

**U. PORTO**



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## **FERRO, FERRITINA, TRANSFERRINA E RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**



**Henrique Luís Lopes Ferreira Reguengo da Luz**

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

*FERRO, FERRITINA, TRANSFERRINA E  
RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA  
EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA*

Dissertação apresentada à Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas, realizada sob a orientação científica da Prof. Agostinho Franklim Marques, Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**HENRIQUE LUÍS LOPES FERREIRA REGUENGO DA LUZ**

Setembro 2009

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS  
PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO  
INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Somos o que fazemos, mas principalmente somos o que fazemos para mudar o que somos”

Eduardo Galeano

## AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos, pelo seu amor, compreensão e tolerância.

À minha mulher, pelo desafio, entusiasmo e companheirismo.

A toda a restante família, pelo estímulo e apoio que sempre demonstraram.

Ao meu orientador, Prof. Doutor Franklim Marques, pela confiança e disponibilidade constantes.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Berta Martins, pelo contínuo estímulo e ajuda para ultrapassar todas as dificuldades.

Ao Prof. Doutor Paulo Pinho e Costa, Dr.<sup>a</sup> Ana Martins e Dr.<sup>a</sup> Andreia Bettencourt, pela ajuda e colaboração incondicional.

À Dr.<sup>a</sup> Fernanda Bravo que sempre me “empurrou” para a frente em direcção a novos desafios.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra me acompanharam nesta caminhada, os meus sinceros agradecimentos.

# ÍNDICE

Lista de abreviaturas	I
Lista de tabelas	III
Lista de gráficos	V
Lista de figuras	VI
RESUMO/ABSTRACT .....	7
Resumo.....	7
Abstract .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA - A DOENÇA.....	9
1.2 CLÍNICA, PATOFISIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR.....	10
1.3 O FERRO E SEU METABOLISMO .....	18
1.3.1 Absorção do ferro .....	18
1.4 FERRO, ENVELHECIMENTO CEREBRAL E NEURODEGENERAÇÃO .....	27
1.4.1 Toxicidade do ferro .....	30
1.4.2 Mecanismos de protecção de lesões induzidas pelo ferro .....	32
1.4.3 Ferro e doenças neurológicas .....	33
1.4.4 Ferro e Esclerose Múltipla .....	34

2	OBJECTIVO .....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO .....	44
4.1	Resultados globais.....	44
4.2	FERRO .....	46
4.3	TRANSFERRINA.....	50
4.4	RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA.....	57
4.5	FERRITINA.....	62
5	CONCLUSÃO.....	75
6	BIBLIOGRAFIA .....	77

## Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina trifostato
%	Porcentagem
β	Beta
BHE	Barreira hematoencefálica
BMPs	“Biding morphogenetic proteins”
μg	Micrograma
μl	Microlitro
°C	Graus Centígrados
ADN	Ácido desoxiribonucleico
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMT1	Divalent metal transporter 1
EAE	Encefalite Auto-imune Experimental
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
ERFs	Elementos reguladores do ferro
EM	Esclerose múltipla
EMRR	Esclerose múltipla exacerbação-remissão
EMP	Esclerose múltipla progressiva
EMPP	Esclerose múltipla primariamente progressiva
EMSP	Esclerose múltipla secundariamente progressiva
ERO	Espécies reactivas ao oxigénio
IL-6	Interleuquina-6
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
Kb	Kilobases
MBP	Proteína básica de mielina (Myelin Basic Protein)
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade
MOP	Glicoproteína mielina de oligodendrocito
Min	Minuto
ml	Mililitro
MMPs	Metaloproteases da matrix
MRI	Ressonância magnética nuclear
Nramp	“Natural resistance associate macrophage protein”
OPC	Células precursoras de oligodendrocitos

pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
PRFs	Proteínas reguladoras do ferro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
Rtr	Receptor da transferrina
Rtr1	Receptor da transferrina 1
Rtr2	Receptor da transferrina 2
sRtr	Receptor solúvel da transferrina
SNC	Sistema nervoso central

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Interferências analíticas no doseamento de ferro .....	39
Tabela 2 - Valores de referência do ferro considerados para população “normal” .....	40
Tabela 3 – Interferências analíticas no doseamento de ferritina .....	40
Tabela 4 - Valores de referência do ferritina considerados para população “normal” .....	41
Tabela 5 – Interferências analíticas no doseamento de transferrina .....	41
Tabela 6 - Valores de referência de transferrina considerados para população “normal” .....	42
Tabela 7 – Interferências analíticas no doseamento de receptores solúveis de transferrina .....	43
Tabela 8 - Valores de referência de receptores solúveis de transferrina considerados para população “normal” .....	43
Tabela 9 – Resultados globais do conjunto de doentes analisado .....	45
Tabela 10 – Resultados globais do grupo de controlo.....	45
Tabela 11 – Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com EM e o grupo controlo.....	46
Tabela 12 - Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes EMRR e EMCP. ....	47
Tabela 13- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes EMPP e EMSP.....	47
Tabela 14- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com EDSS<3 ou EDSS>6. ....	48
Tabela 15- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com EM benigna e não benigna.....	48
Tabela 16- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com idade superior ou inferior a 20 anos. ....	49
Tabela 17- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com doença há mais de 10 ou há menos de 10 anos.....	50
Tabela 18 - - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EM .....	51
Tabela 19- Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EMRR e EMCP.....	52
Tabela 20 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EMPP e EMSP. ....	52
Tabela 21- Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EDSS<3 e EDSS>6.....	53
Tabela 22- Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EM benigna e EM não benigna.....	54
Tabela 23 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com idade inferior a 20 anos ou superior a 20 anos....	54
Tabela 24 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EM há mais de 10 anos ou há menos de 10 anos. .....	55

Tabela 25 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes em surto e doentes sem surto. ....	55
Tabela 26 - Comparação dos resultados da Transferrina no grupo de doente a tomar Interferon beta e o grupo de controlo. ....	56
Tabela 27 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina no grupo de doentes com EM e o grupo controlo. ...	57
Tabela 28 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EMRR e EMCP. ....	59
Tabela 29 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EMPP e EMSP. ....	60
Tabela 30 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EDSS<3 e EDSS>6. ....	60
Tabela 31 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EM benigna e doentes com EM não benigna. ....	61
Tabela 32 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com idade inferior a 20 anos ou superior a 20 anos. ....	61
Tabela 33 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EM há menos de 10 anos ou há mais de 10 anos. ....	62
Tabela 34 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EM e o grupo controlo. ....	63
Tabela 35 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EMRR e EMCP. ....	64
Tabela 36 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EMPP e EMSP. ....	65
Tabela 37 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EDSS <3 e EDSS >6. ....	65
Tabela 38 - Resultados dos conjuntos de doentes com patologia benigna e maligna. ....	67
Tabela 39 - Resultados dos conjuntos de doentes com idade inferior a 20 ou superior a 20 anos de idade. ....	67
Tabela 40 - Resultados dos conjuntos de doentes com esta patologia à menos ou mais de 10 anos. ....	68
Tabela 41 - Resultados dos conjuntos de doentes com EM em surto ou EM sem surto. ....	68
Tabela 42 - Resultados dos conjuntos de doentes com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de controlo. ....	69
Tabela 43 - Resultados dos conjuntos de doentes do sexo masculino com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de controlo. ....	69
Tabela 44 - Resultados dos conjuntos de doentes do sexo feminino com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de controlo. ....	70
Tabela 45 - Resultados dos conjuntos de doentes do sexo masculino com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de doentes onde se tinha a certeza de não estar a efectuar terapêutica. ....	70
Tabela 46 – Tabela global de resultados dos vários conjuntos de doentes analisados ....	72

## Lista de gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica da variação da transferrina entre doentes de EM em surto e o grupo controlo. ....	51
Gráfico 2-Representação gráfica da variação da transferrina entre doentes de EM em surto e sem surto. ....	56
Gráfico 3 – Representação gráfica da variação dos valores de concentração dos receptores solúveis de transferrina entre os doentes de EM e a população controlo. ....	58
Gráfico 4 – Representação gráfica da correlação de Pearson entre a classificação EDSS dos doentes e os valores de ferritina. ....	66
Gráfico 5 – Valores de ferro nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla. ....	73
Gráfico 6 - Valores de transferrina nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla ....	73
Gráfico 7 - Valores de ferritina nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla ....	74
Gráfico 8 - Valores de receptores solúveis de transferrina nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla ....	74

## Lista de figuras

Figura 1 – Prevalência de esclerose múltipla (nº de casos por 100.000 habitantes) .....	10
Figura 2 – Esclerose Múltipla .....	13
Figura 3 - Um modelo de imunopatogenese da esclerose múltipla .....	16
Figura 4 – Papel dos diferentes padrões de expressão de canais de sódio Na <sub>v</sub> 1.2 e Na <sub>v</sub> 1.6 na lesão axonal.....	17
Figura 5 - Transporte de ferro através do enterocito.....	20
Figura 6 - Endocitose do complexo ferro,transferrina e receptor de transferrina .....	22
Figura 7 - Regulação da produção do receptor de transferrina (Rtr) e ferritina ao nível do mRNA.....	24
Figura 8 - Regulação molecular da produção de hepcidina .....	26
Figura 9 - Imagens de MRI.....	27
Figura 10 - Um modelo para absorção e excreção de ferro neuronal. ....	29
Figura 11 - Processos bioquímicos de formação de espécies reactivas ao oxigénio e lesão tecidual .....	31

# RESUMO/ABSTRACT

## *Resumo*

A Esclerose Múltipla é uma doença crónica de natureza inflamatória, do sistema nervoso central (SNC), caracterizada do por uma desregulação na produção de citocinas, inflamação e stress oxidativo que resulta num processo de desmielinização multifocal. Nos últimos anos o papel do stress oxidativo na patogénese das doenças neurodegenerativas tem despertado o interesse dos investigadores. O ferro é um elemento essencial ao normal funcionamento do Sistema Nervoso, tendo um papel relevante ao nível da formação da mielina, no funcionamento das células efectoras do sistema imune, no metabolismo oxidativo e produção de radicais livres e intervindo como cofactor na síntese de neurotransmissores. O objectivo deste trabalho é o de estudar a possível influência de alterações no metabolismo do ferro na patogénese de Esclerose Múltipla, num grupo de doentes Portugueses com esta patologia. Estudaram-se as concentrações séricas de ferro, transferrina, receptores solúveis de transferrina e ferritina. Os valores médios para todos os analitos na nossa população de estudo estão compreendidos no intervalo de normalidade definido por esses valores de referência. Detectaram-se algumas diferenças sendo que as mais relevantes e estatisticamente significativas foram: Os níveis de ferritina estão significativamente mais elevados nos doentes com Esclerose Múltipla do que no grupo controlo e encontram-se mais elevados embora sem significância estatística nos doentes com EMCP do que nos com EMRR e ainda mais elevado nos doentes com EMPP do que nos com EMSP. Os níveis de ferro, transferrina, e receptores solúveis de transferrina estão mais elevados nos doentes com Esclerose Múltipla Exacerbação-Remissão do que nos com Esclerose Múltipla Crónica Progressiva. Os níveis de ferritina estão significativamente mais elevados nos doentes com Esclerose Múltipla do que no Grupo Controlo. Existe ainda uma diferença significativa entre os valores de transferrina e ferritina nos doentes de EM a efectuar terapêutica com interferon e os valores encontrados no grupo controlo. Não foram encontradas diferenças nos valores de ferro, ferritina, transferrina e receptores solúveis de transferrina, entre os doentes com EM em surto e os doentes que não se encontram em surto.

## **Palavras-chave:**

Esclerose Múltipla, Ferro, Ferritina, Transferrina, Receptores solúveis de transferrina.



## ***INTRODUÇÃO***

O ferro é um elemento essencial como co-factor de muitas proteínas envolvidas nos processos fisiológicos normais do tecido nervoso, nomeadamente na neurotransmissão, mielinização e divisão celular [1, 2]. Apesar deste papel positivo e fisiologicamente indispensável do ferro, têm vindo a ser evidenciado que a acumulação de ferro no tecido nervoso está correlacionada com várias patologias do SNC. Sabe-se ainda, que com o processo de envelhecimento tende a haver um aumento da quantidade de ferro que se deposita no cérebro e que os processos de stress oxidativo, passíveis de serem induzidos pelo ferro, podem causar neurodegeneração. Uma das patologias neurodegenerativas que tem vindo a ser associada a este fenómeno é a Esclerose múltipla (EM).

### ***1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA - A DOENÇA***

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crónica do SNC, de natureza auto-imune, desmielinizante, caracterizada por uma disfunção no funcionamento das células efectoras do sistema imune, inflamação e stress oxidativo resultando num processo de desmielinização multifocal [3].

O alvo principal nesta patologia é a bainha de mielina que reveste os axónios, havendo também lesão axonal e dos oligodendrócitos (células produtoras de mielina no SNC). As lesões na mielina levam a alterações na condução dos impulsos nervosos, nomeadamente ao atraso ou desaparecimento destes impulsos e conseqüente aparecimento de défices em diferentes funções neurológicas.

A EM é a primeira causa de incapacidade neurológica não traumática em adultos jovens, nos países ocidentais. A prevalência desta patologia foi recentemente avaliada num estudo da Organização Mundial de Saúde[4]. Com uma participação de mais de 100 países representativa de cerca de 80% da população mundial, este estudo permitiu obter alguns dados epidemiológicos interessantes:

Nenhum dos países participantes está livre desta patologia.

Globalmente, a prevalência pontual de EM é de 30 casos /100.000 habitantes.

A prevalência de EM aumenta com a latitude seja no hemisfério norte seja no hemisfério sul

Estima-se que cerca de 1.3 milhões de pessoas, a nível mundial, sofram desta patologia. O número deverá ser ainda maior dado a falta de registos em alguns países

Os sintomas iniciais da EM aparecem principalmente entre os 25 e os 35 anos de idade

A prevalência no sexo feminino é duas vezes superior à do sexo masculino

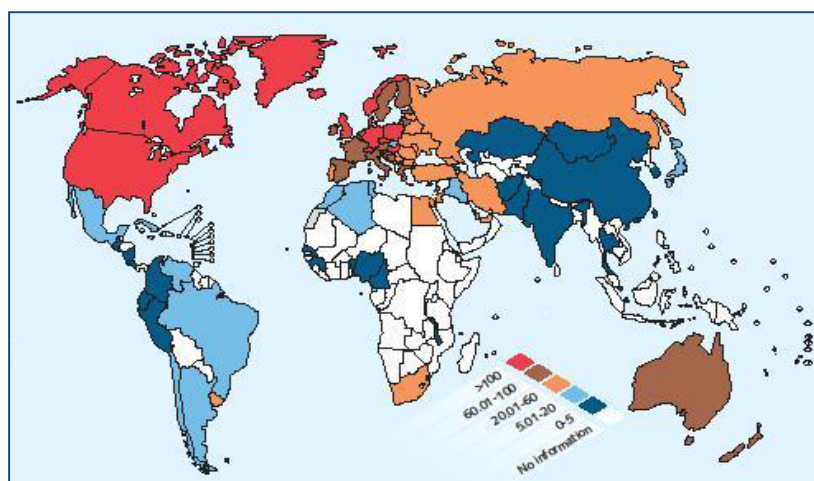


Figura 1 – Prevalência de esclerose múltipla (nº de casos por 100.000 habitantes)

Fonte: Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008, WHO

## **1.2 CLÍNICA, PATOFISIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR.**

A EM pertence a um grupo de patologias inflamatórias desmielinizantes do SNC, que inclui outras entidades como a Encefalomielite disseminada aguda, Neuromielite óptica ou doença de Devic ou a Esclerose concêntrica de Baló.

Todas estas patologias têm como pano de fundo um quadro inflamatório com linfócitos e macrófagos ou microglia activados e apresentam lesões de desmielinização. É comumente aceite que a força motriz na origem das lesões tecidulares (placas) é um processo inflamatório de origem auto-imune[5].

O aparecimento de EM caracteriza-se em 85% dos casos, pelo aparecimento num adulto jovem (20 – 40 anos) de um quadro de nevrite óptica, síndrome medular ou síndrome do tronco cerebral. Em 90% destes casos a doença caracteriza-se por episódios de exacerbação (surto) e de remissão (seja espontânea ou com corticoterapia). Estas são as formas por surtos (EM relapsing-remmiting) (EMRR), que após alguns anos de doença podem evoluir para formas secundariamente progressivas (EMSP) o que acontece em 60% dos casos. Em 10% dos doentes o curso é progressivo desde o início da doença – esclerose

múltipla primariamente progressiva (EMPP) [6]. Um número significativo de “exacerbações” é precedido de quadros infecciosos de origem viral [7] ou outro tipo de stress físico e observa-se uma diminuição dos surtos durante a gravidez [8].

O diagnóstico de EM é baseado na história clínica, exame neurológico e testes paraclínicos, nomeadamente a Ressonância Magnética Nuclear (MRI), potenciais evocados (PE) e testes laboratoriais (sangue e líquido cefaloraquidiano (LCR)). Desde a década de 50, vários critérios de diagnóstico de EM têm sido propostos, todos eles englobando dois aspectos essenciais: a) demonstração de duas ou mais lesões no SNC disseminadas no tempo e espaço; b) exclusão de condições que possam exprimir síndrome clínico semelhante, dado que não existe um marcador biológico desta doença. Actualmente são utilizados os “McDonald revised criteria” [9, 10], que se baseiam essencialmente no quadro clínico e nas características das lesões demonstradas nos exames de MRI.

O recurso a MRI, revelou que o dano que esta patologia produz está amplamente espalhado pelo cérebro e medula espinal [11]. Esta metodologia (MRI), complementada por métodos histopatológicos, permitiu constatar a existência de diferentes alterações morfológicas no tecido nervoso cerebral [12] [13, 14].

Os factores subjacentes a esta heterogeneidade, não são ainda completamente compreendidos mas incluirão a existência de determinadas características genéticas, que se traduzirão em alterações do sistema imunológico e/ou aumento da susceptibilidade do tecido nervoso do SNC a fenómenos inflamatórios e redução da capacidade regenerativa (figura 1).

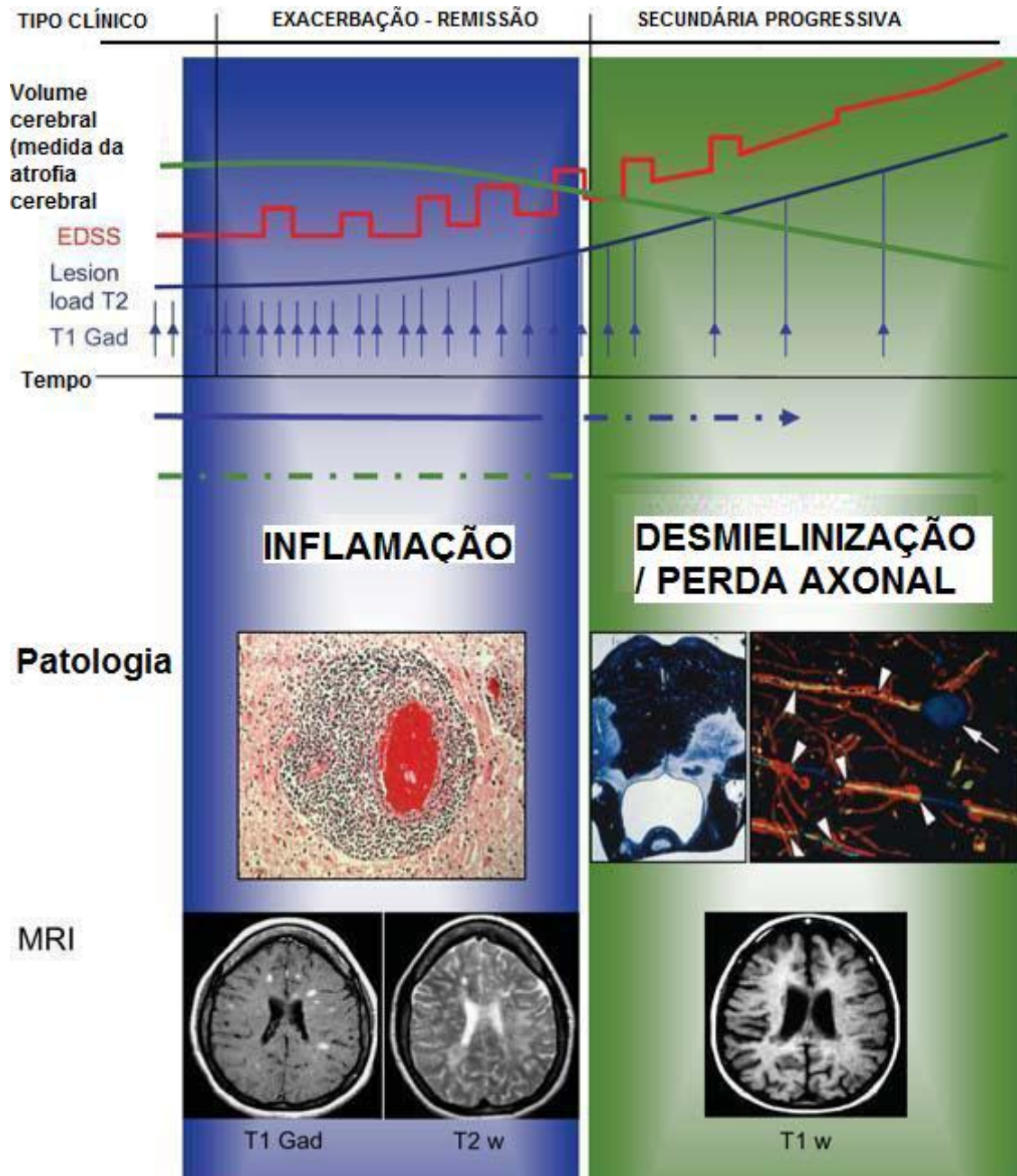
Grande parte dos estudos da patogénese e patofisiologia da Esclerose Múltipla têm estado focados nas lesões de matéria branca desmielinizada, encontradas na fase crónica da doença. No entanto, todas estas observações indicam-nos que a EM deverá ser uma doença complexa, pelo que o seu estudo deverá ser mais abrangente.

A EM é habitualmente considerada uma doença auto-imune mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 [15, 16], apesar de ainda não se ter demonstrado a existência de antigénios próprios especificamente visados pela resposta imunológica, nem a existência de uma quebra na tolerância a estes antigénios durante a doença.

