

Capítulo 1

Introdução

1.1 O Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso divide-se em Sistema Nervoso Central, em inglês, *Central Nervous System* (CNS) e Sistema Nervoso Periférico, em inglês, *Peripheral Nervous System* (PNS). Ao CNS chegam as informações relacionadas com os sentidos (visão, audição, olfacto, paladar e tacto) e dele partem as ordens destinadas aos músculos e glândulas. Ele é constituído por encéfalo (constituído pelo cérebro, cerebelo e tronco cerebral) e pela medula espinhal, que se situa dentro do canal raquidiano e a partir da qual se ramificam os nervos (figura 1).

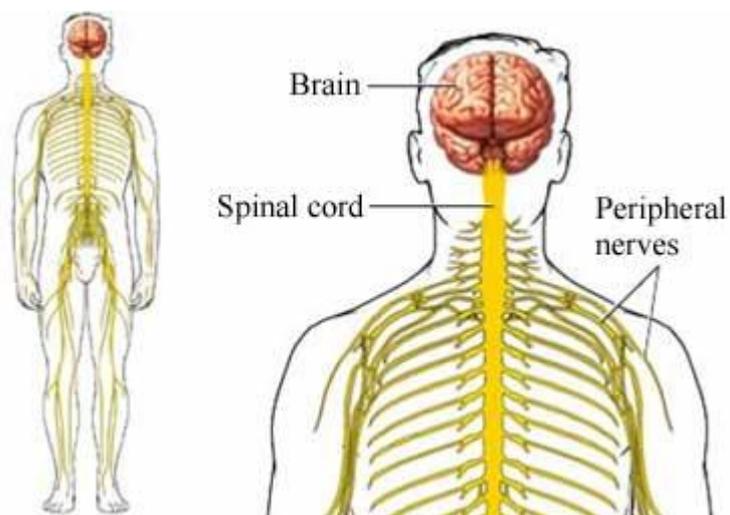


Figura 1- Sistema Nervoso Central [Fonte: www.images.com/image/281944/illustration-of-t...].

No CNS existem a substância cinzenta e a substância branca. A substância cinzenta corresponde às partes do CNS nas quais se concentram os corpos celulares e os dendritos das células nervosas, a substância branca é quase só constituída por axónios de células nervosas. O CNS também contém muitas outras células que pertencem ao tecido conjuntivo e em conjunto denominam-se glia ou neuroglia. Há cinco tipos de células gliais: os astrócitos, os oligodendrócitos, as células de Schwann, células da microglia e células endoteliais. Estas células desempenham diversas funções, entre as quais, a formação da mielina (material lipoproteico que envolve as fibras e aumenta a velocidade de transmissão dos impulsos nervosos) e desempenham um papel importante nos processos imunitários que têm lugar no CNS. Os nervos unem o encéfalo e a medula espinhal (CNS) às regiões periféricas. Os neurónios são células especializadas que intervêm na obtenção de sensações, no processamento de informação, no processo cognitivo, bem como no controlo da actividade muscular e glandular. Cada neurónio (figura 2) é formado por um corpo celular, núcleo celular, situado no interior do corpo celular e um ou vários prolongamentos. Estes prolongamentos denominam-se dendritos, quando transmitem os impulsos para o corpo da célula ou axónios quando transmitem os impulsos para o exterior (Kahle et al, 1993; Garcia e Coelho, 2009).

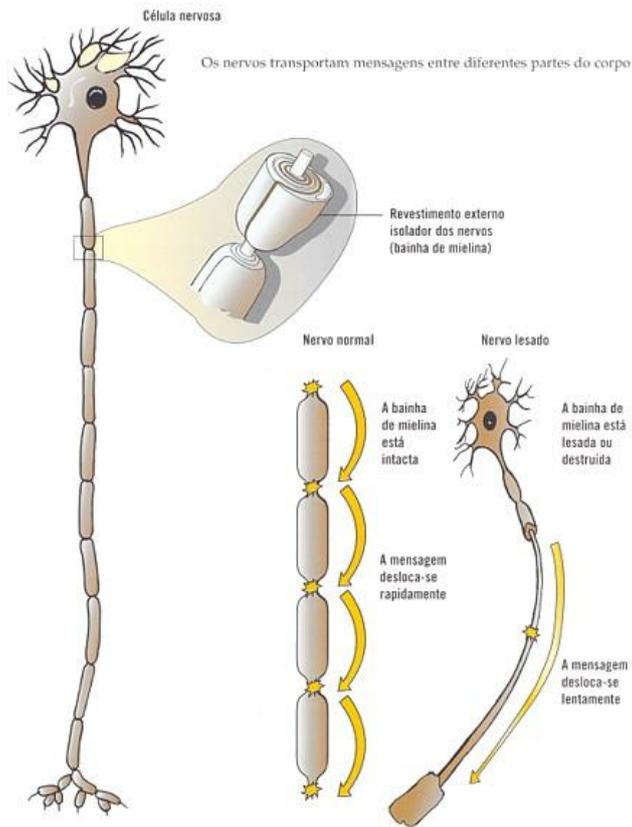


Figura 2 - Neurónio. Impulso nervoso num nervo normal e num nervo lesado [Fonte: <http://angola-africa.forum-ativo.com/o-nosso-corpo-f26/doencas-degenerativas-t107.htm>].

A comunicação entre os neurónios é um processo rápido, graças ao revestimento dos neurónios com bainha de mielina e que requer energia. Existem nos axónios segmentos descontínuos de mielina, essenciais para a condução rápida do impulso nervoso. Os canais de sódio (Na^+) sensíveis à voltagem produzem impulsos nervosos e estão concentrados nos nódulos de *Ranvier* (pequenos segmentos de axónio desmielinizado que se encontram entre os internódulos de mielina individuais). O impulso nervoso propaga-se rapidamente de nódulo em nódulo, segundo um processo denominado condução saltatória (Dutta et al, 2006). Quando há lesão da mielina (figura

2), ocorre uma lentificação na transmissão do impulso nervoso e a comunicação neuronal fica comprometida.

1.2 A maquinaria mitocondrial como principal fonte de energia

Os neurónios são altamente dependentes da energia do metabolismo oxidativo e os axónios em particular consomem quantidades significativas de adenosina trifosfato (ATP), o qual é usado primeiramente para fornecer energia ao sódio/potássio ATPase (Na^+/K^+), para remover os iões de Na^+ que entram no axónio durante a passagem do impulso nervoso.

Os nutrientes provenientes da dieta alimentar, nomeadamente os hidratos de carbono, são metabolizadas em piruvato, no citosol celular, que é depois convertido, na matriz mitocondrial, em acetil-cenzima A, que é processado por enzimas de fase aquosa no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou ciclo de Krebs. Este ciclo gera NADH e FADH_2 , intermediários com elevado potencial redutor, que são dadores de electrões para a Cadeia Respiratória Mitocondrial, em inglês, *Mitochondrial Respiratory Chain* (MRC), na membrana interna mitocondrial (Kid, 2005).

As mitocôndrias, para além de serem consideradas uma espécie de centrais energéticas das células, são também o local de um número importante de funções celulares, incluindo as vias essenciais do metabolismo intermediário, biossíntese de amino-ácidos, metabolismo de esteróides, controlo da concentração do Ca^{2+} e apoptose. Estes organelos possuem múltiplas cópias do seu próprio genoma e maquinaria de tradução, que funciona de forma semi-autónoma. O genoma mitocondrial humano

(mtDNA) consiste numa molécula circular de DNA em dupla hélice, com cerca de 16,6 kb, que contém 37 genes codificantes para 13 polipeptídeos essenciais para o sistema da MRC, bem como 22 tRNAs e 2 rRNAs necessários para a síntese proteica mitocondrial (Leonard et al, 2000). O número de mitocôndrias por célula depende da necessidade energética de cada tecido. A principal função da mitocôndria é gerar energia, essencialmente na forma de ATP. A mitocôndria gera mais de 90% das necessidades de ATP da célula (Kid, 2005) e contribui para a sinalização e regulação intracelular, desempenhando também um papel central na manutenção da homeostase da composição iónica da célula (Navarro et al, 2007).

