination and white matter pathologic changes in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2007 Jan;64(1):76-80.
235. Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2005 Jan;4(1):32-41.
236. Huang Y, Ji ZS, Brecht WJ, Rall SC, Jr., Taylor JM, Mahley RW. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Dec;19(12):2952-9.
237. Fazio S, Linton MF, Swift LL. The cell biology and physiologic relevance of ApoE recycling. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Jan;10(1):23-30.
238. Ruiz J, Kouliavskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res*. 2005 Aug;46(8):1721-31.
239. Rebeck GW, LaDu MJ, Estus S, Bu G, Weeber EJ. The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. *Mol Neurodegener*. 2006;1:15.
240. Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, et al. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem*. 2003 Dec 5;278(49):48529-33.
241. Misra UK, Adlakhia CL, Gawdi G, McMillian MK, Pizzo SV, Laskowitz DT. Apolipoprotein E and mimetic peptide initiate a calcium-dependent signaling response in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2001 Oct;70(4):677-83.
242. Pinholt M, Frederiksen JL, Christiansen M. The association between apolipoprotein E and multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2006 Jun;13(6):573-80.
243. Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent

- neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 10;92(21):9480-4.
244. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, et al. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):11183-6.
245. Ji ZS, Mullendorff K, Cheng IH, Miranda RD, Huang Y, Mahley RW. Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid beta peptide: lysosomal stability and neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2683-92.
246. Belinson H, Lev D, Masliah E, Michaelson DM. Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits. *J Neurosci*. 2008 Apr 30;28(18):4690-701.
247. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507-37.
248. Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC, et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci*. 2005 Apr;8(4):468-75.
249. Kalyvas A, Baskakis C, Magrioti V, Constantinou-Kokotou V, Stephens D, Lopez-Vales R, et al. Differing roles for members of the phospholipase A2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1221-35.
250. Sena A, Couderc R, Ferret-Sena V, Pedrosa R, Andrade ML, Araujo C, et al. Apolipoprotein E polymorphism interacts with cigarette smoking in progression of multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2009 Jul;16(7):832-7.
251. Giubilei F, Antonini G, Di Legge S, Sormani MP, Pantano P, Antonini R, et al. Blood cholesterol and MRI activity in first clinical episode suggestive of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2002 Aug;106(2):109-12.
252. Jamroz-Wisniewska A, Beltowski J, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H. Paraoxonase 1 activity in different types of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009 Mar;15(3):399-402.
253. Carlsson J, Armstrong VW, Reiber H, Felgenhauer K, Seidel D. Clinical relevance of the quantification of apolipoprotein E in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 1991 Feb 15;196(2-3):167-76.
254. Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, et al. Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2006 Feb;129(Pt 2):517-26.
255. Mehta LR, Dworkin RH, Schwid SR. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2009 Feb;5(2):82-92.
256. Esparza ML, Sasaki S, Kesteloot H. Nutrition, latitude, and multiple sclerosis mortality: an ecologic study. *Am J Epidemiol*. 1995 Oct 1;142(7):733-7.
257. Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother*. 2002 Oct;56(8):388-96.
258. Mertin J, Stackpoole A, Shumway S. Nutrition and immunity: the immunoregulatory effect of n-6 essential fatty acids is mediated through prostaglandin E. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985;77(4):390-5.
259. Gallai V, Sarchielli P, Trequattrini A, Murasecco D. Supplementation of polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Ital J Neurol Sci*. 1992 Jun;13(5):401-7.
260. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 2006 Mar;45(2):120-59.

261. Yu RK, Ariga T. The role of glycosphingolipids in neurological disorders. Mechanisms of immune action. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Jun 19;845:285-306.
262. Dasgupta S, Lavery SB, Hogan EL. 3-O-acetyl-sphingosine-series myelin glycolipids: characterization of novel 3-O-acetyl-sphingosine galactosylceramide. *J Lipid Res.* 2002 May;43(5):751-61.
263. Ugarova TP, Yakubenko VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:368-85.
264. Akassoglou K, Adams RA, Bauer J, Mercado P, Tseveleki V, Lassmann H, et al. Fibrin depletion decreases inflammation and delays the onset of demyelination in a tumor necrosis factor transgenic mouse model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6698-703.
265. Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol.* 2003 Oct;201(2):319-27.
266. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol.* 2004 Mar;251(3):261-8.
267. Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema DJ, et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol.* 2006 Apr;253(4):483-7.
268. Walters CE, Pryce G, Hankey DJ, Sebti SM, Hamilton AD, Baker D, et al. Inhibition of Rho GTPases with protein prenyltransferase inhibitors prevents leukocyte recruitment to the central nervous system and attenuates clinical signs of disease in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):4087-94.
269. Lucas M, Rodriguez MC, Gata JM, Zayas MD, Solano F, Izquierdo G. Regulation by interferon beta-1a of reactive oxygen metabolites production by lymphocytes and monocytes and serum sulfhydryls in relapsing multiple sclerosis patients. *Neurochem Int.* 2003 Jan;42(1):67-71.
270. Constantinescu CS, Freitag P, Kappos L. Increase in serum levels of uric acid, an endogenous antioxidant, under treatment with glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2000 Dec;6(6):378-81.
271. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:89-118.
272. Sena A, Pedrosa R, Morais MG. Beneficial effect of statins in multiple sclerosis: is it dose-dependent? *Atherosclerosis.* 2007 Apr;191(2):462.
273. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3505-16.
274. Mehindate K, Sahlas DJ, Frankel D, Mawal Y, Liberman A, Corcos J, et al. Proinflammatory cytokines promote glial heme oxygenase-1 expression and mitochondrial iron deposition: implications for multiple sclerosis. *J Neurochem.* 2001 Jun;77(5):1386-95.
275. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003 Aug;24(8):449-55.
276. Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, Penz M, Steindl-Munda P, Wrba F, et al. Hepatic iron concentration does not predict response to standard and pegylated-IFN/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2004 Jun;40(6):1018-22.
277. Park SY, Lee JH, Kim YK, Kim CD, Rhim BY, Lee WS, et al. Cilostazol prevents remnant lipoprotein particle-induced monocyte adhesion to endothelial cells by suppression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 expression via lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Mar;312(3):1241-8.