Em indivíduos geneticamente susceptíveis existem linfócitos T auto-reactivos no estado “virgem”, linfócitos que quando expostos a um estímulo desencadeador (como por exemplo uma infecção vírica), ficam activados, tendo como alvo da sua acção as proteínas

do seu próprio organismo. Na EM, estas proteínas situam-se predominantemente na matéria branca do SNC [17-20].

O local onde se efectua a transformação destes linfócitos em linfócitos T autoreactivos, é ainda fonte de controvérsia, mas estudos recentes em modelos animais de Encefalite Autoimune Esclerosante (EAE) caracterizaram um “epítape spreading” característico da EAE e EM que aparece apenas no SNC [21].



**Figura 2 – Esclerose Múltipla – esquemas representativos de alguns aspectos clínicos e fisiológicos**

**Topo:** Representação esquemática da evolução clínica da EM utilizando a escala clínica (EDSS, linha vermelha); a frequência de eventos inflamatórios quando estudados por MRI (lesões observadas com ponderação em T1e contraste, mostrando “abertura da barreira hemato-encefálica, setas azuis); T2 “lesion load” documentando locais de lesão tecidular (linha azul); atrofia cerebral (linha verde).

**Patologia:** Características principais da Esclerose Múltipla: Imagem esquerda, inflamação perivascular com células mononucleares e permeabilidade da barreira hemato-encefálica (H.F. McFarland, NIB, NINDS, NIH); Imagem direita, áreas desmielinizadas mostradas a azul claro e branco, e mais à direita “transacções” axonais ( estrutura azul e forma de cebola) e desmielinização segmentar.

**RMN:** características típicas na RMN. Imagem esquerda: Imagem com ponderação em T1 e contraste com Gadolinium. As lesões a branco indicam zonas de inflamação recente e de abertura da barreira hemato-encefálica. A imagem seguinte, com ponderação em T2 mostra os ventrículo cheios de LCR a branco e lesões de esclerose múltipla no parenquima cerebral. Imagem direita: atrofia cerebral com ventrículos cerebrais e sulco cortical aumentados.

Fonte: Sospedra, M. and R. Martin, Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 683-747

A sequência de eventos que levam ao aparecimento desta patologia pode ser sintetizadas em 4 etapas distintas:

Iniciação

Transmigração

Cascata pró-inflamatória

Desmielinização

O processo inicia-se com o aparecimento na circulação sanguínea de linfócitos T (normalmente suprimidos por processos reguladores dos próprios linfócitos), activados contra a mielina [22]. Seguidamente, a fase de transmigração caracteriza-se pela “upregulation” (aumento de expressão) “ e activação de moléculas de adesão nos linfócitos T activados, alterações nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica e migração destes linfócitos T para o espaço perivascular que envolve os microvasos do SNC, nomeadamente as vénulas pós-capilares. Neste espaço, linfócitos T pró-inflamatórios TH-1 libertam imunomediadores como o interferon- $\gamma$  e citoquinas, que activam as células gliais. Quando activadas, estas células induzem fenómenos de transmigração ou pró-inflamação, que levam células mononucleares presentes no sangue periférico a migrar para o SNC, provocando uma inflamação intratecal [23] que dará origem a desmielinização e lesão nos axónios destas células [24, 25].

Embora classicamente se considere a EM uma doença mediada por linfócitos T, existem poucas evidências da citotoxicidade directa destas células, apesar de as encontrarmos nas lesões do tecido nervoso do SNC. Acredita-se que o papel destas células na patofisiologia desta doença se processe através da produção de citoquinas e activação de macrófagos.

De facto, os macrófagos e também as células dendríticas, produzem e libertam numerosos mediadores (ex: TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 [26] , eicosanoides, factores do complemento, espécies reactivas ao oxigénio (ERO) e óxido nítrico [27], que podem provocar lesão tecidual.

Outro elemento a ter em conta na análise da fisiopatologia desta patologia, é a concentração de glutamato no tecido nervoso. O glutamato é o principal neurotransmissor no cérebro de mamíferos, responsável por cerca de um terço das sinapses do SNS. Em condições que induzam acumulação de glutamato na fenda sináptica (despolarização prolongada da terminação nervosa, recaptação ineficaz de glutamato ou introdução de

glutamato por outra via), este pode desencadear fenómenos de excitotoxicidade, causando despolarização excessiva do neurónio pós-sináptico e conseqüentemente alterações da homeostasia iónica e energética, activação de enzimas líticas mediadas por Ca<sup>2+</sup>, formação de radicais livres, lesão mitocondrial e edema osmótico, podendo originar lise celular e morte [28]. Foram detectadas concentrações elevadas de glutamato no LCR e em placas de MS[29, 30] no tecido nervoso do SNC[31]. Este glutamato poderá ser tóxico quer para os oligodendrócitos quer para a própria mielina e axónios [32-34].

A presença de níveis aumentados de imunoglobulinas no LCR de doentes com EM, foi descrita pela primeira vez em 1948 [35]. Anticorpos contra proteínas específicas - proteína mielina básica - “Myelin Basic Protein” (MBP) e Glicoproteína mielina de oligodendrocito (MOG) [36, 37] foram detectados em placas de EM de doentes em surto. No entanto, a presença destes anticorpos não parece ter ligação com o mecanismo iniciador da doença. A sua ligação à mielina em desintegração é no entanto tida como um processo potencializador da destruição desta. A presença de IgGs que revestem os macrófagos sugere que a fagocitose da mielina mediada por anticorpos será um dos mecanismos envolvidos na patogénese desta doença [38].

Foi ainda possível identificar a presença de factores de complemento em placas de EM [39], sendo que só se observou a presença de “complexos de ataque” em placas activas. Assim, admite-se que este intervenha nos processos de desmielinização e formação de placas na MS.

Um modelo de imunopatogenese proposto para a esclerose múltipla é o seguinte: Após exposição a determinados antigénios ambientais, em indivíduos com predisposição genética, linfócitos T reactivos à mielina migram da circulação periférica para o SNC.

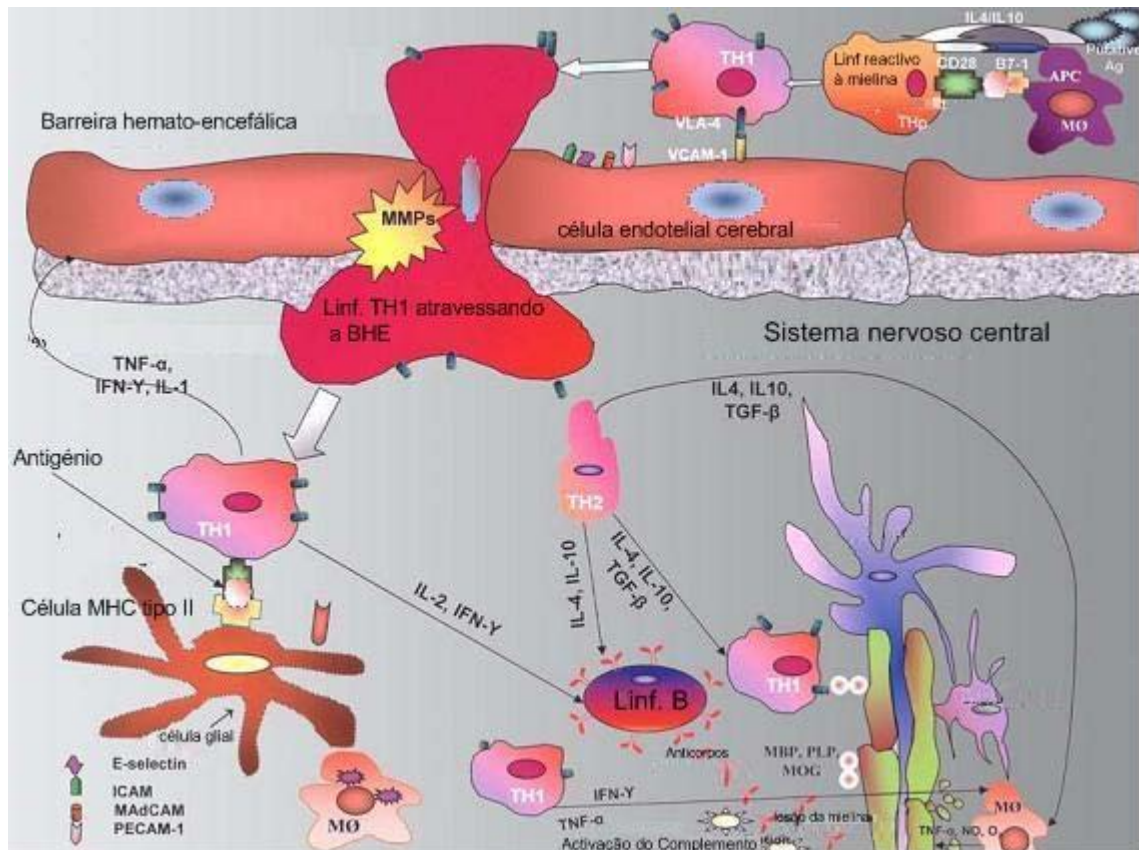
A interacção entre os linfócitos T activados e as células endoteliais leva a um fenómeno de “upregulation” das moléculas de adesão (“E-selectin”, “intercellular adhesion molecule”, “mucosal addressin cell adhesion molecule”, e “platelet endothelial cells adhesion molecule”).

A migração trans-endotelial dos linfócitos T é precedida pela perda de integridade da barreira hemato-encefálica, parcialmente mediada pela actividade de metalo-proteases da matrix (MMPs). Estas MMPs digerem a matrix extracelular e facilitam a migração dos linfócitos T.

Citoquinas pró-inflamatórias (como TNF e interferon- $\gamma$ ) “upregulate” a expressão de moléculas na superfície celular de células apresentadoras de antigénios. A ligação do

complexo trimolecular (Receptores dos linf. T, MCH II ligados à células apresentadoras de antígenos) precipita uma cascata inflamatória que leva à produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Esta reacção inflamatória origina perda de complexos mielina-oligodendrócitos.



**Figura 3** - Um modelo de imunopatogenese da esclerose múltipla

Após exposição a determinados antígenos ambientais, em indivíduos com predisposição genética, linfócitos T reactivos à mielina migram da circulação periférica para o SNC. A interacção entre os linfócitos T activados e as células endoteliais leva a um fenómeno de “upregulation” das moléculas de adesão ( “E-selectin”, “intercellular adhesion molecule”, “mucosal addressin cell adhesion molecule”, e “platelet endothelial cells adhesion molecule”). A migração trans-endotelial dos linfócitos T é precedida pela perda de integridade da barreira hemato-encefálica, parcialmente mediada pela actividade de metalo-proteases da matrix ( MMPs). Estas MMPs digerem a matrix extracelular e facilitam a migração dos linfócitos T. Citoquinas pró-inflamatórias (como TNF e interferon- $\gamma$ ) “upregulate” a expressão de moléculas na superfície celular de células apresentadoras de antígenos (nesta figura representadas por células gliais). A ligação a do complexo trimolecular (Receptores dos linf. T, MCH II ligados às células apresentadoras de antígenos) precipita uma cascata inflamatória que leva à produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Esta reacção inflamatória origina perda de complexos mielina-oligodendrócitos.

Outro elemento importante a considerar na patologia da EM é a lesão axonal.

A lesão axonal é directamente correlacionável com a intensidade do processo inflamatório e com a presença de Linfócitos T CD8+ [40]. A extensão da lesão axonal é maior nos processos de desmielinização activos seja em situações agudas ou crónicas [41-43].

A alteração na membrana axonal que se verifica pela alteração de canais de sódio ao longo da membrana parece ser outro factor importante na degeneração axonal. Nos axónios são e perfeitamente mielinizados encontramos canais  $Na_v1.6$  confinados pela “*Contactin-Associated Protein*” (Caspr) e localizados nos nódulos de Ranvier. No entanto, nos axónios desmielinizados em placas de EM observa-se a presença de canais  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.2$  ao longo de toda a extensão dos mesmos [44, 45]. A presença destes canais  $Na_v1.2$ , capazes de sustentar a condução de potenciais de condução eléctrica, pode levar a um aumento da concentração axonal de  $Ca^{2+}$  [46] e consequente activação de proteases que desfragmentam neurofilamentos [47, 48] e despolimerizam microtúbulos [49].

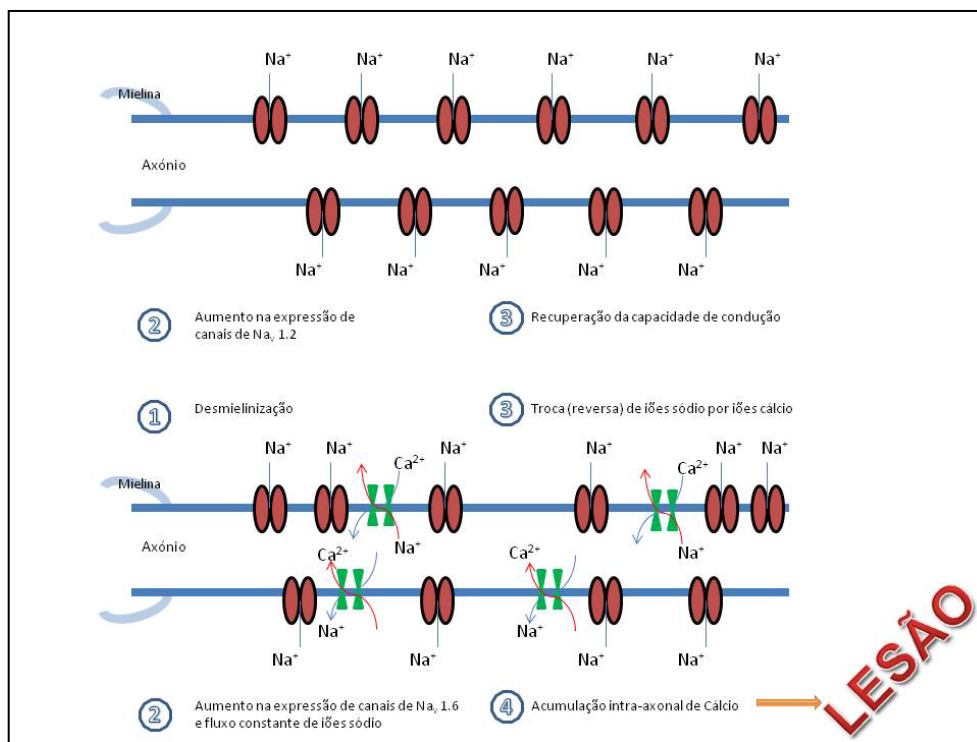


Figura 4 – Papel dos diferentes padrões de expressão de canais de sódio  $Na_v 1.2$  e  $Na_v 1.6$  na lesão axonal

#### lesão axonal

A existência de diferentes padrões de expressão de canais de sódio  $Na_v 1.2$  e  $Na_v 1.6$  ao longo dos axónios sugere também a existência de diferentes papéis.

- A seguir à desmielinização (1) canais  $Na_v 1.2$  são expressos difusamente (2) ao longo dos axónios e permitem a recuperação do potencial de acção de condução (3).
- A expressão dos canais de  $Na_v 1.6$  é “upregulated” em alguns axónios a seguir à desmielinização (1). Além de permitirem rapidamente a produção de correntes de activação e inactivação estes canais permitem também uma corrente permanente de sódio (2) que leva à troca de íons sódio por íons cálcio (3), acumulação de cálcio intra-axonal (4) que despoleta cascatas secundárias e lesão axonal.

Fonte: [38]. ©2004 National Academy of Sciences USA.

No estudo da patologia desta doença não podemos ainda ignorar a existência de alterações a nível mitocondrial. Nas placas de EM crónica activa, verifica-se uma redução da actividade do Complexo I [50]. A nível do córtex são, observa-se uma redução dos complexos I e III, que pode levar a uma redução de produção de ATP nos axónios não mielinados [51].

Um terceiro factor que pode estar envolvido na patofisiologia desta doença (além da desmielinização e da lesão axonal) é a falha na remielinização, possivelmente devido a falha dos OPC (células precursoras de oligodendrócitos) [52].

### **1.3 O FERRO E SEU METABOLISMO**

O ferro é um elemento fundamental no metabolismo dos mamíferos, dada a sua capacidade de captar e ceder electrões. Essa característica torna este elemento útil em moléculas como a hemoglobina, mioglobina, citocromos, e varias enzimas “não-heme”. No entanto esta mesma propriedade pode resultar numa cedência de electrões ao oxigénio, levando à formação do anião superóxido ( $O^{\bullet}$ ) e de radicais hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), fortemente reactivos, capazes de reagir com moléculas biológicas como DNA, proteínas e lípidos. Por conseguinte, a regulação deste elemento no organismo é essencial para a manutenção da saúde do mesmo.

#### **1.3.1 Absorção do ferro**

Diariamente são absorvidos e excretados cerca de 1-2 mg de ferro. A absorção ocorre predominantemente no duodeno e do jejuno superior.

##### **1.3.1.1 Transporte do ferro através da superfície apical do enterócito**

O ferro necessita de atravessar a membranas apical e basal do epitélio intestinal de forma a alcançar o compartimento plasmático. O ferro que está presente nos alimentos, sobretudo em carnes vermelhas, alguns legumes e lacticínios, ocorre sobretudo na forma de Fe(III) ou integrado num composto Heme. Existem evidências de que o heme pode ser transportado para citosol do enterócito por um transportador específico, embora actualmente ele ainda não esteja identificado [53, 54].

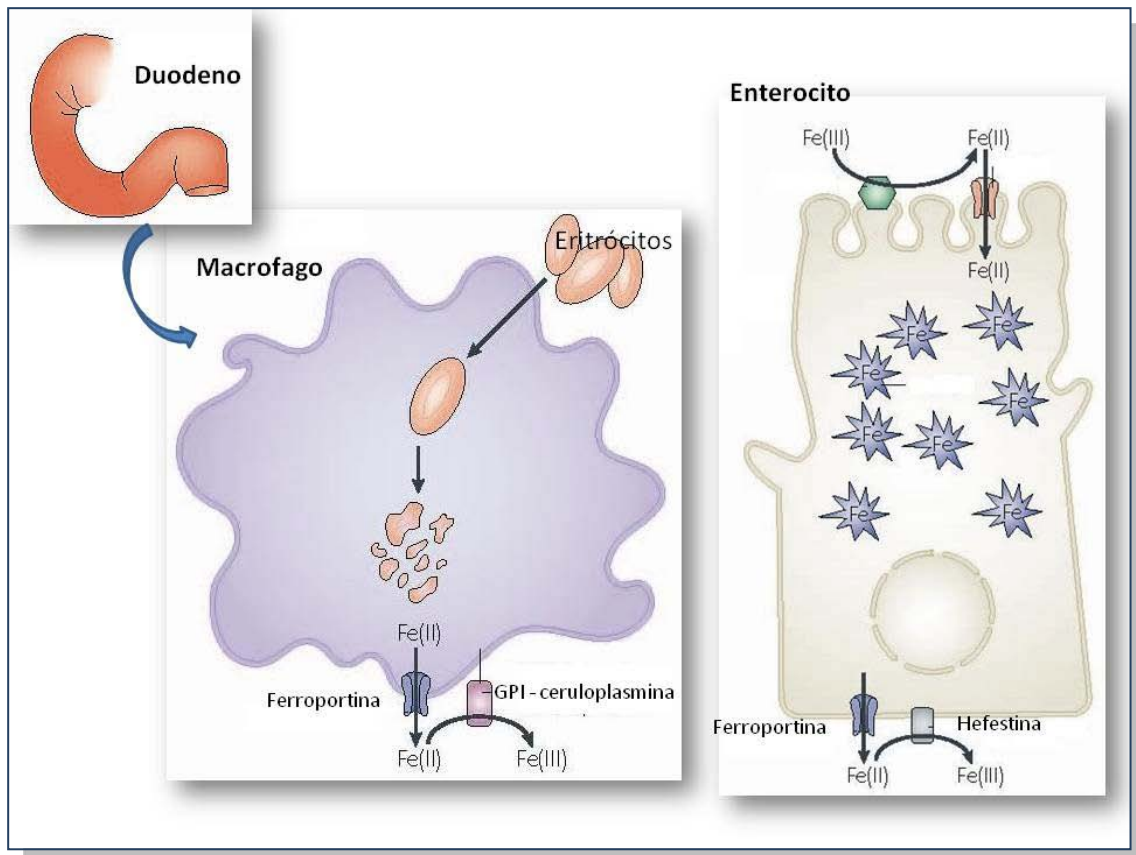
O ferro elementar da dieta é solubilizado no pH ácido do lúmen gástrico e duodenal. Para atravessar a membrana apical dos enterócitos o ferro necessita de ser reduzido de Fe(III) a

Ferro(II). Esta redução é alcançada pela intervenção de pelo menos uma ferriredutase conhecida, a DCYTB, que medeia o transporte de electrões entre o NADP do citosol para o Fe(III) extracelular. Este Fe(II) é seguidamente internalizado por uma proteína transportadora (DMT1). Esta DMT1 é a única proteína conhecida que internaliza o Ferro e pertence a uma família de proteínas denominada “natural resistance –associated macrophage protein (Nramp)”. Existe na membrana do pólo apical dos enterócitos do intestino delgado e nos endossomas dos restantes tipos celulares. Transporta não só o Fe(II) mas também outros metais divalentes como o zinco, cobalto, manganês, cádmio, cobre, níquel e chumbo através de um “proton-coupled mechanism”.

### **1.3.1.2 Transferência do ferro do enterócito para o plasma**

O ferro absorvido no enterócito é armazenado por uma proteína citosólica, a ferritina, ou é transferido para o plasma por uma outra proteína, a ferroportina (figura 5). A ferroportina é o único exportador de ferro que se conhece e é encontrado em todo o tipo de células onde este mecanismo de passagem do ferro para o plasma se desenrole, nomeadamente nas células da mucosa duodenal, macrófagos e células da placenta. Nos macrófagos, esta proteína é necessária para o processamento do ferro proveniente dos eritrócitos fagocitados. É uma proteína com um peso molecular calculado de aproximadamente 67 kDa, possuindo 12 domínios transmembranares e parece funcionar como um dímero [55]. Dada a sua homologia com algumas cobre-oxidases conhecidas como a ceruloplasmina e a hefestina, supõe-se que também a ferroportina transporte o ferro na forma de Fe(II).