A mitocôndria é um organelo citoplasmático delimitado por um sistema de dupla membrana: a membrana mitocondrial externa, em inglês, *Mitochondrial Externe Membrane* (MEM), que é permeável a pequenas moléculas e iões, as quais se movem através de canais transmembranares formados por uma família de proteínas integradas na membrana, chamadas porinas. Estas proteínas formam canais aniónicos dependentes de voltagem, sensíveis ao potencial da MEM, que permitem a troca de metabolitos entre a mitocôndria e o citoplasma (Navarro et al, 2007). A membrana mitocondrial interna, em inglês, *Mitochondrial Interne Membrane* (MIM) apresenta invaginações para o interior da matriz, formando cristas, onde se localizam os complexos multienzimáticos I, II, III, IV e V, que, em conjunto com os transportadores intermediários coenzima Q e citocromo c, formam o sistema da MRC, onde ocorre a fosforilação oxidativa, OXPHOS (Grazina, 2004). Neste processo (figura 3), os electrões provenientes da oxidação dos substratos (aminoácidos, carboidratos e ácidos gordos) são transferidos ao longo dos vários componentes, ocorrendo o bombeamento de protões para o espaço intermembranar, através dos complexos I (NADH desidrogenase, NQR), III (ubiquinol citocromo c reductase, QCR) e IV (citocromo c oxidase, COX), estabelecendo um

gradiente electroquímico que, ao ser dissipado através do complexo V (ATP sintetase), liberta energia usada para a síntese de ATP, a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico, catalisada por este complexo enzimático.

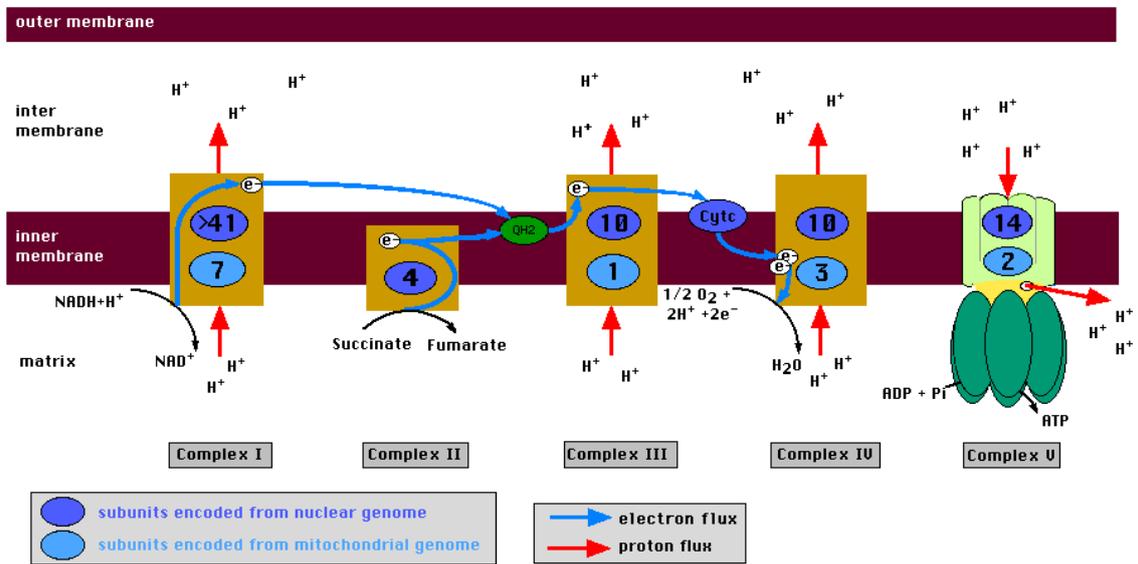


Figura 3- Representação esquemática dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e da via da fosforilação oxidativa [adaptada de mips.gsf.de/proj/medgen/pictures/rescha_hm.gif].

Os diferentes substratos com potencial redutor cedem electrões em locais diferentes da MRC. Por exemplo, o glutamato e o piruvato são metabolizados com produção de NADH, que é oxidado ao nível do complexo I, o succinato é oxidado a fumarato ao nível do complexo II (succinato desidrogenase), envolvendo o cofactor FADH₂; a oxidação dos ácidos gordos produz NADH, que é oxidado no complexo I, mas também pode originar glicerol-3-fosfato (ou também pode ser proveniente da di-hidroxi-acetona-fosfato formada no processo da glicólise), cuja oxidação, pela glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial, produz FADH₂, que cede os seus electrões à coenzima Q ou ubiquinona, transferindo electrões ao complexo III. A ubiquinona é um transportador intermediário, que transfere os electrões a partir dos complexos I e II para o complexo III. Este, por sua vez, reduz o citocromo c, o qual cede electrões ao complexo IV, que catalisa a redução de oxigénio (O₂), o aceitador final de electrões da MRC, a água (H₂O) (Leonard et al, 2000). O complexo IV contém 2 átomos de Cu em adição aos átomos de Fe hémicos dos citocromos *a* e *a*₃ (os átomos de cobre alternam entre os estados de oxidação Cu⁺ e Cu²⁺), o átomo de Fe do citocromo *a*₃ está intimamente associado ao átomo de Cu_(B), e o outro átomo de cobre Cu_(A) está a uma curta distância do heme do citocromo *a*. O citocromo c, é uma proteína que está inserida na superfície exterior da membrana interna da mitocôndria e transfere electrões, um de cada vez, para o citocromo *a* e para o Cu_(A). Na matriz mitocondrial, os electrões são cedidos para o citocromo *a*₃ e para o Cu_(B). Estes *shuttles* de electrões permitem que 4 electrões e 4 protões sejam captados por moléculas de O₂ ligadas ao citocromo *a*₃-Fe²⁺, (Mckee T et al, 1999), formando-se então 2 moléculas de água, segundo a equação 1.



Estes complexos proteicos, excepto o CII, que é codificado exclusivamente pelo DNA nuclear (nDNA), são constituídos por múltiplas subunidades codificadas por este genoma e pelo DNA mitocondrial, mtDNA (Taylor et al, 2005).

Em resumo, a mitocôndria utiliza oxigénio para produzir ATP. Ao processo mitocondrial de transferência de electrões e síntese de ATP chamamos OXPHOS (Ghafourifar et al, 2008), que consiste numa via metabólica, catalisada por proteínas constitutivas da MIM que medeiam a transferência de electrões entre os complexos da MRC e na libertação vectorial de H^+ para o espaço intermembranar e reentrada de H^+ para a matriz através do F_0 com síntese de ATP pela F_1 -ATP sintetase (Navarro et al, 2007), conforme o esquema representativo da MRC apresentado na figura 3.

1.2.1 Mitocôndria: fonte e alvo de espécies reactivas

A mitocôndria desempenha diversas funções na célula, para além da produção de ATP. É de destacar o papel crucial que desempenha na regulação da apoptose, através de proteínas pró- e anti-apoptóticas, localizadas na membrana mitocondrial externa, bem como factores indutores da apoptose (AIFs), localizados na matriz mitocondrial, ou pela libertação de citocromo c da MRC/MIM. Desempenha ainda a função de tampão celular de Ca^{2+} e é uma fonte importante de radicais livres (Turrens et al, 1985; Orth et al, 2001).