278. Santos M, do Carmo Costa M, Edite Rio M, Jose Sa M, Monteiro M, Valenca A, et al. Genotypes at the APOE and SCA2 loci do not predict the course of multiple sclerosis in patients of Portuguese origin. *Mult Scler*. 2004 Apr;10(2):153-7.
279. Burwick RM, Ramsay PP, Haines JL, Hauser SL, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, et al. APOE epsilon variation in multiple sclerosis susceptibility and disease severity: some answers. *Neurology*. 2006 May 9;66(9):1373-83.
280. Sundstrom P, Nystrom L, Hallmans G. Smoke exposure increases the risk for multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2008 Jun;15(6):579-83.
281. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):372-7.
282. Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, et al. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem*. 2004 Apr;89(2):337-43.
283. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1113-23.
284. Gahring LC, Meyer EL, Rogers SW. Nicotine-induced neuroprotection against N-methyl-D-aspartic acid or beta-amyloid peptide occur through independent mechanisms distinguished by pro-inflammatory cytokines. *J Neurochem*. 2003 Dec;87(5):1125-36.
285. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S156-61.
286. van Vliet P, Westendorp RG, Eikelenboom P, Comijs HC, Frolich M, Bakker E, et al. Parental history of Alzheimer disease associated with lower plasma apolipoprotein E levels. *Neurology*. 2009 Sep 1;73(9):681-7.
287. Garg N, Weinstock-Guttman B, Bhasi K, Locke J, Ramanathan M. An association between autoreactive antibodies and anti-interferon-beta antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2007 Aug;13(7):895-9.
288. Sena A, Pedrosa R, Morais MG. Statins for multiple sclerosis. *Lancet*. 2004 Jul 31-Aug 6;364(9432):412; author reply -3.
289. Birnbaum G, Cree B, Altafullah I, Zinser M, Reder AT. Combining beta interferon and atorvastatin may increase disease activity in multiple sclerosis. *Neurology*. 2008 Oct 28;71(18):1390-5.
290. Hartung HP, Polman C, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Havrdova E, et al. Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis : expert panel report. *J Neurol*. 2007 Jul;254(7):827-37.
291. M S. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002:372-7.
292. Mahdi H, Fisher BA, Kallberg H, Plant D, Malmstrom V, Ronnelid J, et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1319-24.
293. Casoni F, Merelli E, Bedin R, Sola P, Bertolotto A, Faglioni P. Is serum neopterin level a marker of responsiveness to interferon beta-1a therapy in multiple sclerosis? *Acta Neurol Scand*. 2004 Jan;109(1):61-5.
294. Horkko S, Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Silverman G, Palinski W, et al. Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jun 15;28(12):1771-9.
295. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999 Jul;145(1):33-43.

296. Mossberg N, Movitz C, Hellstrand K, Bergstrom T, Nilsson S, Andersen O. Oxygen radical production in leukocytes and disease severity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 Aug 18;213(1-2):131-4.
297. Alves JD, Ames PR. Atherosclerosis, oxidative stress and auto-antibodies in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Immunobiology*. 2003;207(1):23-8.
298. Ames PR, Margarita A, Alves JD. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis: insights from systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009 Aug;37(1):29-35.
299. Haque S, Mirjafari H, Bruce IN. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Aug;19(4):338-43.
300. Sena A, Pedrosa R, Graca Morais M. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2003 Jun;250(6):754-5.
301. Li L, Thompson PA, Kitchens RL. Infection induces a positive acute phase apolipoprotein E response from a negative acute phase gene: role of hepatic LDL receptors. *J Lipid Res*. 2008 Aug;49(8):1782-93.
302. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2009 Sep 1;73(9):696-701.

ANEXOS

Estudo 1

Estudo 2

Estudo 3

Estudo 4

Estudo 5

Estudo 6