A hefestina, é uma multi-cobre oxidase que existe na membrana basolateral do epitélio intestinal de absorção. É uma ferro-oxidase e converte Fe(II) em Fe(III). A ausência desta proteína inibe as células de exportarem o ferro, que permanece na mucosa, ligando-se à ferritina.



**Figura 5** - Transporte de ferro através do enterócito.

O ião férrico (Fe(III)) da dieta é convertido em ião ferroso (Fe(II)) por uma ferredoxina (DCYTB) localizada na membrana apical dos enterócitos da mucosa duodenal. Este Fe(II) é então transportado para dentro do enterócito através de uma proteína transportadora de metais divalentes (DMT1). Aqui, é incorporado numa proteína citosólica de armazenamento de ferro – a ferritina – ou é transportada por outra proteína – a ferroportina - para o plasma através da membrana basolateral do enterócito. Este Fe(II) é então convertido em Fe(III) por uma ferroxidase associada à membrana – a hefeístina.

**Transporte do Ferro para fora da célula mediado pela Ferroportina.** O ferro dos enterócitos bem como o dos macrófagos proveniente da reciclagem dos eritrócitos é transportado para fora da célula (exportado) pela ferroportina.

- Nos macrófagos o Fe(II) sendo imediatamente convertido em Fe(III) pela glycosylphosphatidylinositol (GPI)-ligada á ceruloplasmina uma ferroxidase associada à membrana.
- Nos enterócitos o Fe(II) é exportado pela ferroportina e é então convertido em Fe(III) pela hefeístina.

### 1.3.1.3 Fornecimento do ferro aos tecidos

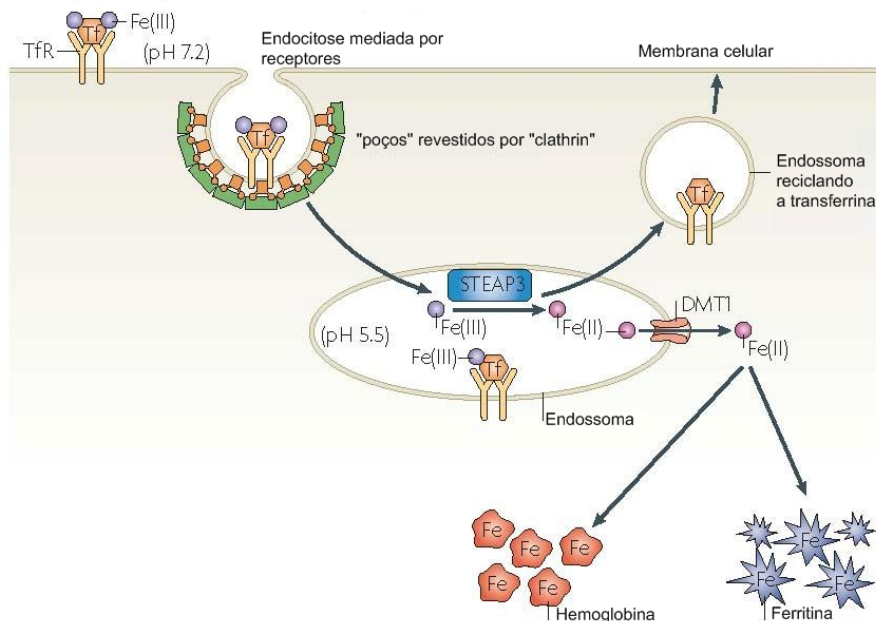
O ferro que é exportado para o plasma liga-se a uma proteína transportadora, a transferrina, uma glicoproteína de 80 kDa, sintetizada no fígado, testículo, retina e

cérebro. Esta proteína tem duas funções primordiais, transporte de ferro e encaminhamento do ferro para os tecidos através de um receptor de transferrina.

Ao pH fisiológico do plasma, cerca de 20-30% da transferrina encontra-se ligada ao ferro sob a forma de Fe(III). Esta ligação requer no entanto a presença de um anião (normalmente o carbonato), que sirva de ponte entre a transferrina e o Fe(III).

Este ferro plasmático é internalizado nas células através de receptores de transferrina existentes nas membranas celulares. São dois, os tipos de receptores de transferrina conhecidos. O Receptor da transferrina 1 (Rtr1) é expresso em todas as células com capacidade de divisão celular, sobretudo nas linha eritroide já que o eritrócito que tem uma necessidade de ferro acrescida [56]. Quando estes eritrócitos morrem (o seu tempo de vida na espécie humana ronda os 120 dias), são fagocitados por macrófagos, onde são degradados nos lisossomas. O ferro libertado do heme vai para o citosol do macrófago onde pode ser armazenado ligando-se à ferritina, ou é exportado pela ferroportina. O receptor da transferrina 1 (Rtr1) é um homodímero constituído por duas sub-unidades transmembranares ligadas por pontes disulfídicas [56]. O terminal N está posicionado na porção intracelular e a terminação C na porção extracelular onde se liga a uma molécula de complexo Transferrina-Fe(III) [57]. A internalização do ferro pelo Receptor da transferrina (Rtr1) é o principal mecanismo pelo qual o ferro chega às células dos tecidos periféricos. Após a ligação ao Rtr1, o complexo Transferrina-Fe(III) – Rtr1 sofre endocitose mediada por receptores específicos, através de poros revestidos por uma proteína - claritrina (Figura – SSS).

A vesícula que se forma neste processo (um endossoma) é acidificada por bombas de H<sup>+</sup> (ATP dependentes) que baixam o pH a 5.5. Esta modificação no pH, induz modificações conformacionais nas moléculas da transferrina-Fe(III) e do Rtr1 cuja consequência é a libertação do ferro [58, 59]. Este ferro é reduzido a Fe(II) por uma ferredutase denominada STEAP3 e transportado para o citosol por DMT1 endossómico, onde pode ser armazenado incorporado na ferritina em células não eritroides ou hemoglobina nas células eritroides.



**Figura 6** - Endocitose do complexo ferro, transferrina e receptor de transferrina

A transferrina plasmática (Tf) tem grande afinidade pelo Ferro(III) ligando-se a ele. A pH neutro (7.2) no plasma, a Tf-Fe(III) liga-se ao receptor de transferrina (TfR) existente nas superfícies das células. Este complexo Tf-Fe(III)-TfR é internalizado por um processo de endocitose mediado por receptores, neste caso através de poços (aberturas) revestidas por "clathrin". Esta vesícula internalizada (endossoma) é (pH 5.5) por ação de H<sup>+</sup>ATPase. À medida que o pH no endossoma diminui a estrutura do complexo Tf-TfR modifica-se e o Fe(III) é libertado da transferrina. O Fe(III) é convertido em Fe(II) pela reductase endossômica STEAP3 e é então transportado para fora do endossoma para o citosol por um transportador de metais divalentes (DMT-1). O Fe(II) pode então ser armazenado na ferritina (nas células não eritroides) ou incorporado na hemoglobina (nas células eritroides). O complexo Tf-TfR sofre então exocitose por um endossoma que recicla a transferrina.

O complexo Apotransferrina-Rtr1 é estável no pH ácido endossomal e é eliminado por exocitose deste endossoma. No pH fisiológico do plasma a apotransferrina dissocia-se do Rtr1 e fica apta a ligar-se novamente a dois átomos de ferro(III) [60, 61].

O Receptor da transferrina 2 (Rtr2) é expresso primariamente no fígado e a sua ligação ao complexo Transferrina-Fe(III) é muito mais débil que a do Rtr1.

Alguns estudos sugerem a existência de mecanismos de transporte do ferro independentes da transferrina, que actuam quando esta não está presente ou quando está saturada.

Foram propostos alguns desses mecanismos para órgãos como o fígado [62] e o coração [63, 64], como por exemplo a acumulação de ferro no coração nas cardiomiopatias por sobrecarga de ferro ser fruto da passagem de ferro(II), promovida por um transportador de cátions (“Divalentes L-type voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel (LVDC)), ou o papel de um transportador pertencente à família de transportadores de zinco SLC39A, o Zip 14, abundantemente expresso no tecido hepático.

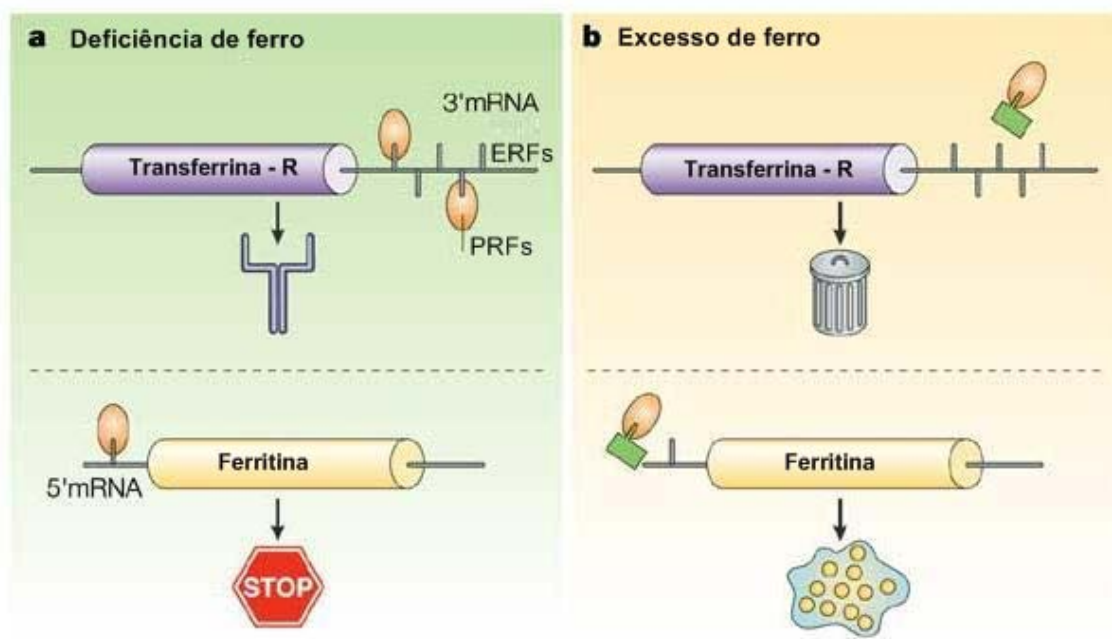
Nas células, o ferro que não é necessário no imediato para as funções metabólicas da mesma, é armazenado numa proteína específica, a ferritina. Esta, é uma proteína multimérica de vinte e quatro sub-unidades constituídas por dois tipos de cadeias polipeptídicas, denominadas por H (de “Heavy” ou “Heart”) e L (de “Light” ou “Liver”) [65]. Cada uma destas subunidades é codificada por um gene diferente. O Ferro(II) que chega à ferritina é oxidado pela própria proteína de molde a poder ser armazenado no seu core sob a forma de ferro(III). A capacidade oxidativa da ferritina é devida à subunidade H. A molécula da ferritina pode variar em função da diferente composição em cadeias H e L e esta varia consoante o tecido em que ela é expressa (por exemplo, o fígado e o baço são órgãos onde a subunidade L existe em grande quantidade enquanto no coração predomina a subunidade H).

#### 1.3.1.4 Homeostase do ferro

A regulação da absorção e armazenamento do ferro é conseguida por mecanismos de regulação de transcrição e pós-transcrição. Esta regulação pode ser activada por factores de diferenciação e citoquinas. As subunidades de ferritina e os receptores de transferrina podem ser regulados por mecanismos de pós-transcrição e as denominadas “ iron regulatory proteins” – proteínas reguladoras do ferro ( PRFs) [66].

Quando a concentração de ferro está diminuída, as PRFs ligam-se a porções de RNAm denominadas “iron regulatory elements” – elementos reguladores do ferro (ERFs) que comandam a expressão de proteínas que intervêm na regulação do ferro, como a ferritina e Rtr (Figura 7). A ligação das PRFs às ERFs na terminação 5´ do RNAm impede a transcrição do mesmo, enquanto que a ligação na terminação 3´ estabiliza o RNAm e impede a sua degradação. Foram identificadas pelo menos duas PRFs.

A DMT1 e a ferroportina possuem ERFs com terminação 5´, tendo sido demonstrado que o ferro induz a produção de ferroportina nos macrófagos [67].



**Figura 7 - Regulação da produção do receptor de transferrina (Rtr) e ferritina ao nível do mRNA**

A produção do receptor de transferrina (Rtr) e ferritina é regulada ao nível do mRNA por proteínas reguladoras do ferro (PRF), que se ligam a “iron response elements” (ERF) na terminação 3'- and 5' não transcritas do respectivo mRNA. **a.** Na deficiência de ferro, a PFR liga-se ao ERF, protegendo o Rtr mRNA da digestão por nucleases e evitando a síntese de ferritina. **b.** Quando o ferro é abundante, o PFR modificado não se liga ao ERF – no PFR1 o local de ligação do ERF está bloqueado por um “cluster” 4Fe-4S (rectângulo verde) enquanto no PFR2 a proteína é marcada para destruição no proteossoma – permitindo assim que o Rtr mRNA seja destruído e que a ferritina seja sintetizada.

Adaptado de: Zecca, L., et al., *Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders*. Nat Rev Neurosci, 2004. 5(11): p. 863-73.

Um elemento chave na regulação do ferro sistémico é a hepcidina. Este péptido sintetizado fundamentalmente a nível hepático, codificado pelo gene HAMP, pertence à família das defensinas e regula a entrada de ferro para o plasma. [68-71]. A forma activa deriva de um precursor com 84 aminoácidos e é composta por 25 aminoácidos contendo 8 resíduos de Cisteína. [72].

A hepcidina impede a passagem de ferro para o plasma. Ligando-se à ferroportina, induz a sua fosforilação, internalização, ubiquitinação e **degradação** em lisossomas [73, 74]. A remoção das moléculas de ferroportina da superfície das células impede a saída do ferro, aumentando a sua concentração no citosol e a sua incorporação na ferritina [75]. É esta a interacção da hepcidina e da ferroportina que explica a regulação do ferro a nível sistémico.

### **Regulação positiva da hepcidina**

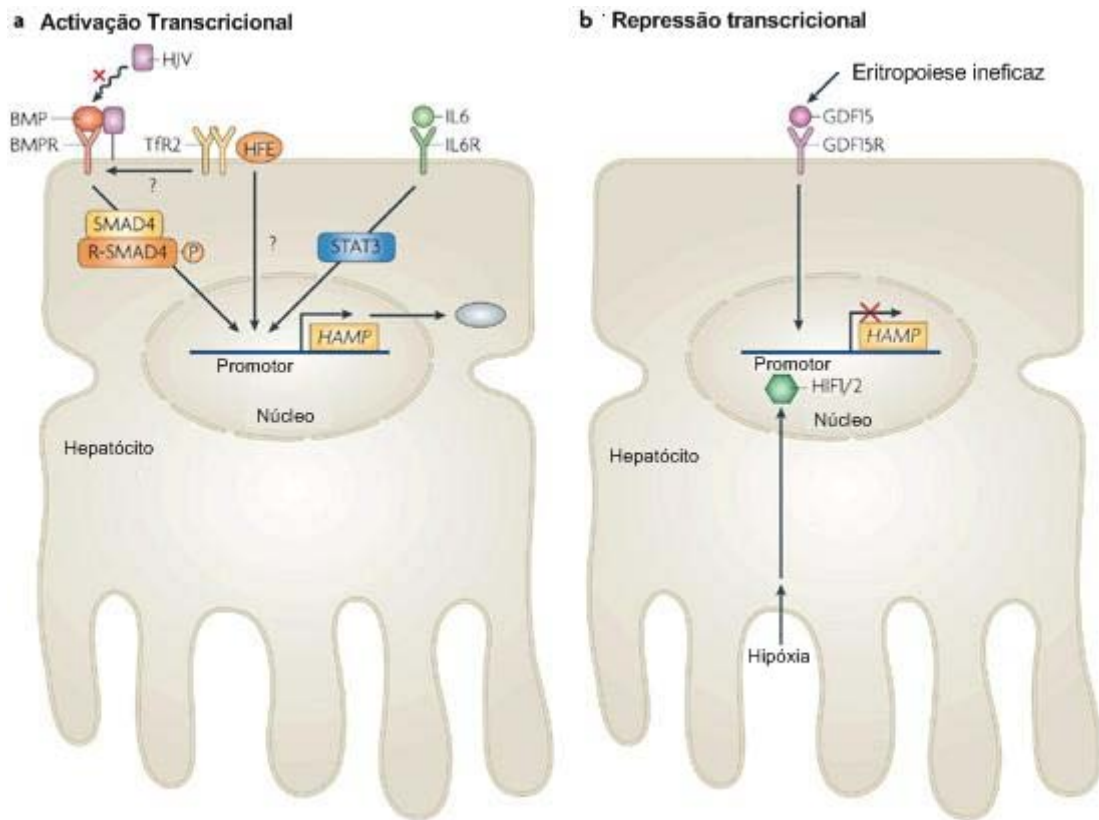
A síntese de hepcidina é controlada a nível do processo de transcrição e este pode ser modulado por processos inflamatórios, anemia, hipoxia, e reserva de ferro [76].

Em condições normais, a expressão da hepcidina é mediada pelas “binding morphogenetic proteins” (BMPs) e pela via bioquímica SMAD4 . A ligação destas BMPs a receptores de BMP específicos, activa a fosforilação de receptores de SMAD (R-SMADs) no citosol. Estes complexos de R-SMAD e SMAD4 fosforilados activam a transcrição do gene HAMP e consequente síntese de hepcidina [77, 78].

Nos estados inflamatórios a regulação da transcrição da hepcidina ocorre por um outro mecanismo. Aqui, a indução da transcrição é conseguida pela intervenção da Interleuquina-6 (IL-6) e possivelmente de outras citocinas no hepatócito. A ligação de IL-6 ao seu receptor na membrana citoplasmática induz a activação do factor transcricional STAT3 que se liga ao promotor do gene HAMP e despoleta a produção de hepcidina [79].

### **Regulação negativa da hepcidina**

A produção de hepcidina pode ser também inibida. Por exemplo, em condições de hipoxia diminui a síntese de hepcidina levando ao aumento da concentração de ferro plasmático [80]. O estímulo fisiológico e molecular que aparentemente predomina neste controlo negativo da hepcidina vem da linha celular eritroide. Uma eritropoiese deficiente leva ao aumento de células imaturas, capazes de produzir um factor de diferenciação celular (GDF15). A ligação desta citocina ao seu receptor específico, parece inibir a transcrição do HAMP e induzindo assim a saída de ferro do hepatócito para o plasma, independentemente das reservas hepáticas do mesmo [81].



**Figura 8** - Regulação molecular da produção de hepcidina

A expressão de hepcidina pode ser regulada de diversas formas

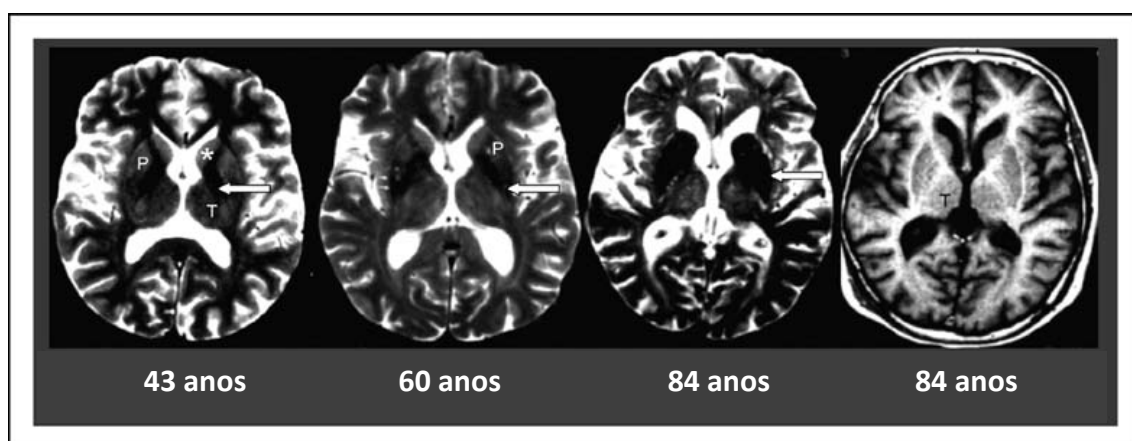
- A transcrição de gene HAMP que codifica a hepcidina depende de impulsos que chegam via receptores “bone morphogenetic proteins (BMPs) e a jusante por factores de transcrição de SMAD. A activação dos receptores de superfície celulares de BMP ( BMPRs) pelas BMPs leva ao à fosforilação de receptores SMAD ( R-SMADs), que dimerizam com SMAD4. A Haemojuvelina ( HJV) ligada à membrana funciona como um co-receptor dos BMPs, aumentando a eficiência da interacção dos BMP com o seu receptor. O heterodímero R-SMAD4-SMAD4 a nível nuclear induz a transcrição do gene HAMP. HJV solúvel liga-se ao BMP e conseqüentemente bloqueia a activação do BMPRs ( ver cruz vermelha) e a posterior expressão de hepcidina. Citoquinas inflamatórias como a interleuquina-6 (IL-6) ligam-se a receptores de IL-6 activando a transdução de sinal a transcrição de 3 (STAT3), que se liga ao gene promotor HAMP e induz a expressão de hepcidina. A activação de STAT3 requer a presença de SMAD4. O receptor de transferrina-2 (TfR2) e HFE funcionam a montante do SMAD4 activando o gene promotor HAMP, possivelmente através de um sinal independente ou afectando a transdução de sinal pelo BMPR
- Em condições de hipoxia o factor induzível por hipoxia (HIF)-1/2 factor de transcrição liga-se ao gene promotor HAMP e bloqueia a expressão de hepcidina. Uma eritropoiese ineficaz resulta em níveis elevados de factor de diferenciação-15 (GDF-15), que se liga a receptores da família de receptores de TGFβ designados como receptores GDF15 (GDF15R) e induz um pathway de sinalização que a transcrição do gene HAMP.

Adaptado de : De Domenico, I., D. McVey Ward, and J. Kaplan, *Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(1): p. 72-81.

## 1.4 FERRO, ENVELHECIMENTO CEREBRAL E NEURODEGENERAÇÃO

É consensual que ao longo da vida se verifica uma acumulação de ferro a nível cerebral. Estudos radiológicos e de anatomia patológica evidenciam este facto, que pode ser observado desde os 6 meses de vida. A quantidade de ferro no tecido cerebral aumenta durante as três primeiras décadas de vida, estabiliza nas três décadas seguintes e aumenta gradualmente a partir dos sessenta anos de idade. Este aumento pode ser o resultado de uma alteração na vascularização de regiões cerebrais que é observado no envelhecimento ou em doenças neurodegenerativas [82, 83].