Um radical livre é qualquer espécie química que contenha um ou mais pares de electrões desemparelhados, que alteram a reactividade química de um átomo ou molécula tornando-os mais reactivos do que o correspondente elemento ou composto e

conferem-lhe a capacidade de aceitar electrões de outras moléculas por um processo de oxidação-redução. Os radicais livres celulares mais comuns são o radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). Os radicais livres e outras moléculas afins são muitas vezes classificados como espécies reactivas de oxigénio (ROS) e são um sub-produto do metabolismo celular, que surge pelo facto de durante o processo de OXPHOS e em mitocôndrias funcionais, 1 a 4% do O_2 na mitocôndria não ser completamente reduzido a H_2O , surgindo assim as ROS em vários locais da célula, mas são principalmente produzidos ao nível da MRC (Grazina e Oliveira, 2001). Apesar da maior parte do oxigénio ser reduzido a água pelo complexo IV da MRC, uma fracção é reduzida parcialmente a anião superóxido ao nível do complexo I ou da ubiquinona. A formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ aumenta com o incremento do fluxo de electrões através da MRC, como por exemplo no consumo elevado de O_2 ou pelo bloqueio do fluxo de electrões quando há inibição do complexo I da MRC pela rotenona, ou do complexo III pela antimicina A.

O $\text{NO}\cdot$, por si só, em concentrações fisiológicas, não é reactivo; contudo, pode ser facilmente convertido numa série de moléculas mais reactivas denominadas espécies reactivas de nitrogénio (RNS) (Brown et al, 2002). Apesar de ser um radical livre e um poderoso oxidante apenas com 1 electrão livre, desemparelhado, ele não reage prontamente com a maior parte das moléculas orgânicas que, na sua maioria, possuem orbitais de valência que estão totalmente preenchidas. Consequentemente, uma reacção que envolva $\text{NO}\cdot$, deixa a molécula orgânica com um electrão desemparelhado, resultando daí um radical orgânico intermediário. Tais reacções tendem a possuir energia de activação elevada e são, geralmente, lentas. Contudo, o $\text{NO}\cdot$ pode reagir rápida e directamente através do electrão desemparelhado, tanto com radicais orgânicos como com centros de oxigénio, podendo daí resultar uma variedade de intermediários

extremamente reactivos. O NO \cdot reage com o O $_2$, uma vez que o oxigénio molecular possui um tripleto no estado fundamental, contendo 2 electrões desemparelhados com *spins* paralelos em orbitais separadas, uma de cada átomo de oxigénio. As reacções prosseguem por passos de um electrão, produzindo uma série de espécies de oxigénio parcialmente reduzidas, que são citotóxicas. Estas espécies são o O $_2^{\cdot-}$, o HO \cdot e o peróxido de hidrogénio (H $_2$ O $_2$). O mecanismo geralmente aceite para a produção de radicais hidroxilo e peroxinitrito envolve a presença do O $_2^{\cdot-}$ segundo as reacções 2 a 5 (Gilgun-Sherki et al, 2004; Rubbo et al, 2008).



O NO \cdot reage rapidamente com metais de transição que têm estados de oxidação que diferem de um electrão, como por exemplo, o ião férrico (Fe $^{3+}$) e o ião ferroso (Fe $^{2+}$). A maioria das acções fisiológicas do NO \cdot ocorre quando este se liga ao Fe $^{2+}$ do grupo heme da guanilato ciclase causando activação da produção de guanosina monofosfato cíclica, em inglês, *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP) (Brown, 2002).

A reacção do NO[•] com o anião superóxido gera o anião peroxinitrito (ONOO⁻), um oxidante forte, capaz de danificar proteínas, lípidos, membranas, DNA e organelos subcelulares (Cross et al, 1997).

As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS e RNS. Estima-se que 1 a 4% do total do oxigénio consumido na mitocôndria é convertido em ROS. O aumento de ROS pode modificar lípidos e proteínas e causar alterações significativas do potencial transmembranar mitocondrial, $\Delta\Psi$ (Ghafourifar et al, 2008). As ROS também podem induzir um aumento da permeabilidade transitória mitocondrial, implicada no despoletar da morte celular por apoptose (Ghafourifar et al, 2008).

Em condições normais, as células possuem vários mecanismos de defesa contra os danos induzidos pelos radicais livres. Existem defesas antioxidantes capazes de degradar os radicais livres. O anião superóxido é transformado, pela superóxido dismutase (SOD) em H₂O₂, que, por acção da catalase, é convertido em água. No entanto, o H₂O₂ em concentrações muito elevadas e na presença de Fe²⁺ livre, pode levar à formação de espécies ainda mais lesivas, tal como o radical HO[•], pela reacção de Fenton e de Haber-Weiss (Grazina e Oliveira, 2001; Ghafourifar et al, 2008). Quando existe produção excessiva de ROS e RNS ou o desequilíbrio entre a sua produção celular e a capacidade das células para se defenderem destas espécies ocorre o processo denominado stresse oxidativo (Gilgun-Sherki et al, 2004; Mao et al, 2009), sendo este um dos mecanismos propostos para explicar a etiopatogenia de várias doenças do CNS, incluindo a MS (Lutskii et al, 2007). O stresse oxidativo pode causar danos celulares e, subsequentemente, morte celular, uma vez que os ROS podem oxidar componentes celulares críticos, tais como lípidos, proteínas e DNA, em especial o mtDNA, que tem sido implicado tanto no envelhecimento como no aparecimento de doenças neurodegenerativas (Jacobson et al, 2005; Grazina et al, 2006; Mao et al, 2009). Tal

como os aminoácidos excitatórios e neurotransmissores, as ROS são particularmente activas no cérebro e no tecido neuronal. Uma vez que a quantidade de ROS formada depende da quantidade de oxigénio consumido, células como os neurónios, com actividade metabólica mais elevada, ou segmentos neuronais enriquecidos em mitocôndrias, tais como as sinapses, produzem níveis mais elevados de ROS.

As RNS causam stresse nitrosilativo, que contribui para a destruição da mielina e das células da glia que participam na sua formação, os oligodendrócitos. Tem sido sugerida na literatura (Calabrese et al, 2002; Gilgun-Sherki et al, 2004; Ghafourifar et al, 2008) uma correlação directa entre o NO[•] e o bloqueio da condução observado na MS, uma vez que os dadores de NO[•] causam uma obstrução reversível na condução, tanto em axónios normais como nos desmielinizados, quer no CNS, quer no PNS. Adicionalmente, a condução em axónios desmielinizados e remielinizados é particularmente sensível ao bloqueio por NO[•], o que pode ser devido ao seu efeito directo sobre a neurotransmissão glutamatérgica. Foi demonstrado que o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é inactivado por nitrosilação e, para além disso, observou-se que a formação de S-nitrosoglutathione (GSNO) pode causar diminuição dos níveis de glutatião reduzido (GSH) e, conseqüentemente, activar modificações redox na sinalização celular, bem como modificar enzimas intracelulares chave, tais como as que constituem os complexos da MRC (Shiva et al, 2001; Calabrese et al, 2002).

Em condições patológicas, as RNS são produzidos em grande quantidade, especialmente o NO[•], proveniente da microglia activada, por acção da sintetase do óxido nítrico (NOS) induzida (iNOS) ou a partir das células endoteliais, por acção da NOS endógena (eNOS).

As principais fontes de espécies reactivas no processo inflamatório são as mitocôndrias danificadas e a microglia activada (Emerit et al, 2004).

1.3 A Esclerose Múltipla

Um cérebro adulto contem de cerca de 10^{11} - 10^{12} neurónios, os quais são mantidos e protegidos por pelo menos o dobro de células da glia. Existem vários tipos de células da glia, sendo os mais conhecidos, os oligodendrócitos, microglia e astrócitos. Durante muito tempo, foi considerado que as células da glia providenciavam apenas suporte estrutural para ajudar a proteger os neurónios, mais recentemente, foi sugerido que as células da glia, especialmente os astrócitos, exercem funções semelhantes às dos neurónios. Os oligodendrócitos têm como principal função, elaborar uma bainha de constituição lipídica à volta da maioria dos axónios que a atravessam, a bainha de mielina. A microglia é o equivalente aos macrófagos-monócitos, no sistema nervoso. Os astrócitos participam na constituição da barreira hematoencefálica, em inglês, *Blood-Brain Barrier* (BBB), e encefaloliquídiana (Garcia e Coelho, 2009). O endotélio dos pequenos vasos sanguíneos no cérebro é muito menos permeável a moléculas do que outros endotélios vasculares, mas deixa passar pequenas moléculas tais como a glucose e outras substâncias lipossolúveis, muitas outras são excluídas do cérebro pela BBB que também exclui os fagócitos, num cérebro saudável (Emerit et al, 2004).

A Esclerose Múltipla, em inglês, *Multiple Sclerosis* (MS) é uma doença do CNS mediada pelo sistema imunitário. Até à data, a sua causa ainda é pouco clara mas acredita-se que resulta de uma resposta anormal do sistema imunitário a um ou mais

antigénio de mielina, que se desenvolvem em indivíduos geneticamente susceptíveis, depois de expostos a agentes causais não definidos. Caracteriza-se por uma acumulação de macrófagos (microglia e cérebro) e linfócitos, no CNS (massa branca e massa cinzenta), conduzindo à desmielinização, destruição dos axónios (Mao et al, 2009) e formação de placas escleróticas (Kalman et al, 1999).

As principais características neuropatológicas são a perda de oligodendrócitos, desmielinização, diminuição neuroaxonal associada à inflamação e, possivelmente, à disfunção mitocondrial (Andrews et al, 2005; Kumleh et al, 2006; Dutta et al, 2006; Kalman et al, 2007; McQualter et al, 2007; Ghafourifar et al, 2008). O curso da doença resulta no seu agravamento, podendo ocorrer períodos sem manifestações clínicas (remissões), que alternam com surtos da doença (exacerbações) (Andrews et al, 2005). Com o decorrer do tempo, os doentes podem desenvolver lesões crónicas que promovem a lesão axonal irreversível, daqui resultando que a fase denominada *relapsing-remitting* (RRMS) evolui para uma fase secundária progressiva (SPMS), fase esta que é caracterizada por não haver recuperação ou recuperação mínima (Mao et al, 2009).

A MS caracteriza-se por ser uma doença heterogénea, com uma hereditariedade moderada e uma componente ambiental significativa. A complexidade desta patologia resulta do facto de não ser possível prever a expressão do fenótipo a partir do conhecimento dos efeitos dos factores etiológicos individuais considerados por si só, sendo necessário um estudo multidisciplinar para esta doença (Oksenberg et al, 2008).

A MS é uma patologia relativamente comum, afectando mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo. O risco da doença está associado à latitude, sendo menor em crianças e velhos e maior nas mulheres e na população caucasiana. A incidência da MS

parece ter aumentado consideravelmente no último século, com maior expressão nas mulheres (Oksenberg et al, 2008). É possível que alguns dos múltiplos factores envolvidos sejam defeitos ao nível do DNA, tanto no genoma nuclear como no mitocondrial, infecções virais, hipoxia e stresse oxidativo, baixa exposição à luz solar ou níveis insuficientes de vitamina D, níveis aumentados de macrófagos e linfócitos no cérebro (Mao et al, 2009). A figura 4 sumariza as possíveis causas para a MS.

A prevalência da MS é maior na Escandinávia, Islândia, Ilhas Britânicas e América do Norte (1 - 2: 1.000) do que no Sul da Europa (figura 5).

De acordo com alguns observadores, esta distribuição geográfica implica um agente patogénico ambiental que se encontra distribuído de forma ubíqua. Apesar desta distribuição geográfica da MS poder também ser explicada, pelo menos em parte, por variações regionais de factores de risco genético, curiosamente sabe-se que a exposição residencial ou ocupacional de doentes com MS à luz solar pode estar associada com uma baixa taxa de mortalidade, com a vitamina D a mediar o processo de abrandar a progressão da doença. Uma vez que a radiação ultravioleta é o principal catalizador da síntese endógena da vitamina D₃ nos humanos e que os níveis de vitamina D₃ são mais baixos comumente nas latitudes a Norte do que a Sul, isto poder explicar a razão pela qual os países do sul da Europa, têm taxas mais baixas de MS nas suas populações (Mao et al, 2009).

Foram realizados vários estudos para encontrar *loci* de susceptibilidade genética associados à MS, que apontam para o cromossoma 6p21.3, em particular do gene que codifica o antígeno leucocitário humano (*HLA*), bem como para os cromossomas 5p14 e 17q22 (Kalman et al, 1999).



Figura 4 - Factores que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da MS

[Adaptado de Mao et al, 2009].

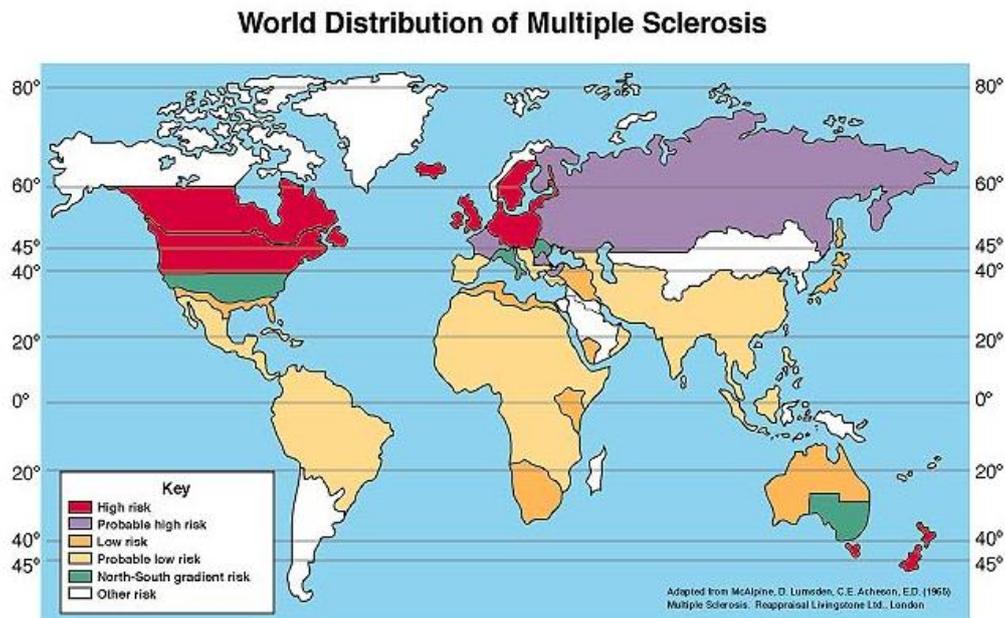


Figura 5 – Distribuição geográfica da Esclerose Múltipla no mundo [Fonte: <http://sofija.wordpress.com/2007/01>].

A hipótese mais antiga para a etiologia da MS é a de doença infecciosa causada por um micro-organismo. Contudo, após décadas de pesquisa, não se encontrou nenhum agente infeccioso específico na MS. Mesmo assim, muitos neurologistas e investigadores são da opinião de que o vírus Epstein-Barr e o Coronavírus podem estar envolvidos na patogenia da MS através do seu neurotropismo e ataque ao sistema imunitário (Mao et al, 2009).

A investigação de aspectos neuropatológicos avaliados por imagiologia destaca a contribuição da inflamação na neurodegenerescência que ocorre na MS (Kalman et al, 2007). As lesões resultantes da inflamação sugeriram a existência de uma resposta auto-

imune contra os componentes da mielina do CNS. Acredita-se que há muitas células envolvidas no processo da doença, tais como as células T CD4+ reactivas à mielina, as células T CD25+ regulatórias, as quais podem controlar as células CD4+ auto-reactivas, as células B reactivas à mielina, as células *killer* CD8+, macrófagos e a microglia do cérebro. Estas células infiltram-se em áreas discretas de tecido no CNS, onde vão provocar danos nos neurónios (lesões nos axónios) e nos oligodendrócitos, que se traduzem em alterações relacionadas com a desmielinização, resultando daí a formação de placas escleróticas. A desmielinização pode conduzir a lesões mais profundas nos axónios e à perda neuronal, sendo estas as principais características da doença e, ao mesmo tempo, os factores principais responsáveis pela progressão da doença e incapacidade do indivíduo (Ziemssen et al, 2005).