Esta deposição de moléculas que contém ferro não é homogénea e dá-se preferencialmente em regiões relacionadas com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson. Áreas específicas como o putamen e substância “nigra” mostram um aumento na concentração de ferro, enquanto em outras áreas como no “locus ceruleus”, esse aumento não é significativo (Figura 9) [82].



**Figura 9 - Perfil de alterações morfológicas observadas em doentes com EM por MRI**

Imagens de MRI ponderadas em T2 “Fast spin-echo” (T2WI) da esquerda para a direita, ilustram a aparência dos gânglios basais e tálamo (T) em indivíduos saudáveis. Estas imagens são típicas das alterações relacionadas com a idade que se encontram no núcleo caudado (\*\_) e putamen (P), e que são agora indistintas no “globus pallidus” (seta) em T2WI. T2WI de uma mulher de 43 anos de idade mostra iso-intensidade do tálamo (T) putamen (P) e núcleo caudado(\*\_), consistente com um conteúdo baixo de ferro. No entanto o “globus pallidus” (seta) mostra uma hipo-intensidade marcada consistente com um alto conteúdo de ferro, que é normal para a idade, apesar de haver um bom contraste na imagem do “globus pallidus” quando comparado com outros “deep gray nuclei”. T2WI de uma mulher de 60 anos de idade, mostra que o aspecto posterior do putamen (P) é Hipo-intenso devido ao envelhecimento normal e mostra intensidade similar em relação ao “globus pallidus” (seta). Uma mulher de 84 anos de idade mostra hipo-intensidade marcada do “caudate” e putamen (P) que é indistinguível do “globus pallidus” (seta) em T2WI. Note-se que mesmo com esta idade o tálamo (T) permanece iso-intenso em T2WI. Estas estruturas permanecem isointensas o T1WI (imagem da direita).

Fonte: Stankiewicz, J.M. and S.D. Brass, *Role of iron in neurotoxicity: a cause for concern in the elderly?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(1): p. 22-9.

A ferritina constitui a principal forma de armazenamento de ferro no cérebro. Estudos recentes mostraram que as concentrações de H- ferritina no córtex frontal, putamen, núcleo caudado, substância “nigra” e “globus pallidus” de indivíduos idosos (67 – 88 anos) são mais elevadas do que na população utilizada como controlo (27 – 66 anos) [84, 85].

No lobo parieto-occipital do córtex cerebral observa-se um aumento com a idade, da ferritina e da expressão da heme-oxigenase-1 (enzima limitante de origem microssomal, na degradação do heme), enquanto que no hipocampo apenas se verifica o aumento da heme-oxigenase-1. Esta enzima é encontrada em células da glia e em neurónios ao contrário da ferritina que se observa apenas na glia. O aumento da concentração de heme-oxigenase-1 pode ser um dos factores que contribui para a susceptibilidade deste tecido ao stress oxidativo em pessoas idosas [86].

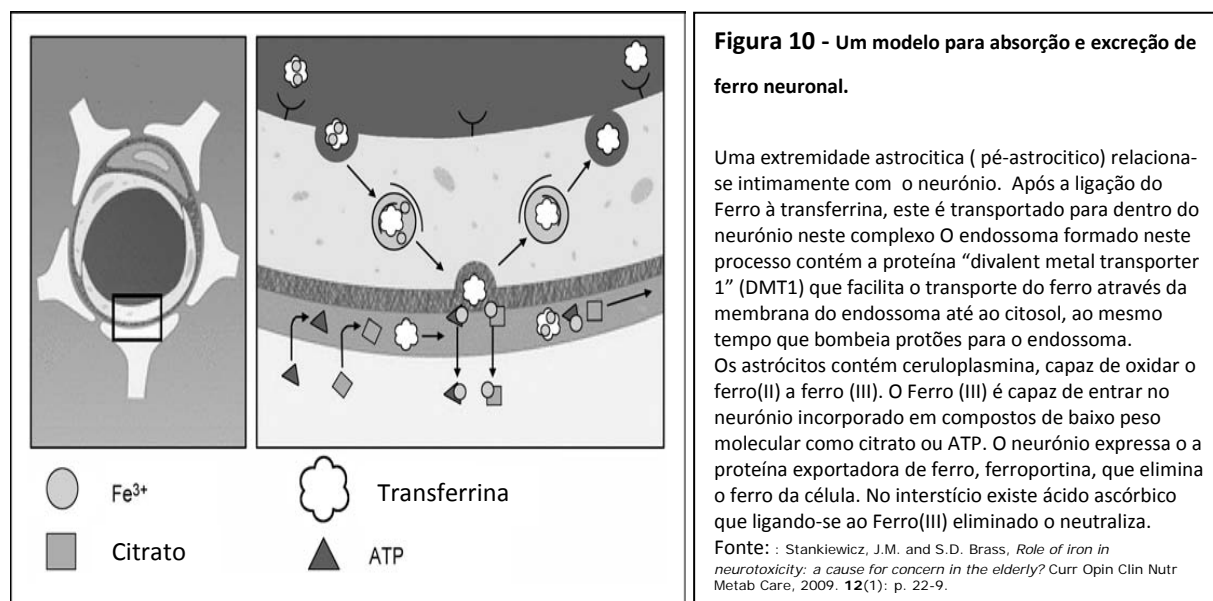
Comparando indivíduos na faixa dos 60-90 anos com outros na faixa dos 28-49 anos, observa-se que, quer a coloração do ferro nos astrócitos e microglia do córtex, cerebelo, hipocampo, gânglios basais e amígdala, quer a imunoreactividade à ferritina são marcadamente mais fortes nos primeiros que nos indivíduos mais jovens. Os oligodendrócitos são as células que exibem maior quantidade de ferro, ferritina e transferrina, embora nestas células, a concentração destas moléculas não se altere com a idade [87].

Existem vários mecanismos pelos quais o ferro atravessa a barreira hemato-encefálica (BHE). O mais comum recorre aos receptores de transferrina existentes nas membranas celulares do endotélio capilar cerebral, que captam o complexo ferro(III)-transferrina e promovem a sua endocitose, embora outros mecanismos possam ser utilizados, tais como, transportador de metais divalentes ou o receptor de lactoferrina [88, 89]. Aceita-se que a quantidade de ferro que entra nas células e aí é armazenada, é condicionada primordialmente pelo número de receptores de transferrina existentes nas células [88].

Uma pequena quantidade de ferro pode entrar no cérebro através do plexo coróide. Aqui, os astrócitos estão intimamente ligados ao endotélio pelos denominados “pés astrocíticos” que estarão envolvidos na regulação deste processo.

O ferro liberta-se então da transferrina para o espaço intersticial e liga-se a citrato, adenosina trifostato (ATP), ou ácido ascórbico. Esta parece ser a fonte de Ferro(III) no cérebro, enquanto que o Ferro(II) parece ser secretado a partir dos neurónios e oligodendrócitos.

Podemos no entanto encontrar neste espaço, ferro ligado a transferrina sintetizada nos ventrículos.



Os neurónios possuem receptores de transferrina e DMT1. Presume-se que neurónios deficientes em ferro “upregulate” estes receptores de transferrina e consequentemente promovam a entrada deste ferro nos mesmos. É curioso que este fenómeno de aumento dos receptores de transferrina em caso de deficiência de ferro, ocorre apenas nos neurónios não se verificando o mesmo, como seria expectável, nos capilares endoteliais do cérebro [90-92]. Os neurónios podem ainda absorver ferro não ligado a transferrina, embora o mecanismo envolvido nesse processo não seja ainda conhecido.

No sentido contrário, a regulação da quantidade de ferro intra-neuronal parece ser alcançada pela eliminação do ferro não utilizado num processo mediado pela ferroportina, proteína que parece ter uma distribuição ubiqüitária nos tecidos cerebrais.

Os astrócitos e oligodendrócitos só conseguem absorver ferro não ligado a transferrina, já que não possuem receptores para a mesma.

Embora os monócitos e macrófagos contenham ferro, essencial para a sua função, as células da microglia raramente contêm ferro e não contêm ferroportina.

Embora a principal forma de armazenamento do ferro seja a ferritina, este pode aparecer também ligado a outras moléculas como a neuromelanina, uma molécula proveniente da

oxidação de catecois citosólicos que não foram reabsorvidos e acumulados em vesículas pós-sinápticas, ou a hemosiderina.

### 1.4.1 Toxicidade do ferro

Foi já demonstrado “in-vitro” que a acumulação de ferro livre nas células induz o aparecimento de dano celular. O ferro armazenado na ferritina é considerado como não nocivo porque a sua inclusão no core da molécula de ferritina inibe a sua reactividade. Quando este factor de protecção se altera por diminuição da quantidade de ferritina disponível ou pela sua degradação, o ferro livre revela-se altamente tóxico para a célula. De facto, o ferro convertido em hemosiderina e outros oxihidroxiderivados é mais reactivo, já que troca electrões mais facilmente com as moléculas com que interage, podendo desta forma iniciar um processo de produção de radicais livres. Por seu lado, estes radicais livres altamente reactivos podem lesar moléculas tão diversas e vitais para o normal funcionamento da célula como DNA, lípidos e proteínas, levando em última instância à morte celular.

Toda a espécie capaz de existência independente e que contém um ou mais electrões não-emparelhados é denominada radical livre. Como exemplo temos o anião superóxido ( $O_2^\bullet$ ), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) e óxido nítrico ( $\bullet NO$ ). Existem também espécies reactivas do oxigénio não-radicaís (sem electrões emparelhados), oriundas do metabolismo do oxigénio, como peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), singleto oxigénio ( $O^\bullet$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e ozónio ( $O_3$ ).

Em condições fisiológicas normais existe um equilíbrio entre a formação de espécies reactivas ao oxigénio (EROs) e a sua eliminação através de mecanismos de defesa antioxidante. Quando há um desequilíbrio entre a produção e a eliminação com tendência para um predomínio de produção diz-se que existe stress oxidativo.

Radicais livres podem ser formados a partir da clivagem de uma ligação covalente entre dois átomos quando cada átomo recebe um electrão cada:

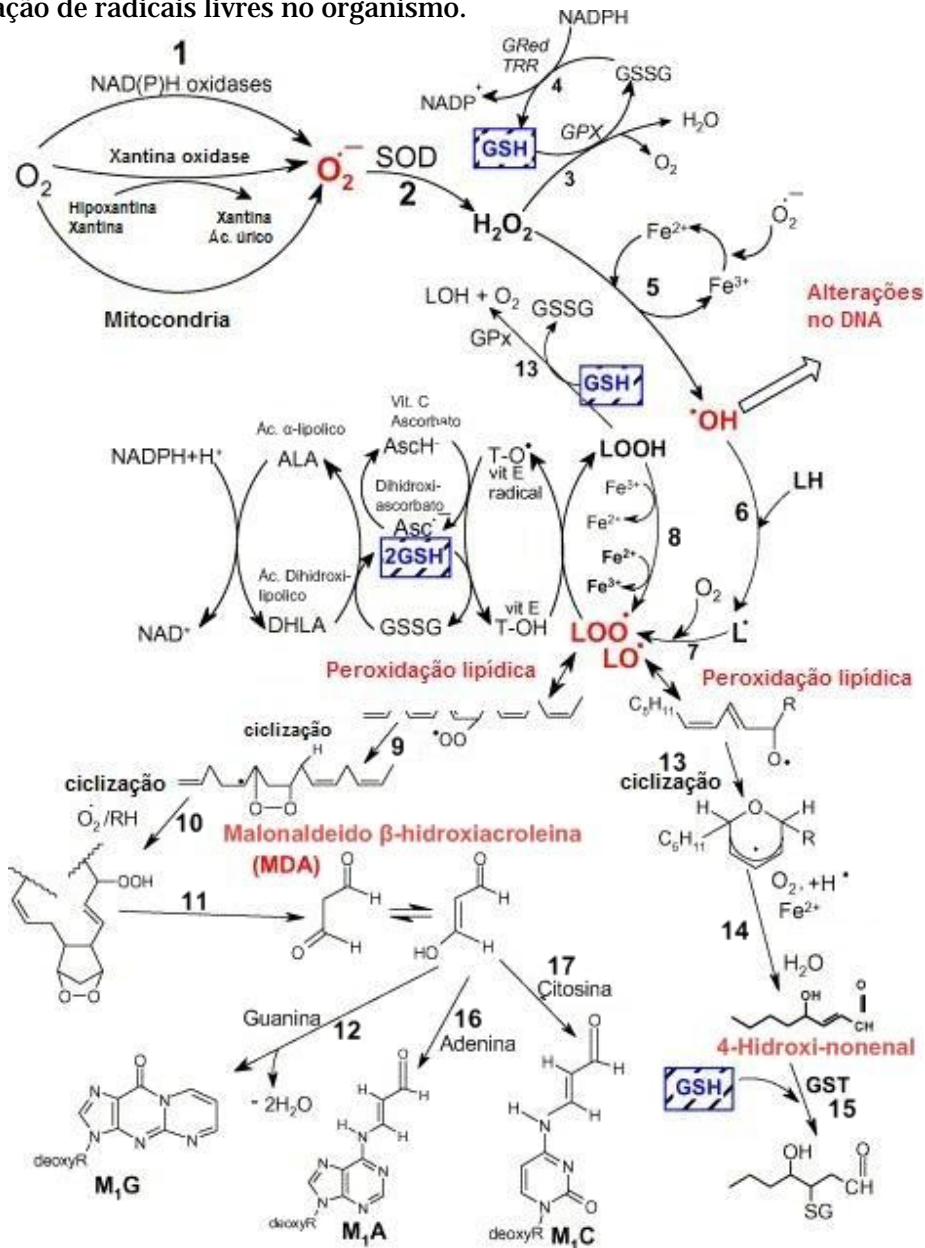


Ou por reacções de transferência de electrões:



Uma vez formado o radical, ele pode reagir com moléculas, radicais ou não-reativos, em larga escala.

Na figura 11 estão representados vários processos bioquímicos através dos quais há formação de radicais livres no organismo.



**Figura 11 - Processos bioquímicos de formação de espécies reativas ao oxigênio e lesão tecidual**

**Reacção 1:** O anião superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) é formado por um processo de redução do oxigénio molecular mediado por oxidases de NAD(P)H e da xantina, ou por processos não enzimáticos de oxidação-redução como por exemplo o da semi-ubiquinona a nível da cadeia transportadora de electrões na membrana mitocondrial. **Reacção 2:** O anião superóxido é dismutado pela enzima superóxido-dismutase (SOD) e convertido em peróxido de hidrogénio. **Reacção 3:** A enzima glutatona peroxidase (GPx) reduz o  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ , utilizando como dador de electrões a glutatona (GSH). **Reacção 4:** A glutatona oxidada (GSSG) é reduzida a glutatona pela enzima glutatona reductase (GRed) que utiliza o NADPH como dador de electrões. **Reacção 5:** Alguns metais de transição ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ , ...) podem reagir com  $H_2O_2$  originando radicais hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (reacção de Fenton). **Reacção 6:** O  $\cdot OH$  é capaz de capturar um electrão de moléculas de lípidos polinsaturados (LH) originando um radical livre (electrão no carbono) ( $L^{\cdot}$ ). **Reacção 7:** O radical livre lipídico pode interagir com  $O_2$  e originar um radical peróxido ( $LOO^{\cdot}$ ). Se este radical peróxido não for eliminado por antioxidantes pode dar origem ao processo de peroxidação lipídica (reacções 9-12 e 13-15). **Reacção 8:** Hidroperóxidos lipídicos pode reagir com  $Fe^{2+}$  para originar radicais alcoxil ( $LO^{\cdot}$ ) ou reagir mais lentamente com o  $Fe^{3+}$  para originar radicais peróxidos ( $LOO^{\cdot}$ ). **Reacção 12, 16, 17:** O MDA reage com bases de citosina, adenina e guanina.

Adaptado de: Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. 39(1): p. 44-84.

A neurotoxicidade do ferro pode advir da sua capacidade de produzir “Espécies Reactivas ao oxigénio” (ERO) através da oxidação do peróxido de hidrogénio (HOOH) via reacção de Fenton. Os produtos desta reacção são Fe(III), OH<sup>-</sup> e o radical OH•.

O cérebro é um órgão particularmente sensível a processos de stress oxidativo por vários motivos; têm uma capacidade reduzida de regeneração celular em comparação com outros órgãos, o consumo de O<sub>2</sub> é muito elevado (cerca de 20% do total de O<sub>2</sub> utilizado), os próprios neurotransmissores cerebrais (ex: dopamina, levodopa ou noradrenalina) são oxidáveis e os lípidos polinsaturados existentes no cérebro são extremamente sensíveis à peroxidação lipídica. Os produtos desta reacção (radicais livres orgânicos) podem por sua vez reagir, originando novos radicais livres, dando assim origem a um ciclo vicioso de produção de EROs e lesão das estruturas celulares.

A presença de ferro livre é assim um risco para a célula podendo ter uma acção directa, resultando numa maior susceptibilidade da célula a toxinas ou outros processos patológicos podendo em última instância resultar em fenómenos de apoptose.

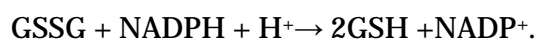
#### **1.4.2 Mecanismos de protecção de lesões induzidas pelo Ferro**

Existem no cérebro mecanismos de protecção contra estes EROs e radicais livres, que são produzidos mesmo em condições normais pelo metabolismo celular.

De facto o organismo desenvolveu diferentes tipos de defesas antioxidantes, que podemos categorizar em enzimáticas, não enzimáticas.

Como defesa enzimáticas temos enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona reductase (GR). A defesa primária contra o anião superóxido é dada pela superóxido dismutase (SOD), a qual eficientemente catalisa a conversão de dois O<sub>2</sub><sup>-•</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Existem três diferentes formas de SOD: citosólica Cu/ZnSOD, mitocondrial MnSOD e uma forma de alto peso molecular em fluidos extracelulares. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado por dismutação de O<sub>2</sub><sup>-•</sup> ou gerado por actividade enzimática é reduzido por uma cooperação de catalase e GPx. A acção da catalase decompõe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. A GPx catalisa ainda oxidação de glutathiona (GSH) em GSSG utilizando peróxidos como fonte de electrões e permitindo assim a eliminação quer de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quer de peróxidos lipídicos.

A relação entre glutathiona reduzida e glutathiona oxidada é mantida pela acção da Glutathiona reductase (GR) que catalisa a reacção:



Os sistemas de defesa não enzimáticos estão envolvidos na protecção contra propagação de reacções oxidativas em cadeia.

Um deles é a Glutathiona, que no seu estado reduzido reage com o peróxido de hidrogénio e origina Glutathiona oxidada, água e álcool. Impede assim, a reacção do ferro com o peróxido de hidrogénio (entre outros) e a consequente formação de EROs e radicais livres [93].

Outra molécula protectora é a Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que actua doando um electrão a EROs tornando-os assim menos reactivos [94].

Podemos ainda referir uma série de outras moléculas com este papel como a coenzima Q reduzida (ubiquinol), ácido ascórbico, bilirrubina e ácido úrico.

A sequestração de iões metálicos e proteínas transportadoras, como a hemopexina e haptoglobulina (heme-livre e heme-proteínas), ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina e albumina, também funciona como mecanismo protector não enzimático. A ceruloplasmina é de especial interesse, dado que ligando-se ao cobre, impede a sua actividade como catalisador de reacções e também funciona como uma ferroxidase para Fe(II).

### **1.4.3 Ferro e doenças neurológicas**

O papel da deposição de ferro no SNC, tem vindo a ser estudado com mais interesse nesta ultima década. Parece estar assente que esta deposição ocorre numa variedade de patologias neurológicas:

Esclerose Multipla [95]

Neurodegeneração com acumulação de ferro no cérebro [96]

Doença de Huntington [97]

Doença de Alzheimer [98]

Doença de Parkinson [98]

Neuroferritinopatia [99]

Aceruloplasminemia [100]

Enfarte Isquémico (Ischemic stroke) [101]

Enfarte hemorrágico (Haemorrhagic stroke) [102]

Ataxia de Friederich [103]

Não está no entanto clarificado se esta deposição é meramente um epifenómeno ou se efectivamente contribui ou está na origem destas patologias.

Podemos distinguir dois tipos de processos patológicos neurodegenerativos relacionados com o ferro: aqueles que resultam da acumulação de ferro em regiões específicas do cérebro e outros que resultam de alterações do metabolismo do ferro ou da sua homeostasia. Frequentemente estes processos implicam alterações a nível proteico que podem originar fenómenos de “misfolding” e agregação de proteínas, levando à formação de corpos de inclusão intracelulares que são a marca característica da patologia observada nos estudos *pós-mortem*[2].

O aumento do ferro cerebral pode ser causado por exemplo pela degradação do heme pela Heme-oxigenase-1 que assim induziria o início de stress oxidativo [104].

#### **1.4.4 Ferro e Esclerose Múltipla**

Estudo histológicos “*pós-mortem*” em cérebros humanos, estudos de MRI “*in-vivo*” e estudos experimentais em modelos animais com EAE (Encefalopatia experimental autoimune) comprovaram uma relação entre depósitos de ferro e a presença de EM.

Em estudos de MRI de doentes com esta patologia encontraram-se comparativamente a populações controlo, alterações sugestivas de depósitos de ferro em áreas de substância cinzenta, nomeadamente no núcleo rubro, tálamo, núcleo dentado, núcleo lentiforme, núcleo caudado, e córtex rolândico. Estas alterações, nomeadamente a hipointensidade em T2 na matéria cinzenta, eram mais acentuadas em doentes com EMSP do que em doentes com EMER [82, 105-109]. Numerosos estudos relacionam a hipointensidade em

T2 observada por MRI com manifestações clínicas na EM, nomeadamente com capacidades motoras [110] e cognitivas [107].

Por outro lado, existem também algumas evidências em estudos animais, de que terapias de quelatação trazem alguns benefícios na atenuação dos sintomas da doença [111-115]. No entanto, no único ensaio efectuado em humanos os resultados não foram conclusivos [116].

Vários autores tentaram avaliar o metabolismo do ferro no LCR e no soro de doentes com esclerose múltipla, na tentativa de o caracterizar nesta patologia, bem como o de avaliar possíveis diferenças capazes de caracterizar os seus sub-tipos.