O ambiente intracelular, especialmente o balanço iónico, são críticos para a manutenção das funções neuronais. O desequilíbrio iónico é uma das hipóteses para explicar o mecanismo chave da fisiopatologia da MS.

Durante a progressão da doença, os mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, oxidantes e NO[•], são libertados pela microglia ou são gerados por hipoxia, fenómeno que se segue à lesão dos tecidos e que se acredita resultar numa disfunção do metabolismo oxidativo nos axónios desmielinizados. Estes mediadores diminuem a concentração de ATP e perturbam a função mitocondrial, causando falha na Na⁺/K⁺-ATPase, a enzima que é responsável pela correcção rápida dos níveis de Na⁺ e K⁺ e pela extorsão do Na⁺ a partir do axónio, o que previne o influxo patológico deste ião tanto nos axónios em repouso como em actividade. Por sua vez, a hipoxia é considerada um factor de stresse fisiológico, que induz uma resposta de dano na replicação do DNA. Também induz a inibição da actividade da Na⁺/K⁺-ATPase e, para além disso, as ROS também aumentam a degradação desta enzima. Quando as altas concentrações intra-

axonais de Na^+ resultantes desta falha, causam aumento da actividade da bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, com o efluxo de Na^+ , a requerer um nível mais elevado de influxo de Ca^{2+} , activam-se as proteases intra-axonais, resultando na fragmentação do neurofilamento e perturbação do transporte e integridade do axónio, conduzindo, por último, à degenerescência neuronal. De facto, a perda de actividade da ATPase Na^+/K^+ parece ser que mais contribui para o contínuo declínio neurológico nos estadios crónicos da MS (Mao et al, 2009).

Tendo em conta a limitação existente, relativa aos mecanismos etiopatogénicos da MS, foram desenvolvidos modelos experimentais com animais, em particular de encefalomielite autoimune experimental (EAE), com o objectivo de clarificar as causas e consequências desta doença, determinar mecanismos de perda de axónios na MS e avaliar a eficácia de terapias neuroprotectoras. Este modelo tem sido muito usado para avaliar a eficácia de tratamentos imunomodulatórios na MS, que envolve a formação de uma resposta auto-imune na periferia imunológica, imunizando animais com proteínas de mielina. Neste modelo simplificado, a EAE pode ser induzida por imunização dos animais susceptíveis com um número de antigénios de mielina, incluindo proteína de mielina básica (BMP), proteína proteolípídica (PLP) e glicoproteína da mielina do oligodendrocitócito (MOG) (Mao et al, 2009). A doença também pode ser passada de um animal afectado para um saudável, transferindo células T reactivas à mielina, os animais desenvolvem então um padrão patológico que é bastante diferente do humano mas onde se podem encontrar algumas marcas comuns à MS humana, nomeadamente, lesões inflamatórias focais no sistema nervoso (Ziemssen et al, 2005). Existem algumas limitações em usar a EAE como modelo para estudar a MS: primeiro porque a MS é uma doença espontânea enquanto a EAE é induzida, depois porque a MS tem uma grande heterogeneidade genética na população humana. Por isso, para entender a

progressão e a patologia da MS em ratos, seria necessário estudar múltiplos modelos que melhor se assemelhassem às características humanas (Mao et al, 2009).

1.4 Mecanismo molecular da inflamação

A MS é uma das doenças do CNS que possui maior componente de inflamação, desmielinização, astrogliose e danos nos axónios (Rejdak et al, 2008). Nesta doença, o sistema imunitário destrói as bainhas de mielina das fibras das células nervosas do cérebro e medula espinal (Adibhatla et al, 2008). A BBB é responsável pelo transporte selectivo de moléculas e células, da circulação para o CNS. Durante o estado de doença, como por exemplo na MS, torna-se permeável e permite a infiltração de moléculas e muitas células periféricas no cérebro. Algumas dessas células são as células T e B, que ficaram activas durante o processo inflamatório e que passaram a BBB, indo alojar-se no local da lesão. Aí, as células T são reactivadas pelos antígenos da mielina, libertam citocinas e activam a microglia, que começa a destruir a bainha de mielina. A desmielinização conduz à disfunção, primeiro reversível, depois irreversível, dos axónios, cujas propriedades de condução vão ficar deterioradas e contribuir para os sintomas clínicos associados a remissões (Ziemssen et al, 2005). As células T podem induzir a expressão de iNOS nas células da glia ao estabelecer contacto com elas (Saha et al, 2006). A penetração da BBB envolve inicialmente a captura de leucócitos pelas células endoteliais através das selectinas. Os leucócitos aderem ao endotélio através de interacções ligando-receptor das moléculas de adesão celular, e as quimiocinas produzidas localmente conduzem a migração direccionada através do endotélio. O Antígeno-1 Associado a Função Leucocitária, do inglês, *leucocyte function-associated*

antigene-1 (LFA-1) e o Antígeno-4 Muito Tardio, do inglês, *very late antigen-4* (VLA-4) são membros das moléculas de adesão do tipo integrinas, que estão envolvidas no tráfego e extravasão dos leucócitos. O LFA-1 é expresso exclusivamente nos leucócitos e interage com os seus ligandos, com as moléculas de adesão-1/-2/-3, para promover uma variedade de eventos de adesão celular necessários para o sistema imunitário, quer em casos normais quer patológicos. O VLA-4 é expresso maioritariamente nos linfócitos, monócitos e eosinófilos e interage com o seu ligando, a molécula-1 vascular de adesão celular, durante a inflamação crónica (McQualter et al, 2007). Está bem documentado que, na MS, as moléculas de adesão, tais como as selectinas-E, e a molécula-1 de adesão celular, são expressas durante as lesões activas do CNS, nas células endoteliais dos microvasos. Qualquer célula T activada, que expresse moléculas de adesão, pode ligar-se às moléculas de adesão correspondentes na superfície do endotélio, iniciando assim, a travessia do primeiro componente da BBB. Segue-se a extravasão da camada endotelial e as células T activadas que se dirigem ao tecido perivascular devem passar através da membrana basal endotelial composta por colagénio tipo IV. As células T utilizam enzimas da matriz, conhecidas por metaloproteinases, e outras capazes de degradar a matriz, que fazem “clipes” selectivos nos componentes da matriz extracelular, para facilitar a transmigração da lâmina basal. O colagénio tipo IV é marcado selectivamente pelas metaloproteinases 2 e 9 da matriz, as quais podem ser detectadas em doentes com MS. Uma vez passada a BBB, outras células inflamatórias, tais como as células T CD4+ e CD8+, macrófagos, granulócitos e células B, invadem rapidamente o CNS em resposta ao estímulo quimiotáctico e disseminam-se na substância branca (McQualter et al, 2007).