Le Vine *et al* [117], caracterizam os níveis de ferritina, transferrina e ferro no LCR de doentes com EM. Neste estudo, a ferritina no LCR de doentes com EM progressiva activa era significativamente mais elevada que a observada na população controlo e em doentes com EM estável/remissão. Neste sentido os níveis de ferritina no LCR poderão vir a ter utilidade na discriminação de EMRR ou EMPP/EMSP. Não foram encontradas diferenças nos níveis de ferro ou transferrina no LCR entre doentes com EM e a população controlo.

Zeman D. *et al* [118], comparou os níveis de transferrina no LCR e no soro de doentes com diferentes subgrupos de EM. A transferrina é uma proteína cuja concentração tende a decrescer em doenças crónicas. No LCR no entanto, esta proteína comporta-se como um marcador de inflamação e a sua concentração aumenta nestes estados, sem correlação com os níveis séricos.

No que se refere à sua concentração no LCR, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de transferrina nas diferentes formas da doença, nem entre doentes com diferentes níveis de incapacidade. Contudo a sua concentração era significativamente mais baixa em doentes cuja duração da doença era inferior a dois anos do que naqueles em que essa duração excedia os 10 anos.

Os níveis de transferrina sérica eram no entanto, ligeiramente inferiores nos doentes com EMPP relativamente às outras formas da doença, sobretudo se comparado com doentes de EMSP e EMRR em remissão. Os valores mais elevados de transferrina foram observados em doentes com EMRR em remissão. Não se encontraram diferenças correlacionadas com idade, severidade da doença tratamento efectuado ou sexo. Também aqui se equaciona a possibilidade de utilização da transferrina no LCR e no soro para destringir entre diferentes formas de esclerose múltipla.

Constantinos Sfagos *et al* [3], introduziu nesta análise um novo parâmetro – os receptores solúveis de transferrina. Neste estudo, todos os doentes tinham a transferrina e ferro séricos dentro dos valores de referência calculados para populações saudáveis. A ferritina estava significativamente elevada nos doentes com EMPP activa. Os doentes com formas progressivas da doença apresentavam níveis mais elevados de ferritina do que os doentes com EMRR. Os receptores solúveis de transferrina (sRtr) estavam significativamente elevados nas formas cronicamente progressivas da doença e na EMRR activa comparativamente à população controlo. Estavam também aumentados nos doentes com formas crónicas progressivas não activas, embora não atingissem significância estatística. Nos doentes EMRR estáveis os níveis eram comparáveis aos da população controlo.

No entanto, comparando o conjunto dos doentes com formas progressivas da doença com o conjunto de formas de Exacerbação-Remissão, não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

## **2 OBJECTIVO**

O objectivo deste trabalho é o de estudar o comportamento de várias moléculas intervenientes no metabolismo de ferro num grupo de doentes Portugueses com diagnóstico comprovado de esclerose múltipla.

Pretendemos ainda correlacionar as possíveis alterações deste metabolismo com a evolução e estadio clínicos destes doentes, nomeadamente no que respeita aos diferentes sub-tipos de curso clínico da EM.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### Amostra

A amostra deste estudo foi constituída por 91 indivíduos ( 58 homens e 34 mulheres) da consulta externa de Neuroimunologia do Centro Hospitalar do Porto - Hospital de Santo António, diagnosticados com Esclerose Múltipla com base nos critérios de MacDonald [9] [10]. Estes doentes foram agrupados em 2 conjuntos de acordo com a sua classificação EDSS (Extended Disability Status Scale). Hoje em dia a EDSS é a escala mais utilizada para avaliar a incapacidade na EM. Desenvolvida originalmente em 1955 por John Kurtzke, a Disability Status Scale ou DSS foi dividida em dez níveis, onde o zero cursava com a ausência de sinais de doença ao exame neurológico e o dez indicava a morte pela EM - um acontecimento muito raro. Verificou-se que esta escala falhava na detecção de pequenas variações na gravidade da doença e, em 1983, foi expandida para 20 níveis, ao serem adicionados meios níveis entre o 1 e o 10 - daí o nome de “Expanded Disability Status Scale”.

Os doentes com um EDSS  $\leq 3$  há pelo menos 10 anos foram considerados como tendo EM benigna (n=54), enquanto aqueles que tinham um EDSS  $\geq 6$  foram considerados como tendo EM não benigna. A média da classificação EDSS, foi 2.87 (SD=1.88, intervalo: 0.0 a 7.5).

De acordo com o curso clínico da doença [119], 75 doentes tinham esclerose múltipla do tipo exacerbação-remissão (EMRR) e 16 tinham esclerose múltipla progressiva (EMP), dos quais 5 do tipo EMPP e 11 do tipo EMSP.

Foram ainda distribuídos em dois grupos etários. Um com doentes de idade inferior ou igual a vinte anos e outro com os doentes de idade superior a vinte anos.

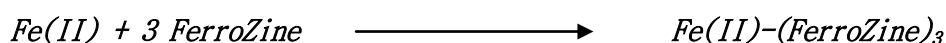
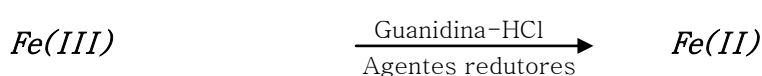
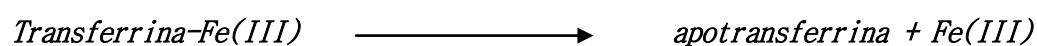
Estabeleceu-se ainda dois grupos de doentes com base no tempo de doença (desde o diagnóstico até á data de colheita das amostras).

A amostra utilizada para efectuar os doseamentos de ferro, ferritina, transferrina e receptores solúveis de transferrina foi soro, colhido com o sistema de colheitas de vácuo utilizado no Hospital de Santo António para um tubo VACUETTE Ref: 456018.

O grupo de controlo consistiu em 50 homens e 50 mulheres aparentemente saúdaveis sem qualquer patologia identificada.

## Ferro

No doseamento do ferro sérico utilizou-se o kit da Roche Diagnostics para o sistema analítico INTEGRA 800, (ref 20737585 322), que utiliza o método Guanidina/FerroZine. Neste método o ferro(III) é libertado da transferrina, por acção do cloridrato de guanidina e reduzido a ferro(II), por acção do ascorbato e da hidroxilamina. Os iões de ferro bivalente formam um complexo de cor vermelha com o FerroZine. A tiourea é utilizada para complexar os iões cúpricos, evitando a interferência dos mesmos nesta determinação.



A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração do ferro. É determinado medindo ao aumento da absorvância a 552nm.

As interferências estudadas para este teste estão referenciadas na tabela 1, tendo sido o critério de aceitabilidade utilizado, a recuperação estar dentro de  $\pm 10\%$  do valor inicial.

**Tabela 1 – Interferências analíticas no doseamento de ferro**

AMOSTRA	INTERFERÊNCIA
Hemólise	Sem interferência significativa até um índice H de 500 (aproximadamente 500 mg/dL)
Icterícia	Sem interferência significativa até um índice de 40 (aproximadamente uma concentração de bilirrubina total de 40 mg/dL)
Lipémia	Não utilizar amostras lipémicas.
Outras	Sem interferência significativa até um nível de albumina de 7 mg/dL e um nível de $\gamma$ -globulinas de 4 mg/dL.  Nos doentes tratados com suplementos de ferro ou com medicamentos de ligação a metais, o ferro ligado pelo medicamento pode não reagir correctamente no teste, conduzindo a resultados falsamente baixos.  Em casos muito raros, as gamopatias e em particular a de tipo IgM (macroglobulinémia de Waldenstroem) pode produzir resultados pouco fiáveis.

Os valores de referência considerados para população “normal” no nosso hospital estão referidos na tabela 2.

**Tabela 2 - Valores de referência do ferro considerados para população “normal”**

Valores de referência	
Mulheres	37 – 145 µg/dL
Homens	61 – 157 µg/dL

A precisão do teste determinada através do cálculo do coeficiente de variação é inferior a 2.9 % (inter-ensaios)

A sensibilidade analítica do teste é de 1.34 µg/dL.

### **Ferritina**

O teste automatizado utilizado baseia-se no princípio de aglutinação imunológica com intensificação da reacção por látex. É um ensaio imunotubidimétrico com intensificação da reacção por partículas. A ferritina humana aglutina com partículas de látex revestidas com anticorpos anti-ferritina. O precipitado é determinado turbidimetricamente a 552 nm. As amostras congeladas não devem ser descongeladas rapidamente já que esse processo pode levar à desnaturação da ferritina.

As interferências estudadas para este teste estão referenciadas na tabela 3, tendo sido o critério de aceitabilidade utilizado, a recuperação estar dentro de  $\pm 10\%$  do valor inicial.

**Tabela 3 - – Interferências analíticas no doseamento de ferritina**

<b>AMOSTRA</b>	<b>INTERFERÊNCIA</b>
Hemólise	Sem interferência significativa até um índice H de 960 (aproximadamente 960 mg/dL)
Icterícia	Sem interferência significativa
Lipémia	Sem interferência significativa até um índice L de 160. Existe uma correlação fraca entre o índice L e a concentração de triglicérides.
Factores reumatóides	Sem interferência significativa
Outras	Em casos muito raros, as $\gamma$ -patias e em particular a de tipo IgM (macroglobulinémia de Waldenstroem) pode produzir resultados pouco fiáveis.

Os valores das concentrações de ferritina em pessoas clinicamente saudáveis variam fortemente com o sexo e a idade. Os valores de referência considerados para população “normal” no nosso hospital estão referidos na tabela 4.

**Tabela 4 - Valores de referência do ferritina considerados para população “normal”**

Valores de referência	
Mulheres (< 50 anos)	15 – 150 µg/mL
Mulheres (> 50 anos)	30 – 400 ng/mL
Homens	30 – 400 ng/mL

A precisão do teste determinada através do cálculo do coeficiente de variação é inferior a 7.8 % (inter-ensaios)

A sensibilidade analítica do teste é de 7.5 ng/mL.

### **Transferrina**

É também utilizado um ensaio imunotubidimétrico. A transferrina humana aglutina com um antisoro específico e o precipitado é determinado turbidimetricamente a 340 nm.

Tal como para os testes anteriormente referidos, as interferências estudadas para este teste estão referenciadas na tabela 5, tendo sido o critério de aceitabilidade utilizado, a recuperação estar dentro de  $\pm 10\%$  do valor inicial.

**Tabela 5 - – Interferências analíticas no doseamento de transferrina**

AMOSTRA	INTERFERÊNCIA
Hemólise	Sem interferência significativa
Icterícia	Sem interferência significativa
Lipémia	Sem interferência significativa.
Factores reumatóides	Sem interferência significativa
Outras	Em casos muito raros, as Y-patias e em particular a de tipo IgM (macroglobulinémia de Waldenstroem) pode produzir resultados pouco fiáveis.

Os valores de referência considerados para população “normal” no nosso hospital estão referidos na tabela 6.

**Tabela 6 - Valores de referência de transferrina considerados para população “normal”**

Valores de referência	
Mulheres	200 – 360 mg/dL
Homens	200 – 360 mg/dL

A precisão do teste determinada através do cálculo do coeficiente de variação é inferior a 1.9% (inter-ensaios)

A sensibilidade analítica do teste é de 1.3 mg/dL.

#### **Receptores solúveis de transferrina**

A proteólise do receptor de transferrina na membrana celular origina a forma solúvel dos receptores de transferrina (sRtr). No plasma o sRtr encontra-se na forma de um complexo com a transferrina com um peso molecular aproximado de 160 kD. A concentração sérica do sRtr é directamente proporcional à concentração do receptor na membrana.

O método utilizado é imunotubidimétrico com intensificação da reacção por partículas. O receptor de transferrina humano aglutina-se com partículas de látex revestidas com anticorpos anti-receptor solúvel de transferrina. O precipitado é determinado fotometricamente a 583 nm.

Mais uma vez, as interferências estudadas para este teste estão referenciadas na tabela 7, tendo sido o critério de aceitabilidade utilizado, a recuperação estar dentro de  $\pm 10\%$  do valor inicial.

**Tabela 7 – Interferências analíticas no doseamento de receptores solúveis de transferrina**

AMOSTRA	INTERFERÊNCIA
Hemólise	Sem interferência significativa
Icterícia	Sem interferência significativa
Lipémia	Sem interferência significativa
Factor reumatóide	Sem interferência significativa até um nível de Factor reumatóide de 500 UI/mL
Outras	Em casos muito raros, as gamopatias e em particular a de tipo IgM ( macroglobulinémia de Waldenstroem) pode produzir resultados pouco fiáveis.

Os valores de referência considerados para população “normal” no nosso hospital estão referidos na tabela 8.

**Tabela 8 - Valores de referência de receptores solúveis de transferrina considerados para população “normal”**

Valores de referência	
Mulheres	1.9 – 4.4 mg/L
Homens	2.5 – 5.0 mg/L

A precisão do teste determinada através do cálculo do coeficiente de variação é inferior a 2.2 % (inter-ensaios)

A sensibilidade analítica do teste é de 0.1 mg/L.

### **Análises estatística**

A análise estatística foi feita com o programa informático GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)”.

A comparação entre os diferentes grupos de doentes foi feita utilizando o teste de t-student não emparelhado, análise de variâncias ANOVA e correlação de Pearson .

## 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O estudo da relação do ferro e do seu metabolismo com a patologia do foro neurológico nomeadamente com as doenças neurodegenerativas sofre de um paradoxo interessante. É relativamente fácil encontrar bibliografia que, de um ponto de vista teórico e genérico, relacione quer o ferro quer os elementos que intervêm no seu metabolismo com estas doenças. No entanto quando procuramos relacionar o doseamento deste elemento com as patologias em si ou com diversas fases de evolução das mesmas, defrontamo-nos com uma escassez desesperante. Parte deste problema terá provavelmente origem na aceção de um conceito relativamente imediato de que o cérebro é um órgão “blindado” por uma barreira – a barreira hematoencefálica- que isolaria o mesmo do resto do organismo, pelo que as alterações metabólicas que aí teriam lugar não seriam “visíveis” quando examinamos os outros órgãos e tecidos, mormente quando tentamos monitorizar a nível “externo” o que se passaria a nível “interno”.

Sendo certo que a barreira hematoencefálica tem efectivamente como função permitir um certo isolamento do cérebro, sabemos que obviamente esse isolamento não é total. Não sendo possível nem desejável proceder a estudos invasivos neste órgão, encontrar a nível periférico parâmetros que se relacionassem com a evolução da doença poderia vir a revelar-se de uma utilidade significativa.

### 4.1 Resultados globais

Partindo pois para uma análise genérica dos resultados obtidos, a primeira conclusão que se retira, é a de que os valores dos analitos estudados nos nossos doentes se encontram dentro dos valores de referência para uma população normal, para as metodologias utilizadas.

No conjunto de todos os doentes estudados, a concentração de ferro foi de  $95.3 \pm 36.2$  ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ), a de transferrina,  $275.3 \pm 48.3$  ( $\text{mg}/\text{dL}$ ), ferritina  $176.4 \pm 192.9$  ( $\text{ng}/\text{mL}$ ), receptores solúveis de transferrina  $3.097 \pm 0.985$  ( $\text{mg}/\text{L}$ ) (Tabela 9).

Os valores de hemoglobina de todos os doentes estudados encontravam-se dentro dos valores de normalidade para o respectivo sexo e idade.

**Tabela 9 – Resultados globais do conjunto de doentes analisado**

	Fe ( $\mu\text{g/dL}$ )	Tranf (mg/dL)	Receptor solúvel Transf. (mg/L)	Ferritina (ng/mL)
N	92	92	92	84
Mínimo	18	175	1,45	0
Mediana	92	267,5	2,94	101
Máximo	235	504	7,6	805
Média	95,3	275,3	3,097	178,4
Desvio Padrão	36,2	48,3	0,985	192,9

No grupo controlo estudado, a concentração de ferro foi de  $86.2 \pm 39.5$  ( $\mu\text{g/dL}$ ), a de transferrina,  $233.7 \pm 44.5$  (mg/dL), Ferritina  $105.1 \pm 104.0$  (ng/mL), receptores solúveis de transferrina  $3.879 \pm 1.263$  (mg/L), (Tabela 10)

**Tabela 10 – Resultados globais do grupo de controlo**

	Fe ( $\mu\text{g/dL}$ )	Tranf (mg/dL)	Receptor solúvel Transf. (mg/L)	Ferritina (ng/mL)
N	50	50	50	50
Minimo	18	135	0.790	2
Mediana	82	228	3.790	57
Máximo	229	333	6.200	397
Média	86.2	233.7	3.879	105.1
Desvio Padrão	39.5	44.5	1.263	104

Estes resultados são concordantes com os descritos por Sfagos e colaboradores [3], num estudo em 27 doentes com EM, onde encontrou valores de ferro e transferrina que se situavam dentro dos valores de referência para uma população normal. Do mesmo modo van Rensburg e col. [120] encontraram numa população de 27 mulheres caucasianas com EM, valores séricos de ferro, ferritina, transferrina e Saturação de transferrina, dentro do esperado para uma população normal. Valberg e col. [121] estudaram valores de transferrina e de saturação de transferrina em 31 mulheres e 18 homens com EM, em comparação com 49 controlos (de idade e sexo semelhantes), não tendo encontrado diferenças entre os mesmos. Os resultados deste autor vão de encontro aos do nosso estudo. Este autor refere no entanto que nos doentes enquanto analisados individualmente, se encontra um ou mais analitos com valores aumentados.

Importa então analisar estes dados em pormenor e em função dos conhecimentos que temos da EM no sentido de avaliarmos a existência de diferenças ou de tendências entre subgrupos de doentes.

Com esse objectivo optamos por subdividir a nossa amostra em vários subgrupos principais que direccionassem esta análise; doentes com esclerose múltipla do tipo exacerbação-remissão (EMRR), doentes com EM crónica progressiva (EMCP), doentes com EM do tipo primariamente progressiva (EMPP), doentes com EM secundariamente progressiva (EMSP), doentes com classificação EDSS<3, doentes com EDSS >6, doentes com patologia benigna, doentes com patologia não benigna, doentes com idade inferior, doentes com idade superior a vinte anos, doentes com esta patologia há menos de dez anos, doentes com esta patologia há mais de 10 anos, doentes em surto de doença e doentes a fazer terapêutica com interferon.

Analisemos então analito a analito em função dos grupos de doentes descritos.

## 4.2 FERRO

A análise do valor de concentração do ferro no total dos doentes com EM permite verificar que os mesmos se situam dentro dos valores considerados de referência para uma população “normal”. Assim, não estranhámos que comparando o valor de Ferro nos doentes com o observado na nossa população controlo, não obtivéssemos diferenças significativas,  $95.3 \pm 36.2$  vs  $86.2 \pm 39.5$  mg/dL (Tabela 11)

Tabela 11 – Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com EM e o grupo controlo.

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	EM	GC	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	91	50	-----	----
Média	$95.3 \pm 36.2$	$86.2 \pm 39.5$	<0.1272	10.5
Mediana	92.0	82.0	-----	12.2

Tendo por assente que não se encontrava diferença na concentração de ferro, entre doentes e população normal questionamo-nos sobre se apesar disso seria possível encontrar diferenças entre grupos específicos de doentes. A análise dos resultados obtidos nos grupos de doentes com EMRR e EMCP não parece evidenciar diferenças expressivas (Tabela 12).

**Tabela 12 - Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes EMRR e EMCP.**

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	EMRR	EMCP	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	75	16	-----	-----
Média	95.45 $\pm$ 36.23	90.19 $\pm$ 33.06	0.5937	5.8
Mediana	92.00	90.00	-----	2.2

Também aqui não se detectou qualquer diferença entre os doentes com estes dois tipos de doença.

No entanto, procurando ser exaustivos nesta análise procuramos diferenças entre os dois tipos de EMC; a EMPP e a EMSP.

**Tabela 13- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes EMPP e EMSP.**

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	EMPP	EMSP	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	5	11	-----	-----
Média	78.60 $\pm$ 33.16	95.45 $\pm$ 33.19	0.3623	15.6
Mediana	59.00	91.00	-----	54.2

Dado o número de doentes em cada grupo ser significativamente diferente, pensamos ser de maior utilidade olhar para o valor das medianas; 59.00 vs 91.00 mg/dL respectivamente para os doentes com EMPP e EMSP. A observação destes resultados levamos intuitivamente a considerar estarmos em presença de valores mais elevados de ferro para os doentes com EMSP.

Passamos então à análise destes dados em função da gravidade clínica da doença. Comparamos assim 2 grupos de doentes com classificação EDSS <3 e com EDSS >6. Procurou-se desta forma obter dois grupos de doentes com diferenças significativas no que respeita à situação clínica desta patologia. Os valores encontrados respectivamente para estas duas populações foram; 98.46  $\pm$  36.19 e 89.56  $\pm$  30.87 ( $\mu\text{g/dL}$ ), (Tabela 14).

Mais uma vez nos parece ser preferível olhar para o valor das medianas, mas neste caso, os valores são também eles aproximados.

**Tabela 14- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com EDSS<3 ou EDSS>6.**

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	EDSS < 3	EDSS > 6	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	54	9	-----	-----
Média	98.46 $\pm$ 36.19	89.56 $\pm$ 30.87	0,4890	9.9
Mediana	94.50	91.00	-----	

Se procurarmos agrupar doentes em função de as classificarmos clinicamente como benignas ou não benignas, obtemos dois pequenos grupos para os quais os resultados foram, 87.86  $\pm$  30.02 e 87.33  $\pm$  24.45 ( $\mu\text{g/dL}$ ), não havendo assim diferença significativa entre os dois grupos.

**Tabela 15- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com EM benigna e não benigna.**

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	EM BENIGNA	EM NÃO BENIGNA	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	14	12	-----	-----
Média	87.86 $\pm$ 30.02	87.33 $\pm$ 24.45	0.9619	0.6
Mediana	81.50	83.00	-----	

van Rensburg e col. [120], reporta em 2006 uma correlação positiva entre concentração de ferro e a idade do doente à altura do diagnóstico em doentes com EMRR, muito embora os valores de ferro encontrados nesses doentes estivessem dentro dos valores considerados normais. Assim, o ferro pareceria ter uma acção protectora contra o despoletar da doença em idades mais jovens. Dos doentes analisados por van Rensburg, seis mulheres com um início tardio da doença apresentavam níveis de ferro relativamente baixos, enquanto 3 mulheres com início precoce de diagnóstico, apresentavam valores altos de ferro mas valores de ferritina diminuídos. Assim, podemos estar em presença de um fenómeno de

desregulação do metabolismo do ferro (cuja origem pode ser genética e/ ou ambiental) que esteja na base do início da EM.

Na tentativa de verificar um fenómeno similar no nosso grupo de doentes, separamos a nossa população de estudo em função da idade utilizando os vinte anos como idade discriminatória.

Os resultados obtidos para o ferro foram:  $101.1 \pm 36.40$  e  $92.79 \pm 35.40$  ( $\mu\text{g/dL}$ ) (Tabela 16).

**Tabela 16- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com idade superior ou inferior a 20 anos.**

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	IDADE < 20	IDADE > 20	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	19	72	-----	----
Média	$101.1 \pm 36.40$	$92.79 \pm 35.40$	0.3377	8.9
Mediana	100	90.5	-----	10.5

No nosso caso, verificamos não haver diferenças estatisticamente significativas, sendo que tendencialmente os valores do ferro eram mais elevados nos doentes mais jovens.

Seguindo a mesma linha de pensamento, procuramos verificar se o tempo de duração da doença teria influência nos valores dos parâmetros analisados.

Nesse sentido, agruparam-se os doentes em duas populações com distintas durações de doença. Um grupo com doentes que apresentavam esta patologia há menos de 10 anos e outra com doença há mais de 10 anos (tabela 17).

Os resultados obtidos para o ferro foram:  $97.37 \pm 37.59$  e  $88.14 \pm 30.19$  ( $\mu\text{g/dL}$ ), (Tabela 17).

**Tabela 17- Comparação dos resultados do Ferro nos grupos de doentes com doença há mais de 10 ou há menos de 10 anos.**

FERRO ( $\mu\text{g/dL}$ )	DOENÇA < 10 ANOS	DOENÇA > 10 ANOS	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	63	28	-----	-----
Média	97.37 $\pm$ 37.59	88.14 $\pm$ 30.19	0.2559	10.5
Mediana	93.00	81.50	-----	14.1

Nos doentes com menos de dez anos de curso da doença, os valores de ferro são superiores aos encontrados nos doentes com curso de doença superior a dez anos.

Utilizando o teste de correlação de Pearson tentamos avaliar a correlação entre idade e concentração de ferro. Não se verificou correlação entre idade do doente e a concentração de ferro (factor de correlação de 0.046 e um p de 0.734).

Procuramos avaliar o comportamento dos valores do ferro nos doentes de EM em surto. Na comparação destes doentes com os doentes sem surto não se encontrou diferença significativa; 98.75 + 38.79 vs 93.37 + 35.55 ( $\mu\text{g/dL}$ ), com medianas de 93.50 para EM e 90.00 ( $\mu\text{g/dL}$ ), para os doentes em surto.

Avaliamos ainda a possível influência de medicação na concentração dos nossos analitos. Assim, comparamos o grupo de doentes a efectuar terapêutica com interferon beta e comparamos, quer com o nosso grupo controlo quer com os outros doentes. A comparação com os restantes doentes de EM tem de ser avaliada com cautela, já que não dispomos de certeza absoluta de que todos eles não se encontravam de facto sem qualquer terapia. Não foi observada qualquer diferença que permitisse inferir que a terapia com interferon influenciasse a concentração sérica de ferro.

### **4.3 TRANSFERRINA**

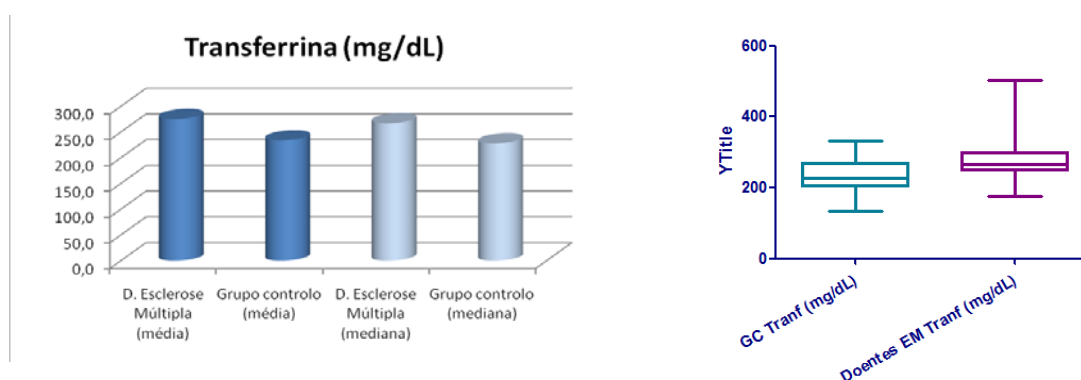
No conjunto de todos os doentes estudados, a concentração de transferrina foi de 275.3  $\pm$  48,3 (mg/dL), enquanto que no grupo controlo, foi de 233.7  $\pm$  44.5 (mg/dL) (Tabela 18).

Estes resultados são concordantes com os descritos por Sfagos e col. [3], num estudo em 27 doentes com EM, que encontrou nestes doentes, valores de ferro e transferrina que se situavam dentro dos valores de referência para uma população normal. Do mesmo modo van Rensburg e col. [120] encontraram numa população de 27 mulheres caucasianas com EM, valores séricos de transferrina dentro do esperado para uma população normal.

No entanto, no nosso caso embora os valores de transferrina estejam dentro dos valores de referência para uma população “normal”, observamos valores claramente mais elevados no grupo de doentes com EM do que no grupo controlo. Estes dados contrariam Valberg e col. [121] que estudaram valores de transferrina e de saturação de transferrina em 31 mulheres e 18 homens com EM, em comparação com 49 controlos (de idade e sexo semelhantes), não tendo encontrado diferenças entre os mesmos.

**Tabela 18 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EM**

TRANSFERINA (mg/dL)	Doentes c/ EM	Grupo de Controlo	p (<0.05)	Δ%
N	91	50	----	----
Média	275.3 ± 48.3	233.7 ± 44.5	<0.001	17.8
Mediana	267.0	228.0	----	17.1



**Gráfico 1 - Representação gráfica da variação da transferrina entre doentes de EM em surto e o grupo controlo.**

Le Vine e col. [117], caracterizam os níveis de transferrina no LCR de doentes com EM, não tendo encontrado diferenças nos níveis de transferrina desses mesmos doentes e a população controlo.

A análise dos resultados obtidos no nosso estudo, não parece evidenciar diferenças expressivas no que respeita aos níveis séricos de transferrina e dos receptores solúveis da transferrina entre os dois grupos de doentes estudados, EMRR e EMCP. Os valores séricos destes parâmetros, contudo, foram superiores no grupo de doentes com EMRR que no grupo de doentes com EMCP: transferrina (278.6 vs 256.3 (mg/dL)) (Tabela 19).

**Tabela 19- Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EMRR e EMCP.**

TRANSFERINA (mg/dL)	EMRR	EMCP	p (<0.05)	Δ%
N	5	11	-----	-----
Média	278.6 ± 49.90	256.3 ± 35.08	0,0934	8.7
Mediana	270.0	253.5	-----	6.5

Dentro dos tipos de EM crónica progressiva (EMP) podemos diferenciar dois tipos; a primariamente progressiva (EMPP) e a secundariamente progressiva (EMSP). Interessava então avaliar se são observáveis diferenças nos doentes que apresentavam estas duas formas de curso clínico da EM.

Assim a tabela 20 representa os valores encontrados para 5 doentes com Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva e 11 com Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva. Respectivamente para EMPP e EMSP os valores obtidos foram: 231.4 ± 27.49 e 267.6 ± 33.05 (mg/dL) (Tabela 20).

**Tabela 20 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EMPP e EMSP.**

TRANSFERINA (mg/dL)	EMPP	EMSP	p (<0.05)	Δ%
N	5	11	-----	-----
Média	231.4 ± 27.49	267.6 ± 33.05	0.0515	15.6
Mediana	229.0	256.0	-----	11.8

Estes resultados levam-nos intuitivamente a considerar estar-se em presença de valores mais elevados de transferrina (231.4 vs 267.6 (mg/dL)) para os doentes com EMSP. No entanto a análise estatística destes valores não resulta na expressão de uma diferença estatisticamente significativa.

Estes resultados são concordantes com os obtidos no trabalho de Zeeman e col. [118] publicado em 2000, no qual foram estudados os valores de transferrina no LCR e soro de 51 doentes com diagnóstico definitivo ou provável de EM. A transferrina é uma proteína cuja concentração tende a decrescer em doenças crónicas. No LCR no entanto, esta proteína comporta-se como um marcador de inflamação e a sua concentração aumenta nestes estados, sem correlação com os níveis séricos.

No que se refere à sua concentração no LCR, Zeman [118] não encontrou diferenças significativas entre os valores de transferrina nas diferentes formas da doença. No entanto, o resultado que encontrou para o soro vem corroborar o nosso estudo. A transferrina sérica era ligeiramente inferior nos doentes com EMPP relativamente às outras formas da doença, sobretudo se comparado com doentes de EMSP e EMRR em remissão. De igual modo, os valores que obtivemos para as diferentes formas de doença foram; EMPP: 231.4 mg/dL; EMSP: 267.6 mg/dL e EMRR: 278.6 (mg/dL).

Para analisar diferenças nestes parâmetros em doentes com diferentes níveis de gravidade clínica agrupou-se a amostra em dois subconjuntos de acordo com a classificação EDSS.

Os valores encontrados respectivamente para estas duas populações foram:  $279.1 \pm 54.12$  e  $262.3 \pm 41.88$  (mg/dL), (Tabela 21).

**Tabela 21- Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EDSS <3 e EDSS >6.**

TRANSFERRINA (mg/dL)	EDSS<3	EDSS>6	p (<0.05)	Δ%
N	54	9	-----	-----
Média	$279.1 \pm 54.12$	$262.3 \pm 41.88$	0.3787	6.4
Mediana	270.5	254.0	-----	

Verificamos que embora os valores de transferrina no grupo de doentes com EDSS <3, sejam mais elevados do que o grupo com EDSS >6, a diferença não é estatisticamente significativa.

Relativamente à benignidade e malignidade da patologia, os resultados obtidos nos doentes em que foi possível discriminar este factor foram:  $283.0 \pm 73.93$  e  $268.8 \pm 31.46$  (mg/dL), respectivamente para o grupo com EM benigna e EM não benigna (Tabela 22).

**Tabela 22- Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EM benigna e EM não benigna.**

TRANSFERRINA (mg/dL)	EM BENIGNA	EM NÃO BENIGNA	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	14	12	-----	-----
Média	$283.0 \pm 73.93$	$268.8 \pm 31.46$	0.5216	5.3
Mediana	269.5	264.5	-----	1.8

Procuramos então avaliar se a idade dos doentes teria alguma relação com os valores de transferrina séricos. Nos dois grupos de doentes discriminados em função da idade (20 anos como idade discriminatória), os resultados obtidos foram:  $292.1 \pm 70.85$  e  $270.1 \pm 39.66$  (mg/dL) (Tabela 23). Verificamos assim, não haver diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 23 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com idade inferior a 20 anos ou superior a 20 anos.**

TRANSFERRINA (mg/dL)	IDADE < 20	IDADE > 20	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	19	72	-----	-----
Média	$292.1 \pm 70.85$	$270.1 \pm 39.66$	0.0774	8.1
Mediana	275.0	265.0	-----	3.7

No grupo de doentes com distinta duração da doença (há menos de 10 anos e há mais de 10 anos), o resultado obtidos foi,  $273.5 \pm 44.0$  e  $277.4 \pm 57.40$  (mg/dL) (Tabela 24).

**Tabela 24 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes com EM há mais de 10 anos ou há menos de 10 anos.**

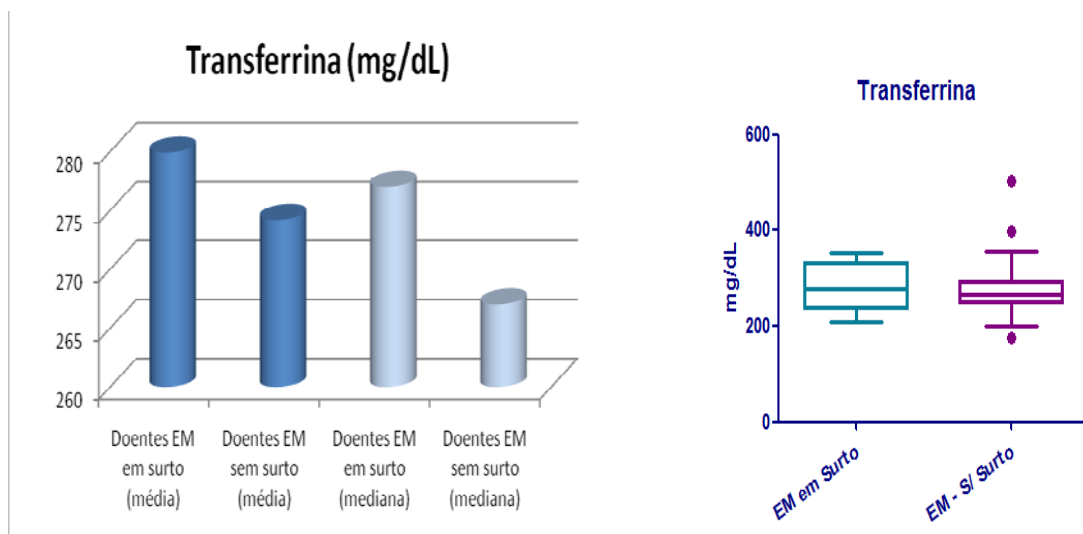
TRANSFERRINA (mg/dL)	EM <10 ANOS	EM >10 ANOS	p (<0.05)	Δ%
N	63	28	-----	-----
Média	273.5 ± 44.0	277.4 ± 57.40	0.7193	1.4
Mediana	266.0	267.5	-----	1.0

O estudo de Zeman e col. [118], analisou possíveis diferenças nos valores de transferrina, em grupos de doentes com EM há menos de dois anos, entre dois e dez anos e superior a dez anos, não tendo encontrado diferenças entre os mesmos, o que vem de encontro aos resultados obtidos no presente estudo.

Não se observaram diferenças na concentração de transferrina entre indivíduos na fase de surto (N=8) da doença e doentes sem surto (N=83), (279.9 + 51.68 vs 274.2) medianas 277.0 vs 267.0).

**Tabela 25 - Comparação dos resultados da Transferrina nos grupos de doentes em surto e doentes sem surto.**

TRANSFERINA (mg/dL)	DOENTES EM em SURTO	DOENTES EM sem SURTO	p (<0.05)	Δ%
N	8	83	-----	-----
Média	279.9 ± 51.68	274.2 ± 48.18	0.7517	2.1
Mediana	277.0	267.0	-----	3.7



**Gráfico 2-Representação gráfica da variação da transferrina entre doentes de EM em surto e sem surto.**

Quisemos ainda avaliar a influência da administração de interferon beta nestes doentes, na concentração de transferrina sérica.

Como seria de esperar, dada a diferença já referida entre a concentração de transferrina nos doentes de EM na sua totalidade e o grupo controlo, encontramos também uma diferença significativa entre o grupo de doentes de EM que estava medicado com interferon beta e o grupo controlo:  $277.1 \pm 53.61$  vs  $233.7 \pm 44.46$  (mg/dL), ( $p < 0.0001$ ).

**Tabela 26 - Comparação dos resultados da Transferrina no grupo de doente a tomar Interferon beta e o grupo de controlo.**

TRANSFERRINA (mg/dL)	EM c/ Interferon	GRUPO DE CONTROLO	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	57	50	-----	-----
Média	$277.1 \pm 53.61$	$233.7 \pm 44.46$	$P < 0.0001$	18.6
Mediana	268.0	228.0	-----	17.5

Dado que os valores de transferrina da população controlo são significativamente diferentes em função do sexo, tivemos o cuidado de confirmar que o mesmo fenómeno se

verificava para homens e mulheres quando estudados isoladamente. Assim, para os indivíduos do grupo controlo e doentes de EM a fazer terapia os valores encontrados foram respectivamente  $222.4 \pm 41.52$  vs  $247.9 \pm 28.39$  (mg/dL), ( $p=0.02$ ) para os homens e  $252.3 \pm 43.87$  vs  $292.9 \pm 57.57$  (mg/dL), ( $p=0.0092$ ).

No entanto quando procedemos à comparação destes valores, entre doentes de EM com e sem terapia com interferon, não encontramos diferenças significativas entre os mesmos:  $277.1 \pm 53.61$  vs  $261.0 \pm 43.52$  (mg/dL), ( $p=0.4193$ ).

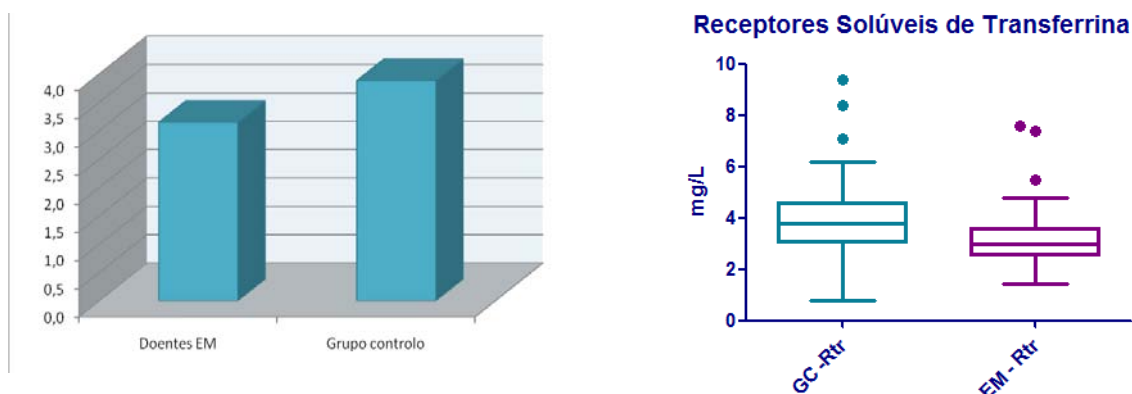
Em função deste dado parece-nos poder-se afirmar que a concentração de transferrina nos doentes com EM não é influenciada pela administração de interferon beta. Porém o grupo de doentes em que pudemos excluir com certeza absoluta a toma de interferon beta foi de apenas 9 indivíduos, pelo que apesar de as medianas destes dois grupos serem semelhantes, 268.0 (mg/dL) para o grupo sob terapia e 260.5 (mg/dL) para o grupo sem terapia, parece-nos prudente alargar este estudo a um número de doentes sem terapia antes de tecer qualquer conclusão.

#### **4.4 RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA**

Encontramos aqui uma diferença significativa entre a nossa população controlo e os doentes com EM. De facto, no conjunto de todos os doentes estudados, a concentração de receptores solúveis de transferrina foi  $3.081 \pm 0.9784$  (mg/L) contra  $3.879 \pm 1.263$  (mg/L) ( $p<0.0001$ ) (Tabela 27).

**Tabela 27 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina no grupo de doentes com EM e o grupo controlo.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA (mg/dL)	EM	GC	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	91	50	----	----
Média	$3.081 \pm 0.9794$	$3.879 \pm 1.263$	$P<0.0001$	23.3
Mediana	2.930	3.790	----	29.4



**Gráfico 3 – Representação gráfica da variação dos valores de concentração dos receptores solúveis de transferrina entre os doentes de EM e a população controlo.**

Estes valores surpreenderam-nos, já que Abo-Krysha e col. [95], tinham claramente observado o fenómeno contrário num estudo efectuado no Egipto em 2008.

Procuramos assim alguma justificação para esta contradição. Em primeiro lugar constatamos que no estudo referido a população utilizada se limitava a 20 doentes com EM e 10 indivíduos como grupo controlo, o que nos parece desde logo algo limitante.

Por outro lado a população de doentes de EM utilizada era exclusivamente feminina não havendo informação sobre se o mesmo critério foi utilizado para a população controlo, sabendo nós que os valores de referência para este parâmetro são significativamente diferentes em função do sexo. Esta diferença foi comprovada pela análise do grupo controlo onde se obtiveram os valores de Rtr de  $4.116 \pm 1.326$  (mg/L) para os homens e  $3.571 \pm 1.114$  (mg/L) para as mulheres ( $p=0.016$ ). No entanto, já que os valores nas mulheres são inferiores aos valores nos homens, o factor sexo não nos parece poder justificar esta diferença.

Procurando assim outra justificação para este fenómeno, observamos que não tinha sido indicado pelo autor se o grupo de doentes com EM estava medicado, nomeadamente com interferon.

Analisando o efeito da toma de interferon beta no nosso grupo de doentes, constatamos que os valores de Rtr nos doentes medicados com interferon beta tinham valores significativamente mais baixos que os que não se encontravam a fazer terapêutica:  $3.142 \pm 0.9116$  vs  $3.879 \pm 1.263$  (mg/L) ( $p<0.001$ ). Será assim de considerar a hipótese de que os nossos valores de Rtr sejam mais baixos nos nossos doentes que nos controlos, devido a um efeito acumulado de distorção da amostra em estudo (só elementos femininos) e de

possível interferência da medicação, que sabemos ser administrada a pelo menos parte da nossa amostra, desconhecendo no entanto esse factor na população estudada por Abo-Krishna [95].

Os nossos resultados não evidenciam diferenças expressivas no que respeita aos níveis séricos de receptores solúveis da transferrina entre os dois grupos de doentes estudados, EMRR e EMCP. Os valores séricos destes parâmetros, contudo, foram sempre superiores no grupo de doentes da EMRR que no da EMCP:  $3.146 \pm 1.039$  vs  $2.776 \pm 0.545$  (mg/L).

**Tabela 28 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EMRR e EMCP.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA (mg/L)	EMRR	EMCP	p (<0.05)	Δ%
N	75	16	-----	----
Média	$3.146 \pm 1.039$	$2.776 \pm 0.545$	0.1702	13.3
Mediana	2.980	2.670	-----	11.6

Sfagos [3] e Abo-Krishna [95] encontraram valores aumentados de receptores solúveis de transferrina em doentes com EMCP e EMRR activas relativamente à população controlo. Mais ainda, doentes com EMRR estável apresentavam também valores de receptores solúveis de transferrina aumentados embora não fossem estatisticamente significativos. Os nossos resultados contudo contrariamente a estes estão dentro dos valores de referência, o que parece contrariar os resultados estes autores. Provavelmente, as diferenças poderão ser em parte explicadas pelo maior número de indivíduos que constituem o grupo de doentes no nosso estudo.