A figura 6 resume o processo da imunopatogenese da MS. Em (A), mostra-se o conceito patogénico da MS baseado na predisposição genómica, em que os doentes

herdam traços que conduzem a uma resposta imunitária alterada. Quando encontram um agente infeccioso, surge uma resposta imunitária das suas proteínas no sistema linfático periférico. Os antígenos específicos das células T e B activados atravessam a BBB e atingem os próprios antígenos expressos pelos oligodendrócitos e neurónios. Em concertação com a resposta imunitária inata no CNS, as células T e B causam danos inflamatórios. A susceptibilidade dos oligodendrócitos e neurónios aos danos inflamatórios e a capacidade de reparação e reorganização do CNS, determinam a extensão e as consequências funcionais dos danos inflamatórios. Em (B) apresenta-se o esquema da imunopatologia da lesão na MS. Um certo número células de imunitárias e do CNS estão envolvidas no desenvolvimento das lesões e na sua reparação. As células T e B e os macrófagos infiltram-se nas lesões. As células T CD4⁺ encontram-se localizadas na bainha perivascular. Estas células tornam-se reactivadas pelos antígenos presentes nas células dendríticas e nas células da microglia, libertando localmente citocinas e outros mediadores inflamatórios e, desse modo, atraindo os macrófagos para as lesões. As células T CD8⁺ infiltram-se no parênquima e, para além de libertarem outros mediadores inflamatórios, atacam directamente as células que expressam antígeno leucocitário humano classe I, tais como neurónios e oligodendrócitos. As células B encontram-se no espaço perivascular e meninges, onde libertam anticorpos IgG. Estes anticorpos ligam proteínas, que se expressam na superfície de oligodendrócitos e neurónios. Os anticorpos ligados podem fixar o complemento iniciando assim a cascata do complemento ou induzindo macrófagos à fagocitose mediada pelo anticorpo. Os macrófagos activados por sua vez, também libertam moléculas tóxicas e inflamatórias (ex: NO[•]), as quais vão danificar predominantemente oligodendrócitos e neurónios. Os astrócitos reactivos vão induzir a gliose na fronteira da

lesão, seguindo-se o dano inflamatório, os oligodendrócitos proliferam e remielinizam os axónios danificados (Hemmer et al, 2006).

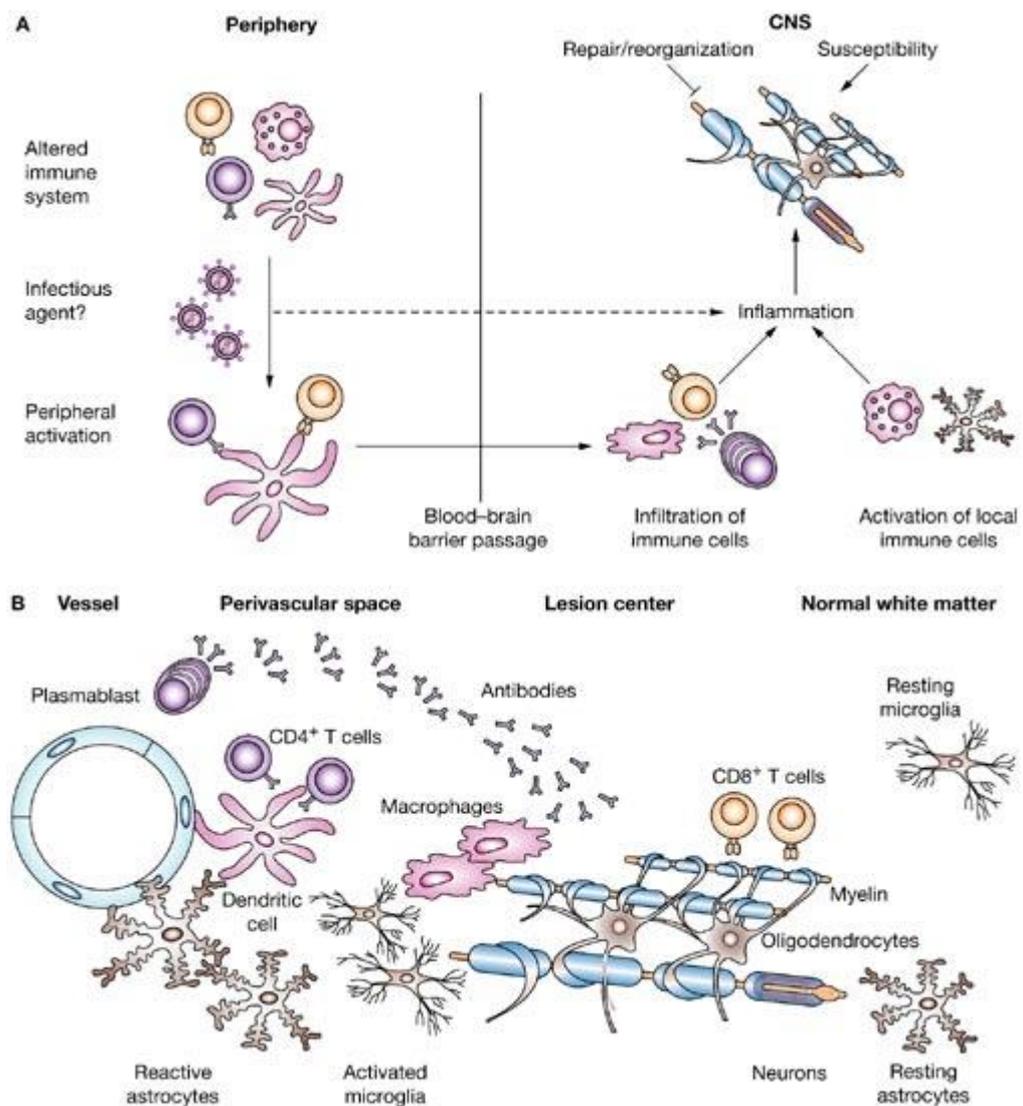


Figura 6- Immunopatogénese da MS [Fonte: Hemmer et al, 2006].

Foram feitos vários estudos em humanos, tanto em colheitas *pós-mortem* como em biópsias de tecido cerebral, tendo-se verificado que ocorrem precocemente lesões significativas nos axónios, denominadas lesões desmielinizantes, e que há uma correlação directa entre o grau de lesão axonal aguda e a magnitude da resposta inflamatória. Os dados da literatura permitiram sugerir que, na MS, as lesões axonais agudas são secundárias ao surgimento de uma variedade de mediadores inflamatórios tóxicos incluindo o TNF α , o Interferão γ e o NO \cdot , sendo este último, um dos principais candidatos a mediador tóxico primário dos danos agudos observados nos axónios. Na fase aguda da MS, o NO \cdot encontra-se presente em níveis elevados, ao mesmo tempo que a actividade dos axónios decai na sua presença. Fizeram-se experiências que confirmaram esta vulnerabilidade, apoiando a hipótese de que os axónios apresentam as fases iniciais da degeneração, quando estão a conduzir impulsos nas frequências fisiológicas enquanto estão expostos ao NO \cdot , mesmo que seja a baixas concentrações (Smith et al, 2001).

Os estudos por espectroscopia de ressonância magnética (MRS) *in vivo* são consistentes com as marcas neuropatológicas das lesões que ocorrem precocemente nos axónios de doentes com MS. Esta técnica permite medir um marcador específico do neurónio, o N-acetilaspártato (NAA), o qual é sintetizado na mitocôndria e expresso pelos neurónios de um cérebro adulto e é um dos índices mais específicos da densidade e da integridade dos axónios na substância branca. A flutuação, ou a descida, do nível de NAA, indica uma disfunção mitocondrial presente no início da doença e indica a perda neuroaxonal em lesões crónicas. O NAA está diminuído nas lesões agudas da MS e é parcialmente reversível na recuperação. Esta reversibilidade correlaciona-se com a fase de remissão da MS enquanto a redução permanente de NAA foi observada na fase de exacerbação (Andrews et al, 2005; Kalman et al, 2007).

1.5 Stresse oxidativo e desmielinização

Existem múltiplos factores que podem precipitar a ocorrência de stresse oxidativo, envolvendo diferentes vias e conduzindo à degenerescência neuronal e (Gilgun-Sherki et al, 2004). O CNS contém grandes quantidades de lípidos, essencialmente nas membranas celulares, sendo, por isso, muito susceptível à peroxidação lipídica, em inglês, *lipid peroxidation*, (LPO). Este é um dos processos reguladores mais importantes do metabolismo das principais biomoléculas e está subjacente a fenómenos de plasticidade celular, podendo influenciar o suporte energético das células e do corpo como um todo (Lutskii et al, 2007). Por exemplo, a cardiolipina é um fosfolípido que se encontra exclusivamente na membrana mitocondrial e é essencial para o bom funcionamento da MRC (Adibhatla et al, 2008).