Continuando a análise do Rtr nos doentes com EMCP procuramos perceber se o comportamento do mesmo era diferente consoante estivéssemos na presença de EMPP ou EMSP. Estes doentes foram discriminados em função do seu subtipo. Assim a tabela 29 representa os valores encontrados para 5 doentes com Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva e 11 com Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva. Respectivamente para EMPP e EMSP os valores obtidos foram,  $2.828 \pm 0.633$  e  $2.752 \pm 0.533$  (mg/L) (Tabela 29).

**Tabela 29 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EMPP e EMSP.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA (mg/L)	EMPP	EMSP	p (<0.05)	Δ%
N	5	11	-----	-----
Média	2.828 ± 0.633	2.752 ± 0.533	0.8056	2.7
Mediana	2.828	2.752	-----	2.8

Não existe assim qualquer diferença entre estes 2 grupos de doentes.

Também, não observamos diferenças entre o grupo de doentes com EDSS<3 e o grupo com EDSS>6. Os valores encontrados respectivamente para estas duas populações foram, 3.132 ± 1.078 e 2.977 ± 0.609 (mg/L) (Tabela 30).

Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por Sfagos e col. [3] e de Abo-Kryzna e col. [95], que não encontraram quaisquer correlações entre os valores de ferritina, receptores solúveis de transferrina e a distribuição dos doentes em função da escala EDSS.

**Tabela 30 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EDSS<3 e EDSS>6.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERINA (mg/L)	EDSS<3	EDSS>6	p (<0.05)	Δ%
N	54	9	-----	-----
Média	3.132 ± 1.078	2.977 ± 0.609	0.6761	5.2
Mediana	2.985	2.820	-----	5.8

Nos doentes que foi possível caracterizar relativamente à benignidade e malignidade da patologia os resultados obtidos foram:  $3.393 \pm 1.351$  e  $3.147 \pm 0.7336$  (mg/L) (Tabela 31).

**Tabela 31 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EM benigna e doentes com EM não benigna.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERINA (mg/L)	EM BENIGNA	EM NÃO BENIGNA	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	14	12	-----	-----
Média	$3.393 \pm 1.351$	$3.147 \pm 0.7336$	0.5785	7.5
Mediana	3.210	2.900	-----	10.7

Não se verificou qualquer diferença entre estes grupos.

No nosso grupo de doentes, separamos a nossa população de estudo em função da idade utilizando os vinte anos como idade discriminatória.

Os resultados obtidos para os receptores solúveis de transferrina foram,  $3.199 \pm 1.312$  e  $3.050 \pm 0,879$  (mg/L) (Tabela 32).

**Tabela 32 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com idade inferior a 20 anos ou superior a 20 anos.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA (mg/L)	IDADE < 20	IDADE > 20	p (<0.05)	$\Delta\%$
N	19	72	-----	-----
Média	$3.199 \pm 1.312$	$3.050 \pm 0,879$	0.5579	4.8
Mediana	2.840	2.960	-----	

Assim não parece que a idade do doente tenha qualquer influência nos valores de receptores solúveis de transferrina. Mas se a idade “per se” não parece influir, o mesmo acontecerá com o tempo de duração de doença? Ou seja, haverá diferença nos valores de

Rtr com o evoluir do tempo, não devido a um processo fisiológico normal de envelhecimento, mas devido ao processo patológico da EM?

Nos dois grupos formados por doentes com distintas durações de doença, um grupo de doentes com esta patologia há menos de 10 anos e outro com doença há mais de 10 anos, os resultados obtidos foram respectivamente:  $3.002 \pm 0.931$  e  $3.259 \pm 1.074$  (mg/L) (Tabela 33).

**Tabela 33 - Comparação dos resultados dos Receptores Solúveis de Transferrina nos grupos de doentes com EM há menos de 10 anos ou há mais de 10 anos.**

RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERINA (mg/L)	DOENÇA < 10 ANOS	DOENÇA > 10 ANOS	p (<0.05)	Δ%
N	63	28	-----	----
Média	$3.002 \pm 0.931$	$3.259 \pm 1.074$	0.2509	8.6
Mediana	2.950	2.900	-----	1,7

Não parece assim que o tempo de duração de doença tenha qualquer influência no evoluir deste parâmetro.

#### **4.5 FERRITINA**

No conjunto de todos os doentes estudados, a concentração de ferritina foi de  $178.4 \pm 193.2$  ng/mL, enquanto no grupo controlo estudado foi de  $105.1 \pm 104.0$  (ng/mL) (Tabela 34). Estes valores encontram-se dentro dos valores de referência para uma população normal (Homens: 12.5 – 454.0 ng/mL e Mulheres: 2.2 - 178.0 ng/mL). Existe no entanto uma diferença significativa entre os valores de ferritina nos doentes de EM e a nossa população controlo.

**Tabela 34 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EM e o grupo controlo.**

FERRITINA (ng/mL)	EM	GC	p (<0.05)	Δ%
N	83	50	-----	-----
Média	178.4 ± 193.2	105.1 ± 104.0	0.0013	39.3
Mediana	103.0	57.0	-----	80.7

O trabalho de van Rensburg e col. [120] que encontrou numa população de 27 mulheres caucasianas com EM, valores séricos de ferritina, dentro do esperado para uma população normal, é concordante com os nossos resultados.

Le Vine e col. [117], caracterizaram os níveis de ferritina no LCR de doentes com EM. Neste estudo, a ferritina no LCR de doentes com EM crónica progressiva activa era significativamente mais elevada que a observada na população controlo e em doentes com EMRR estável ou activa. Neste sentido os níveis de ferritina no LCR poderão vir a ter utilidade na discriminação de EMRR ou EMPP/EMSP. Não foram encontradas diferenças nos níveis de ferro ou transferrina no LCR entre doentes com EM e a população controlo.

Os nossos resultados no sangue periférico (doseamentos no soro), mostram um comportamento semelhante ao descrito por Le Vine e col. para o LCR, com a ferritina claramente mais elevada nos doentes com EM do que no grupo controlo. Atendendo a que para a ferritina os valores são significativamente diferentes quando falamos de homens ou mulheres, analisamos estes dados em função do sexo. O valor de ferritina manteve-se claramente aumentado quer no grupo dos homens (353.4 vs 145.8 (ng/mL)) quer no grupo das mulheres (95.52 vs 64.38 (ng/mL)).

Importa então analisar estes dados em pormenor e em função dos conhecimentos que temos da EM, no sentido de avaliarmos a existência de diferenças ou de tendências entre subgrupos de doentes.

Os valores encontrados respectivamente para EMRR e EMCP estão descritos na Tabela 35.

**Tabela 35 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EMRR e EMCP.**

FERRITINA (ng/mL)	EMRR	EMCP	p (<0.05)	Δ%
N	69	14	-----	-----
Média	167.3 ± 176.5	233.0 ± 261.6	0.2481	39.3
Mediana	99.0	122.0	-----	23.2

Apesar de os resultados não serem estatisticamente significativos, os níveis séricos de ferritina, apresentam diferenças expressivas entre os dois grupos de população em estudo.

De facto, os valores médios de ferritina foram superiores no grupo de doentes com EMCP que no de EMRR; mais ainda, a diferença entre esses valores foi de 39.3%, valor claramente elevado.

Esta diferença de concentrações de ferritina sérica entre estes grupos de doentes é também corroborada por Kotze e col. [122], que observaram nos seus estudos e numa população de 41 doentes, valores de ferritina significativamente diminuídas no grupo de doentes com EMRR relativamente aos valores encontrados no grupo com EMCP.

A ferritina é uma proteína de fase aguda pelo que o aumento da sua concentração em doentes com EMCP e em particular em doentes com doença activa seria indicativo da presença de um processo inflamatório em curso ou então um agravamento da doença.

Do mesmo modo e corroborando todos estes dados também Sfagos e col. [3] e Abo-Krishna e col. [95] encontraram valores significativamente aumentados de ferritina em doentes com Esclerose Múltipla activa onde o processo inflamatório é evidente.

Os valores de ferritina para os doentes com EMPP ou EMSP, foram:  $259.5 \pm 332.7$  e  $222.4 \pm 248.1$  (ng/mL) (Tabela 36).

**Tabela 36 - Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EMPP e EMSP.**

FERRITINA (ng/mL)	EMPP	EMSP	p (<0.05)	Δ%
N	4	10	-----	-----
Média	259.5 ± 332.7	222.4 ± 248.1	0.8214	16.6
Mediana	142.0	122.0	-----	16.4

Analisando a ferritina nos grupos de doentes com evolução clínica diferente (com EDSS <3 e outro com EDSS >6), os valores encontrados respectivamente para estas duas populações foram: Ferritina, 177.2 ± 196.4 e 234.1 ± 226.7 (ng/mL) (tabela 37).

Verificamos que embora os valores de ferritina no grupo de doentes com EDSS >6, sejam mais elevados do que o grupo com EDSS <3, nenhum dos parâmetros analisados apresenta diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 37- Comparação dos resultados da Ferritina no grupo de doentes com EDSS <3 e EDSS >6.**

FERRITINA (ng/mL)	EDSS < 3	EDSS > 6	p (<0.05)	Δ%
N	49	7	-----	-----
Média	177.2 ± 196.4	234.1 ± 226.7	0.4838	32.1
Mediana	92.0	198	-----	152

Apesar dos valores médios de ferritina serem do ponto de vista absoluto claramente distintos, o certo é que do ponto de vista estatístico essa diferença não é significativa.

De facto, o desvio padrão da ferritina nesta população é exageradamente elevado e terá de ser alvo de análise num próximo trabalho.

Este resultado terá de ser reavaliado com uma população mais expressiva antes de se poder tirar alguma conclusão.

Sfagos e col. [3] e de Abo-Krynsna e col. [95], não encontraram quaisquer correlações entre os valores de ferritina e a distribuição dos doentes em função da escala EDSS, o que foi comprovado pelo nosso estudo através de correlação de Pearson ( $p= 0.0889$ ), (Gráfico 4), mas as medianas destas duas populações são tão diferentes que se justifica uma reavaliação desta questão.

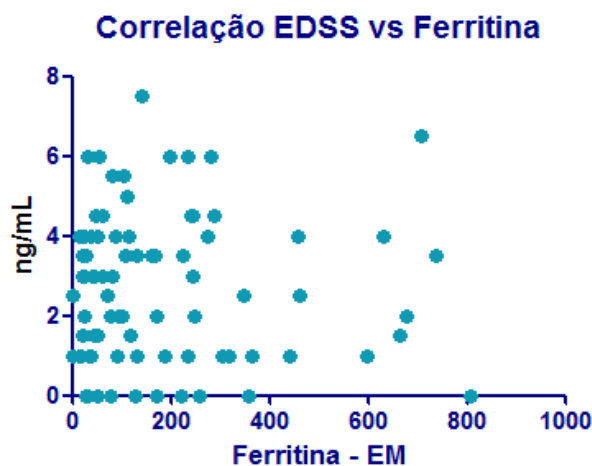


Gráfico 4 – Representação gráfica da correlação de Pearson entre a classificação EDSS dos doentes e os valores de ferritina.

Atendendo a que a gravidade da patologia será tanto maior quanto a sua posição na escala podemos inferir que o processo inflamatório nos doentes com EDSS >6 (considerando a ferritina como marcador de inflamação), será mais acentuado. Seria interessante proceder à análise de outros marcadores de inflamação comumente utilizados como a proteína C reactiva.

Paradoxalmente, ao compararmos os valores de doentes com EM benigna e EM não benigna verificamos que a ferritina está mais elevada com patologia benigna do que nos com patologia maligna.

**Tabela 38 - Resultados dos conjuntos de doentes com patologia benigna e maligna**

FERRITINA (ng/mL)	EM BENIGNA	EM NÃO BENIGNA	p (<0.05)	Δ%
N	12	11	-----	-----
Média	194.6± 212.8	186.6± 187.1	0.9254	5.3
Mediana	87.5	113.0	-----	29.1

Analisando os valores de ferritina nos grupos de doentes discriminados em função da idade, os valores da ferritina observados são mais elevados nos doentes com idade inferior a 20 anos:  $131.6 \pm 166.8$  e  $191.3 \pm 199.1$  (ng/mL)

**Tabela 39 - Resultados dos conjuntos de doentes com idade inferior a 20 ou superior a 20 anos de idade.**

FERRITINA (ng/mL)	IDADE < 20	IDADE > 20	p (<0.05)	Δ%
N	18	65	-----	-----
Média	$131.6 \pm 166.8$	$191.3 \pm 199.1$	0.2477	5.3
Mediana	83.0	110	-----	32.5

Concentrações baixas de ferritina podem evidenciar reservas de ferro diminuídas. Assim sendo, os valores de ferritina mais baixos nos doentes com menos de 20 anos, ajustar-se-iam a um raciocínio compatível com o facto de o início da patologia poder estar relacionado com a uma “desregulação do metabolismo do ferro.

No entanto, não podemos abstrair-nos de que os nossos doentes não estão a ser analisados à altura do diagnóstico e que serão necessários estudos complementares para se chegar a uma conclusão criteriosa.

Nos grupos de doentes com esta patologia há menos de 10 anos ou há mais de 10 anos o resultado obtido foi,  $197.1 \pm 210.1$  e  $137.4 \pm 144.7$  (ng/mL) (tabela 40).

**Tabela 40 - Resultados dos conjuntos de doentes com esta patologia há menos ou mais de 10 anos.**

FERRITINA (ng/mL)	DOENÇA < 10 ANOS	DOENÇA > 10 ANOS	p (<0.05)	Δ%
N	57	26	-----	-----
Média	197.1 ± 210.1	137.4 ± 144.7	0.1935	43.4
Mediana	105.0	98.5	-----	6.6

Quando comparamos os doentes de EM em surto de doença com os restantes verificamos não haver diferença significativa. De facto, embora as medianas destes dois grupos sejam de 88 (ng/mL) e 104 (ng/mL) respectivamente, os dois grupos são de tamanhos significativamente diferentes.

**Tabela 41 - Resultados dos conjuntos de doentes com EM em surto ou EM sem surto.**

FERRITINA (ng/mL)	DOENTES EM EM SURTO	DOENTES EM SEM SURTO	p (<0.05)	Δ%
N	7	76	-----	-----
Média	158.9 ± 150.2	180.2 ± 197.3	0.7820	13.4
Mediana	88	104	-----	

Este facto é indutor de alguma cautela na interpretação destes valores, ainda mais quando estaríamos à espera de uma variação exactamente no sentido contrário dado o processo inflamatório existente nos doentes em surto.

De modo igual ao que procedemos para os outros analitos, procuramos aperceber-nos do efeito da terapêutica com interferon beta nos valores da ferritina sérica. Os valores obtidos para o grupo de doentes a fazer terapêutica e comparativamente ao grupo de controlo foram respectivamente  $199.6 \pm 222.2$  vs  $105.1 \pm 104.0$  (ng/mL) . Mais uma vez me parece preferível ter em consideração os valores das medianas, ao invés das médias.

**Tabela 42 - Resultados dos conjuntos de doentes com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de controlo.**

FERRITINA (ng/mL)	DOENTES EM C/ INTERFERON	GRUPO CONTROLO	p (<0.05)	Δ%
N	7	76	-----	-----
Média	199.6 ± 222.2	105.1 ± 104.0	P=0.0005	13.4
Mediana	50	104	-----	208

Em qualquer dos casos, os valores entre os dois grupos parecem claramente diferentes. Dado que os valores da ferritina diferem em função do sexo, analisamos também estes dados separadamente para homens e mulheres, (Tabelas 43 e 44). Curiosamente embora a variação da ferritina nos doentes a tomar interferon seja sempre no sentido de valores mais elevados, no caso dos homens essa diferença chega a ter significância estatística, o mesmo não acontecendo com o grupo das mulheres.

**Tabela 43 - Resultados dos conjuntos de doentes do sexo masculino com EM a efectuar terapêutica com interferon e o grupo de controlo.**

FERRITINA (ng/mL)	HOMENS C/ EM A TOMAR INTERFERON	GC	p (<0.05)	Δ%
N	17	50	-----	-----
Média	421.8 ± 239.4	145.8 ± 120.6	<0.0001	289
Mediana	280	125.5	-----	231

**Tabela 44 - Resultados dos conjuntos de doentes do sexo feminino com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de controlo.**

FERRITINA (ng/mL)	MULHERES C/ EM A TOMAR INTERFERON	GC	p (<0.05)	Δ%
N	34	50	-----	----
Média	88.56 ± 94.41	64.38 ± 62.56	0,1614	37.5
Mediana	56	35	-----	60

Comparamos ainda, como é óbvio, os doentes a efectuar terapêutica de interferon com doentes que não a faziam. No entanto, na nossa população de estudo, só nos foi possível confirmar que o doente não estava a fazer terapêutica em 9 indivíduos, pelo que a comparação fica algo limitada.

**Tabela 45 - Resultados dos conjuntos de doentes do sexo masculino com EM a efectuar terapêutica com Interferon e o grupo de doentes onde se tinha a certeza de não estar a efectuar terapêutica.**

FERRITINA (ng/mL)	DOENTES EM A TOMAR INTERFERON	DOENTES C/EM S/ INTERFERON	p (<0.05)	Δ%
N	51	7	-----	----
Média	199.6 ± 222.2	216.6 ± 246.9	0.8525	8.8
Mediana	103.0	131.0	-----	27.1

Ao contrário do que acontece quando comparamos os doentes a tomar interferon com a população controlo, neste caso o valor da ferritina nos doentes sob terapêutica, é mais baixo do que o valor nos doentes que não estão a fazer terapêutica. Pode-se assim questionar, se o interferon tem real influência na descida da concentração da ferritina. Se assim for, este efeito não foi suficiente para nivelar a concentração de ferritina com a população controlo. De qualquer modo, dado que a diferença não foi estatisticamente

significativa, teremos de aprofundar este estudo no sentido de avaliar a real influência do interferon na concentração sérica de ferritina nos doentes de EM.

**Tabela 46 – Tabela global de resultados dos vários conjuntos de doentes analisados**

	EMER	EMCP	EMPP	EMSP	EDSS < 3	EDSS > 6	IDADE < 20 ANOS	IDADE > 20 ANOS	DOENÇA < 10 ANOS	DOENÇA > 10 ANOS	BENIGNA	MALIGNA
N	75	16	5	11	54	9	19	72	63	28	14	12
FERRO (mg/dL)	95.45 ± 36.23	90.19 ± 33.06	78.60 ± 33.16	95.45 ± 33.19	98.46 ± 36.19	89.56 ± 30.87	101.1 ± 36.40	92.79 ± 35.40	97.37 ± 37.59	88.14 ± 30.19	87.86 ± 30.02	87.33 ± 24.45
TRANSFERINA (mg/dL)	278.6 ± 49.90	256.3 ± 35.08	231.4 ± 27.49	267.6 ± 33.05	279.1 ± 54.12	262.3 ± 41.88	292.1 ± 70.85	270.1 ± 39.66	273.5 ± 44.0	277.4 ± 57.40	283.0 ± 73.93	268.8 ± 31.46
FERRITINA (ng/mL)	167.3 ± 176.5	233.0 ± 261.6	259.5 ± 332.7	222.4 ± 248.1	177.2 ± 196.4	234.1 ± 226.7	131.6 ± 166.8	191.3 ± 199.1	197.1 ± 210.1	137.4 ± 144.7	196.6 ± 212.8	186.6 ± 187.1
Recept. Sol. Transf (mg/L)	3.146 ± 1.039	2.776 ± 0.545	2.828 ± 0.633	2.752 ± 0.533	3.132 ± 1.078	2.977 ± 0.609	3.199 ± 1.312	3.050 ± 0,879	3.002 ± 0.931	3.259 ± 1.074	3.393 ± 1.351	3.147 ± 0.7336

Uma representação gráfica dos resultados pode ser visualizada nos gráficos seguintes onde se agrupa os resultados de cada analito versus grupos de doentes estudados.