Se as membranas da célula sofrerem distúrbios ao nível funcional ou estrutural, em resultado da acção de elevadas concentrações de ROS e de produtos da peroxidação lipídica resultantes do stresse oxidativo, estão criadas as condições de base para o desenvolvimento de patologia. O stresse oxidativo é encarado como um dos mecanismos subjacentes à patogenia de várias doenças do CNS, incluindo a MS (Lutskii et al, 2007; Ghafourifar et al, 2008).

A desmielinização deve-se, primariamente, ao facto da mielina ser uma membrana lipoproteica constituída por mais de 80% de fosfolípidos, glicolípidos e esteróides, sendo por isso susceptível à LPO. Por outro lado, deve-se também às características do CNS, nomeadamente à capacidade insuficiente dos sistemas de defesa antioxidante, perante condições de stresse oxidativo intenso.

Durante a fase aguda da MS, os níveis de produtos resultantes do stresse oxidativo encontram-se aumentados e/ou os níveis de enzimas ou outras defesas

antioxidantes encontram-se diminuídos, quer no sangue, quer no líquido encefalorraquidiano, em inglês, *cerebrospinal fluid*, (CSF) (Sayer et al, 2008). O stresse oxidativo na MS pode ser uma consequência dos níveis elevados de ROS e RNS, resultantes da reacção inflamatória, que reflectem maioritariamente a falha do sistema energético da microglia activada. Foi observado que, nos doentes com MS, as células mononucleares activadas produzem quantidades elevadas de ROS e RNS e foram descritos danos oxidativos no DNA, incluindo o mtDNA, em associação com a inflamação das placas crónicas activas (Sayer et al, 2008). Sabe-se que os macrófagos e a microglia expressam metaloproteinases e geram ROS na substância branca. Estudos recentes que envolvem o cortex cerebral na MS, indicam que a produção microglial de ROS também está provavelmente envolvida na desmielinização cortical (Mao et al, 2009).

1.6 Disfunção da mitocôndria como causa da neurodegenerescência na MS

A investigação actual aponta para o envolvimento de anomalias específicas, ao nível mitocondrial, no desenvolvimento e progressão da MS, nomeadamente: 1) defeitos ao nível do mtDNA, 2) expressão anormal dos genes mitocondriais, 3) actividade enzimática mitocondrial anormal, 4) actividade reparadora do DNA mitocondrial deficiente e 5) disfunção mitocondrial (figura 7).

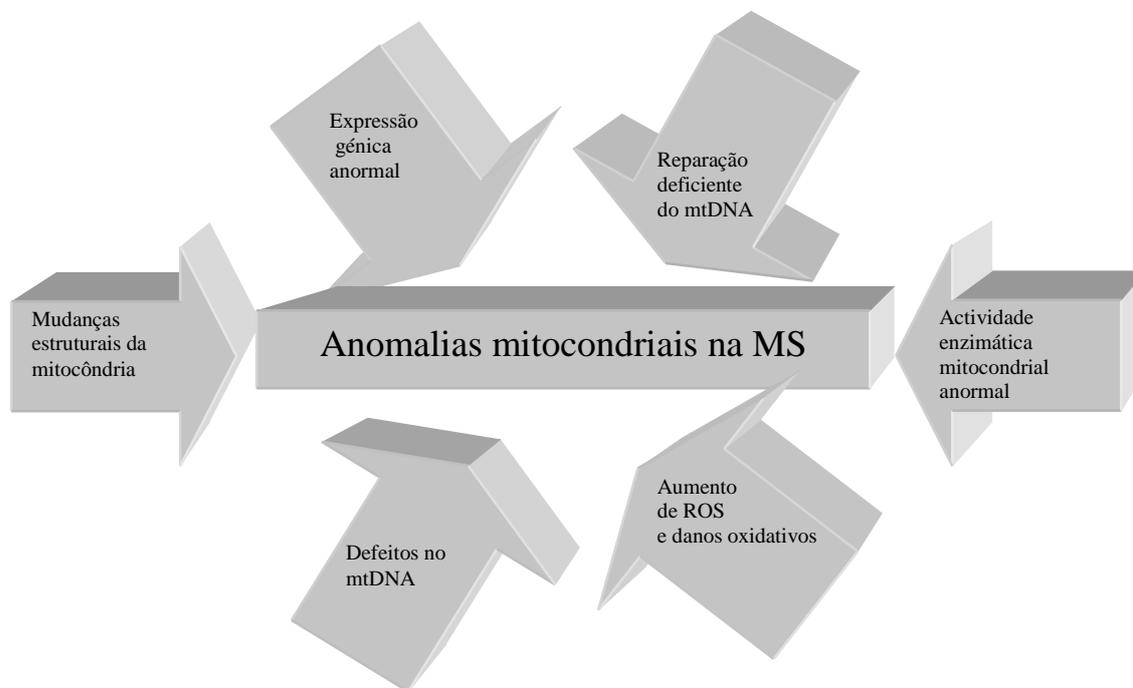


Figura 7- Anomalias mitocondriais em doentes com MS. Modelo proposto por Mao et al, 2009, com base na investigação mais recente [Esquema adaptado de Mao et al, 2009].

Neste modelo proposto por Mao et al, 2009, para além da dinâmica anormal da mitocôndria (aumento da fissão e diminuição da fusão em neurónios afectados pela MS), os autores também propõem que as anomalias mitocondriais e a falha energética mitocondrial possa ter implicações noutras vias celulares, incluindo o aumento da

desmielinização e inflamação em neurónios e tecidos que se encontram afectados na MS.

Desde que a sequência total do mtDNA foi publicada, em 1981, têm surgido cada vez mais descobertas de mutações do mtDNA associadas a doenças (Grazina, 2004, Grazina et al, 2006). O mtDNA constitui a pequena parte extra nuclear do genoma humano. As mutações deletérias, incluindo variações de sequência ou deleções do mtDNA afectam frequentemente o funcionamento do CNS.

Existem diversos estudos na literatura que apontam para o possível envolvimento do mtDNA na MS, principalmente devido ao facto de se ter constatado com mais frequência uma transmissão da doença de mãe para filho do que de pai para filho. Além disso, foi observada uma associação da MS com uma doença mitocondrial Neuropatia Óptica Hereditária de *Leber* (LHON). Estudos moleculares recentes, ao nível do mtDNA, mostraram a presença de variações de sequência primárias de LHON (patogénicas) nos nucleótidos 3460 e 11778, em doentes com MS que apresentavam neurite óptica proeminente (PON). Foi também observada, na MS, uma frequência superior de variações de sequência secundárias de LHON (polimorfismos não-patogénicos *per se*), marcadores de haplogrupos nos nucleótidos 13708G>A, 4216T>C e 4917A>G. Existem outros estudos que demonstraram a ausência de alterações do mtDNA em doentes com MS. Concluiu-se ser necessário fazer um estudo em larga escala de doentes e controlos no sentido de apresentar conclusões mais concretas e definitivas sobre o envolvimento das variações de sequência, polimorfismos e haplotipos do mtDNA na MS (Kalman et al, 1999).

O mtDNA é muito susceptível aos radicais livres devido à ausência de histonas protectoras e à baixa capacidade de reparação. Quando aumentam os danos oxidativos

no mtDNA, ocorrem variações de sequência que podem alterar, de forma severa, as funções mitocondriais, incluindo a OXPHOS, com diminuição da velocidade de transferência de electrões, actividades enzimáticas e, por último, dos níveis energéticos na célula (Andrews et al, 2005; Ghafourifar et al, 2008).