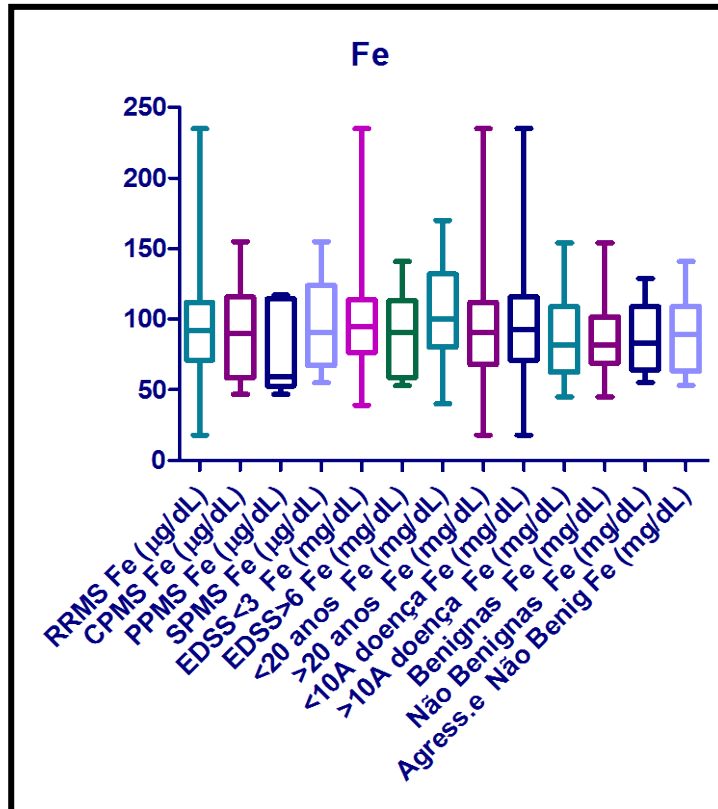


Gráfico 5 – Valores de ferro nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla

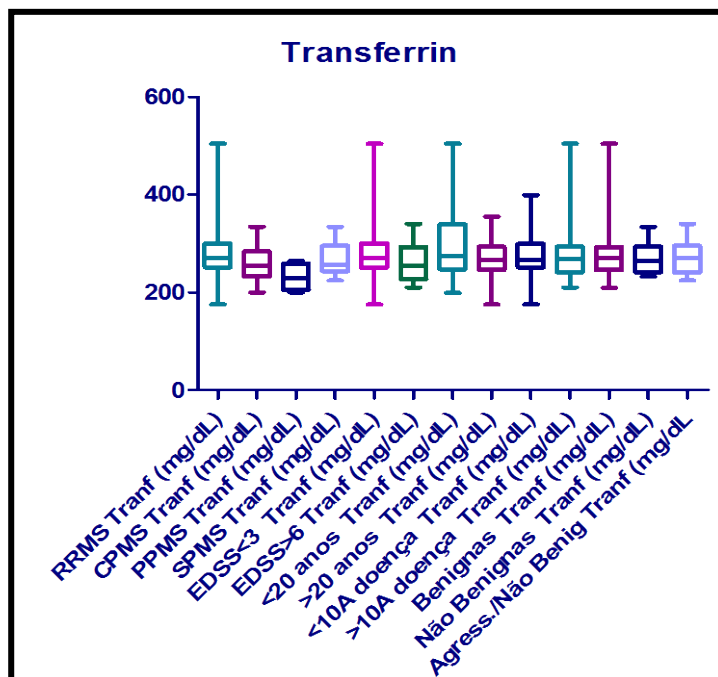


Gráfico 6 - Valores de transferrina nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla

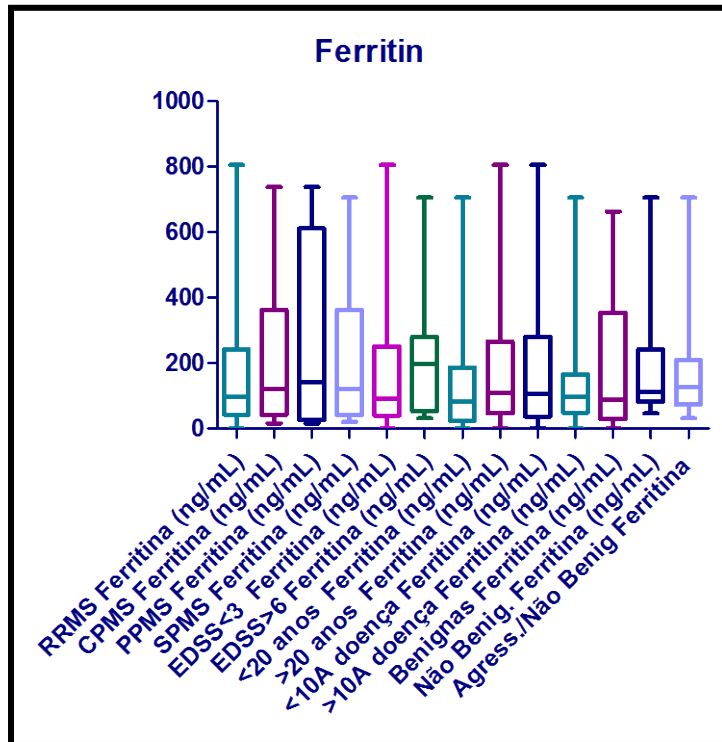


Gráfico 7 - Valores de ferritina nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla

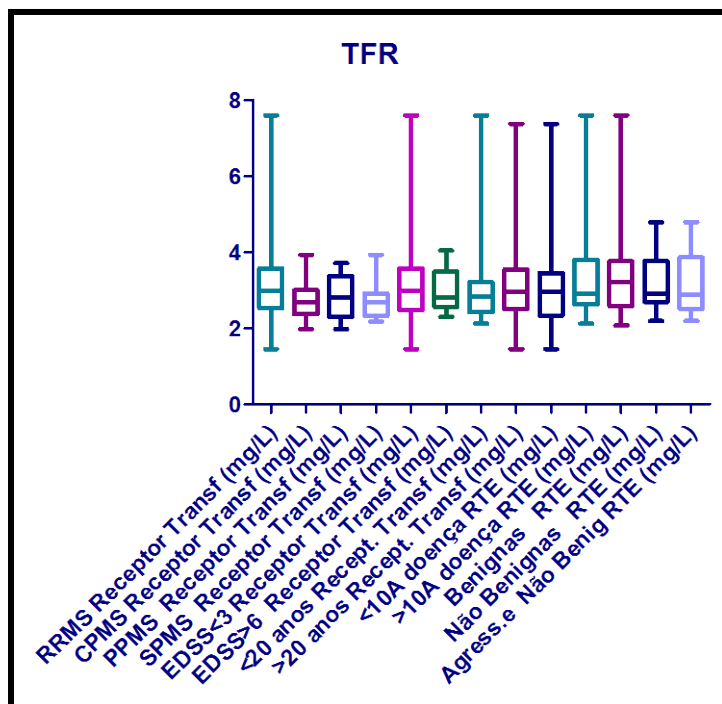


Gráfico 8 - Valores de receptores solúveis de transferrina nos diferentes subgrupos de doentes com esclerose múltipla

## 5 CONCLUSÃO

Estes resultados preliminares demonstraram uma falta de correlação entre o metabolismo do ferro a nível periférico e o curso da doença. Embora se observem diferenças entre os grupos de doentes com evoluções ou estadios diversos desta patologia, nomeadamente níveis de ferritina mais elevados em doentes com EMCP e ferro, transferrina e receptores solúveis de transferrina mais elevados em doentes com EMER, estas diferenças não tiveram significado do ponto de vista estatístico.

A associação de níveis de ferritina mais elevados para a fase crónica da doença era expectável dado que a ferritina tem esse comportamento em várias doenças crónicas.

Dado que não conhecemos até que ponto o estado do metabolismo do ferro a nível periférico reflecte a realidade deste elemento a nível cerebral, seria interessante alargar este estudo recorrendo a exames de ressonância magnética nuclear. A relação entre esses dados e os deste estudo poderiam então revelar-se mais esclarecedores da influência do metabolismo do ferro na fisiopatologia ou patogénese e curso da Esclerose Múltipla.

De qualquer modo e ressalvando a necessidade de aprofundar este estudo podemos desde já sintetizar algumas observações deste estudo que sirvam de referência para o futuro:

Os valores médios para todos os analitos na nossa população de estudo estão compreendidos no intervalo de normalidade definido por esses valores de referência.

Os níveis de ferritina transferrina são significativamente mais elevados nos doentes com EM do que no grupo controlo.

Os níveis de ferro, transferrina, e receptores solúveis de transferrina estão mais elevados nos doentes com Esclerose Múltipla Exacerbação-Remissão do que nos com Esclerose Múltipla Crónica Progressiva.

Os níveis de ferritina estão significativamente mais elevados nos doentes com Esclerose Múltipla do que no grupo controlo e encontram-se mais elevados embora sem significância estatística nos doentes com EMCP do que nos com EMRR e ainda mais elevado nos doentes com EMPP do que nos com EMSP.

Nos doentes idade superior a vinte anos de idade, a concentração de ferritina é claramente superior à encontrada nos doentes com idade inferior a vinte anos de idade.

Os níveis de ferro e transferrina estão mais elevados no grupo de doentes com EMSP do que nos que apresentam EMPP.

Nos doentes com um EDSS <3, o ferro e a transferrina tem níveis inferiores ao encontrados no grupo de doentes com EDSS >6.

Nos doentes com EDSS >6, a concentração de ferritina é claramente superior à encontrada nos doentes com EDSS <3.

Nos doentes com idade inferior a vinte anos de idade, os níveis de ferro e transferrina são inferiores aos encontrados nos doentes com idade superior a vinte anos.

Nos doentes com menos de dez anos de curso da doença, os valores de ferro e ferritina são superiores aos encontrados nos doentes com curso de doença superior a dez anos.

Nas EM com curso benigno os valores de transferrina, ferritina e receptores de transferrina, são superiores aos doentes com EM não benigno.

Existe ainda uma diferença significativa entre os valores de transferrina e ferritina nos doentes de EM a efectuar terapêutica com interferon e os valores encontrados no grupo controlo.

Não foram encontradas diferenças nos valores de ferro, ferritina, transferrina e receptores solúveis de transferrina, entre os doentes com EM em surto e os doentes que não se encontram em surto.

Ter-se-á ainda que proceder a estudos mais exaustivo e alargados no sentido de utilizar com eficácia os parâmetros do metabolismo do ferro no sangue periférico na avaliação de doentes com EM.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Moos, T., et al., *Iron trafficking inside the brain*. J Neurochem, 2007. **103**(5): p. 1730-40.
2. Zecca, L., et al., *Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(11): p. 863-73.
3. Sfagos, C., et al., *Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients*. Mult Scler, 2005. **11**(3): p. 272-5.
4. WHO, ed. *Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008*. 2008, WHO Press
5. Hohlfeld, R. and H. Wekerle, *Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14599-606.
6. Greenstein, J.I., *Current concepts of the cellular and molecular pathophysiology of multiple sclerosis*. Dev Neurobiol, 2007.
7. Buljevac, D., et al., *Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations*. Brain, 2002. **125**(Pt 5): p. 952-60.
8. Confavreux, C., et al., *Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. N Engl J Med, 1998. **339**(5): p. 285-91.
9. McDonald, W.I., et al., *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2001. **50**(1): p. 121-7.
10. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria"*. Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 840-6.
11. Miller, D.H., et al., *Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance*. Brain, 2002. **125**(Pt 8): p. 1676-95.
12. McFarland, H.F., *Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis*. AJNR Am J Neuroradiol, 1999. **20**(10): p. 1777-8.
13. Raine, C.S. and L.C. Scheinberg, *On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 1988. **20**(2-3): p. 189-201.
14. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Ann Neurol, 2000. **47**(6): p. 707-17.
15. Vollmer, T., *The natural history of relapses in multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2007. **256 Suppl 1**: p. S5-13.
16. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 683-747.
17. Hemmer, B., J.J. Archelos, and H.P. Hartung, *New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(4): p. 291-301.
18. Martino, G. and H.P. Hartung, *Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells*. Curr Opin Neurol, 1999. **12**(3): p. 309-21.
19. Sellebjerg, F., *Methylprednisolone treatment, immune activation, and intrathecal inflammation in multiple sclerosis*. Dan Med Bull, 2004. **51**(2): p. 167-83.
20. Sorensen, T.L. and R.M. Ransohoff, *Etiology and pathogenesis of multiple sclerosis*. Semin Neurol, 1998. **18**(3): p. 287-94.
21. McMahon, E.J., et al., *Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 335-9.
22. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2002. **359**(9313): p. 1221-31.

23. Ransohoff, R.M., *Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines*. J Neuroimmunol, 1999. **98**(1): p. 57-68.
24. Livingstone, C., ed. *Pathophysiology of multiple sclerosis*. In: Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H, editors. *McAlpine's multiple sclerosis*. 1998, Churchill Livingstone: London.
25. Trapp, B.D., R. Ransohoff, and R. Rudick, *Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability*. Curr Opin Neurol, 1999. **12**(3): p. 295-302.
26. Huang, Y.M., et al., *Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines*. J Neuroimmunol, 1999. **99**(1): p. 82-90.
27. Minagar, A., et al., *The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2002. **202**(1-2): p. 13-23.
28. Barbosa, L.F., M.H.G.d. Medeiros, and O. Augusto, *Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes?* Química Nova, 2006. **29**: p. 1352-1360.
29. Barkhatova, V.P., et al., *Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis*. Neurosci Behav Physiol, 1998. **28**(4): p. 341-4.
30. Stover, J.F., et al., *Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity*. Eur J Clin Invest, 1997. **27**(12): p. 1038-43.
31. Srinivasan, R., et al., *Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T*. Brain, 2005. **128**(Pt 5): p. 1016-25.
32. Micu, I., et al., *NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia*. Nature, 2006. **439**(7079): p. 988-92.
33. Salter, M.G. and R. Fern, *NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1167-71.
34. Werner, P., D. Pitt, and C.S. Raine, *Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage*. Ann Neurol, 2001. **50**(2): p. 169-80.
35. Kabat, E.A., M. Glusman, and V. Knaub, *Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods*. Am J Med, 1948. **4**(5): p. 653-62.
36. Genain, C.P., et al., *Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 170-5.
37. Raine, C.S., et al., *Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation*. Ann Neurol, 1999. **46**(2): p. 144-60.
38. Prineas, J.W. and J.S. Graham, *Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown*. Ann Neurol, 1981. **10**(2): p. 149-58.
39. Prineas, J.W., et al., *Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2001. **50**(5): p. 646-57.
40. Bitsch, A., et al., *Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation*. Brain, 2000. **123** ( Pt 6): p. 1174-83.
41. Ferguson, B., et al., *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions*. Brain, 1997. **120** ( Pt 3): p. 393-9.
42. Kornek, B., et al., *Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions*. Am J Pathol, 2000. **157**(1): p. 267-76.
43. Trapp, B.D., et al., *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 1998. **338**(5): p. 278-85.

44. Craner, M.J., et al., *Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8168-73.
45. Wolswijk, G. and R. Balesar, *Changes in the expression and localization of the paranodal protein Caspr on axons in chronic multiple sclerosis*. Brain, 2003. **126**(Pt 7): p. 1638-49.
46. Waxman, S.G., M.J. Craner, and J.A. Black, *Na<sup>+</sup> channel expression along axons in multiple sclerosis and its models*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(11): p. 584-91.
47. Jiang, Q. and P.K. Stys, *Calpain inhibitors confer biochemical, but not electrophysiological, protection against anoxia in rat optic nerves*. J Neurochem, 2000. **74**(5): p. 2101-7.
48. Stys, P.K., *White matter injury mechanisms*. Curr Mol Med, 2004. **4**(2): p. 113-30.
49. O'Brien, E.T., E.D. Salmon, and H.P. Erickson, *How calcium causes microtubule depolymerization*. Cell Motil Cytoskeleton, 1997. **36**(2): p. 125-35.
50. Lu, F., et al., *Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2000. **177**(2): p. 95-103.
51. Dutta, R., et al., *Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 478-89.
52. Franklin, R.J., *Why does remyelination fail in multiple sclerosis?* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(9): p. 705-14.
53. Qiu, A., et al., *Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption*. Cell, 2006. **127**(5): p. 917-28.
54. Shayeghi, M., et al., *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell, 2005. **122**(5): p. 789-801.
55. De Domenico, I., et al., *Evidence for the multimeric structure of ferroportin*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2205-9.
56. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
57. Cheng, Y., et al., *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex*. Cell, 2004. **116**(4): p. 565-76.
58. Bali, P.K., O. Zak, and P. Aisen, *A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin*. Biochemistry, 1991. **30**(2): p. 324-8.
59. Sipe, D.M. and R.F. Murphy, *Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8002-7.
60. Dautry-Varsat, A., A. Ciechanover, and H.F. Lodish, *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2258-62.
61. van Renswoude, J., et al., *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(20): p. 6186-90.
62. Liuzzi, J.P., et al., *Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13612-7.
63. Oudit, G.Y., et al., *L-type Ca<sup>2+</sup> channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1187-94.
64. Oudit, G.Y., et al., *Role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy*. J Mol Med, 2006. **84**(5): p. 349-64.
65. Theil, E.C., *Iron, ferritin, and nutrition*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 327-43.
66. De Domenico, I., D. McVey Ward, and J. Kaplan, *Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 72-81.
67. Delaby, C., et al., *Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3979-84.
68. Ganz, T., *Defensins and host defense*. Science, 1999. **286**(5439): p. 420-1.

69. Ganz, T., *Hepcidin in iron metabolism*. *Curr Opin Hematol*, 2004. **11**(4): p. 251-4.
70. Ganz, T., *Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 29-35, 507.
71. Loreal, O., et al., *Hepcidin in iron metabolism*. *Curr Protein Pept Sci*, 2005. **6**(3): p. 279-91.
72. Nemeth, E., et al., *The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 328-33.
73. De Domenico, I., et al., *The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(7): p. 2569-78.
74. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. *Science*, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
75. De Domenico, I., et al., *The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(25): p. 8955-60.
76. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
77. Babitt, J.L., et al., *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. *Nat Genet*, 2006. **38**(5): p. 531-9.
78. Babitt, J.L., et al., *Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(7): p. 1933-9.
79. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
80. Nicolas, G., et al., *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4596-601.
81. Tanno, T., et al., *High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1096-101.
82. Brass, S.D., et al., *Magnetic resonance imaging of iron deposition in neurological disorders*. *Top Magn Reson Imaging*, 2006. **17**(1): p. 31-40.
83. Stankiewicz, J.M. and S.D. Brass, *Role of iron in neurotoxicity: a cause for concern in the elderly?* *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2009. **12**(1): p. 22-9.
84. Connor, J.R., et al., *A quantitative analysis of isoferritins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains*. *J Neurochem*, 1995. **65**(2): p. 717-24.
85. Zecca, L., et al., *Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes*. *J Neurochem*, 2001. **76**(6): p. 1766-73.
86. Hirose, W., K. Ikematsu, and R. Tsuda, *Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain*. *Leg Med (Tokyo)*, 2003. **5 Suppl 1**: p. S360-6.
87. Connor, J.R., et al., *Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains*. *J Neurosci Res*, 1990. **27**(4): p. 595-611.
88. Ke, Y. and Z. Ming Qian, *Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(4): p. 246-53.
89. Ponka, P., *Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1012**: p. 267-81.
90. Moos, T. and E.H. Morgan, *Evidence for low molecular weight, non-transferrin-bound iron in rat brain and cerebrospinal fluid*. *J Neurosci Res*, 1998. **54**(4): p. 486-94.
91. Moos, T. and E.H. Morgan, *Kinetics and distribution of [59Fe-125I]transferrin injected into the ventricular system of the rat*. *Brain Res*, 1998. **790**(1-2): p. 115-28.
92. Moos, T., P.S. Oates, and E.H. Morgan, *Expression of the neuronal transferrin receptor is age dependent and susceptible to iron deficiency*. *J Comp Neurol*, 1998. **398**(3): p. 420-30.
93. Liddell, J.R., et al., *Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity*. *J Neurosci Res*, 2006. **84**(3): p. 578-86.

94. Crichton, R.R., et al., *Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells*. J Inorg Biochem, 2002. **91**(1): p. 9-18.
95. Abo-Krysha, N. and L. Rashed, *The role of iron dysregulation in the pathogenesis of multiple sclerosis: an Egyptian study*. Mult Scler, 2008. **14**(5): p. 602-8.
96. Clement, F., et al., *Neurodegeneration with brain iron accumulation: clinical, radiographic and genetic heterogeneity and corresponding therapeutic options*. Acta Neurol Belg, 2007. **107**(1): p. 26-31.
97. Simmons, D.A., et al., *Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease*. Glia, 2007. **55**(10): p. 1074-84.
98. Barnham, K.J. and A.I. Bush, *Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(2): p. 222-8.
99. Chinnery, P.F., et al., *Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460InsA mutation*. Brain, 2007. **130**(Pt 1): p. 110-9.
100. Xu, X., et al., *Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1012**: p. 299-305.
101. Davalos, A., et al., *Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction*. Neurology, 2000. **54**(8): p. 1568-74.
102. Hua, Y., et al., *Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 759-62.
103. Becker, E. and D.R. Richardson, *Frataxin: its role in iron metabolism and the pathogenesis of Friedreich's ataxia*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(1): p. 1-10.
104. Schipper, H.M., *Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1012**: p. 84-93.
105. Bakshi, R., et al., *T2 hypointensity in the deep gray matter of patients with multiple sclerosis: a quantitative magnetic resonance imaging study*. Arch Neurol, 2002. **59**(1): p. 62-8.
106. Bakshi, R., Z.A. Shaikh, and V. Janardhan, *MRI T2 shortening ('black T2') in multiple sclerosis: frequency, location, and clinical correlation*. Neuroreport, 2000. **11**(1): p. 15-21.
107. Brass, S.D., et al., *Cognitive impairment is associated with subcortical magnetic resonance imaging grey matter T2 hypointensity in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2006. **12**(4): p. 437-44.
108. Drayer, B., et al., *Reduced signal intensity on MR images of thalamus and putamen in multiple sclerosis: increased iron content?* AJR Am J Roentgenol, 1987. **149**(2): p. 357-63.
109. Neema, M., et al., *T1- and T2-based MRI measures of diffuse gray matter and white matter damage in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimaging, 2007. **17** Suppl 1: p. 16S-21S.
110. Tjoa, C.W., et al., *MRI T2 hypointensity of the dentate nucleus is related to ambulatory impairment in multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2005. **234**(1-2): p. 17-24.
111. Bownen, N., et al., *Inhibition of autoimmune neuropathological process by treatment with an iron-chelating agent*. J Exp Med, 1984. **160**(5): p. 1532-43.
112. Willenborg, D.O., et al., *Inhibition of allergic encephalomyelitis by the iron chelating agent desferrioxamine: differential effect depending on type of sensitizing encephalitogen*. J Neuroimmunol, 1988. **17**(2): p. 127-35.
113. Pedchenko, T.V. and S.M. LeVine, *Desferrioxamine suppresses experimental allergic encephalomyelitis induced by MBP in SJL mice*. J Neuroimmunol, 1998. **84**(2): p. 188-97.
114. Weilbach, F.X., et al., *The cardioprotector dexrazoxane augments therapeutic efficacy of mitoxantrone in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clin Exp Immunol, 2004. **135**(1): p. 49-55.
115. Pai, V.B. and M.C. Nahata, *Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention*. Drug Saf, 2000. **22**(4): p. 263-302.

116. Lynch, S.G., T. Fonseca, and S.M. Levine, *A multiple course trial of desferrioxamine in chronic progressive multiple sclerosis*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000. **46**(4): p. 865-9.
117. LeVine, S.M., et al., *Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*. Brain Research, 1999. **821**(2): p. 511-515.
118. Zeman, D., et al., *Transferrin in patients with multiple sclerosis: a comparison among various subgroups of multiple sclerosis patients*. Acta Neurol Scand, 2000. **101**(2): p. 89-94.
119. Lublin, F.D. and S.C. Reingold, *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey*. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology, 1996. **46**(4): p. 907-11.
120. van Rensburg, S.J., et al., *Iron and the folate-vitamin B12-methylation pathway in multiple sclerosis*. Metab Brain Dis, 2006. **21**(2-3): p. 121-37.
121. Valberg, L.S., et al., *Abnormalities in iron metabolism in multiple sclerosis*. Can J Neurol Sci, 1989. **16**(2): p. 184-6.
122. Kotze, M.J., et al., *Analysis of the NRAMP1 gene implicated in iron transport: association with multiple sclerosis and age effects*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(1): p. 44-53.

**U.** PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

R. ANÍBAL CUNHA N.º164  
4050-047 PORTO - PORTUGAL  
[WWW.FF.UP.PT](http://WWW.FF.UP.PT)