A hipótese de que a mitocôndria deve desempenhar um papel importante na etiopatogenia da MS, foi apoiada pela observação de danos oxidativos no mtDNA, em placas escleróticas crónicas de doentes com esta patologia (Andrews et al, 2005).

Em 2000, Lu et al propuseram que a mitocôndria disfuncional pode conduzir ao processo inflamatório na MS. Estes autores demonstram que a redução na actividade do complexo I, observada nas placas escleróticas crónicas, estava associada à lesão oxidativa do mtDNA (11). O mecanismo subjacente a estes danos poderá envolver uma deficiência energética, provocada pela inibição da MRC por NO[•], em que este entraria em competição pelo local de ligação do O₂ inibindo o complexo IV, ou, quando em maiores quantidades, poderia causar inibição dos complexos I e IV por acção do ONOO⁻ (8). Como o complexo IV está envolvido no bombeamento de protões para o espaço intermembranar, que é essencial para a síntese de ATP, foi proposto (Andrews, 2005) que ocorria uma falha ao nível da Na⁺/K⁺-TPase dependente de energia, o que conduziria a um aumento secundário de Na⁺ intra-axonal e, subsequentemente, a um aumento do Ca²⁺ intra-axonal via trocador Na⁺/Ca²⁺ (figura 8).

Foi proposto que o aumento da concentração intracelular de iões Ca²⁺, resultante da redução na concentração de ATP, pode levar à degenerescência dos axónios por activação de várias enzimas degradativas. Colocou-se, então, a hipótese de que a morte neuronal possa surgir em resultado da exposição dos axónios a NO[•], em particular devido à sobrecarga de iões Na⁺ resultante do impulso nervoso (Smith et al, 2001).

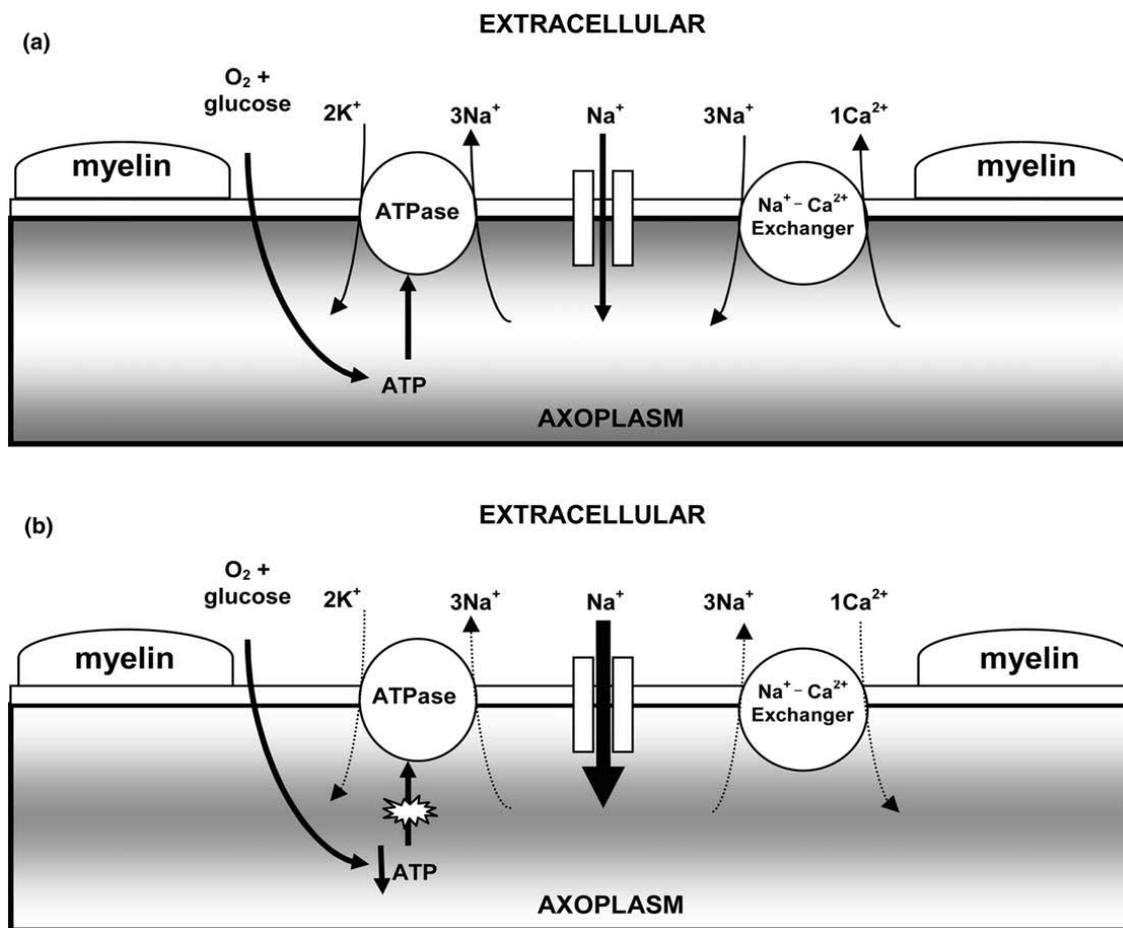


Figura 8- Fluxos iônicos axonais durante a transmissão do impulso nervoso. Sequência hipotética de eventos em situação: (a) normal; (b) de déficit energético, com depleção de ATP [Adaptado de Andrews et al, 2005].

A inibição da MRC por NO' pode ocorrer por duas vias distintas: (i) inibição por NO' , rápida, selectiva, reversível, do complexo IV; (ii) inibição por RNS lenta, não-selectiva, irreversível, de diversos componentes mitocondriais. A via de inibição reversível (i) da COX por NO' ocorre para níveis de concentração na ordem dos

nanomolar, de tal modo que o NO[•], produzido localmente na mitocôndria pela NOS, é um potencial regulador da MRC. Pode ligar-se ao local de ligação do oxigénio de dois modos diferentes, bloqueando a ligação do O₂ em qualquer deles. Este local do complexo IV é constituído por dois metais, o ferro do grupo *heme a₃* e o cobre do centro Cu_B, em que o oxigénio se liga entre eles e é rapidamente reduzido. O NO[•] tanto pode ligar-se ao citocromo *a₃*, originando citocromo *a₃²⁺-NO*, ou ao Cu_B²⁺ surgindo Cu_B⁺-NO, em que o NO pode sofrer hidratação rapidamente para formar nitrito (NO²⁻). Estas reacções de inibição podem ocorrer simultaneamente, pelo menos *in vitro*, mas a primeira é favorecida para níveis elevados de citocromo reduzido e baixos níveis de oxigénio, enquanto a segunda é favorecida para as condições opostas (Brown et al, 2002).

Observou-se que o NO[•] produzido endogenamente pode causar a inibição da MRC em alguns tipos de células, geralmente por competição com o oxigénio; de tal modo, que o NO[•] pode aumentar muito a K_m aparente da respiração por oxigénio. Concluiu-se que o NO[•] pode induzir a entrada das células em hipoxia, mesmo com níveis relativamente elevados de oxigénio, e induzir lesão tecidual. Quando a inflamação é activada e a expressão de iNOS é estimulada em diversos tipos de células, como macrófagos, microglia, astrócitos e células endoteliais, produz-se NO[•] suficiente para inibir, não apenas a sua própria MRC mas também a das células circundantes, via inibição reversível da COX.

Observou-se que, em células de cultura expostas a NO[•], após ter ocorrido inibição reversível da COX, algumas horas após a exposição, surgiu uma inibição irreversível (ii) da MRC, em múltiplos locais, provavelmente devido à conversão do NO[•] em RNS. Um dos efeitos que surgia mais rapidamente era a inactivação do complexo I, possivelmente devido à S-nitrosilação deste complexo, seguindo-se a

inibição da aconitase do TCA e do complexo II da MRC, provavelmente devido à remoção de ferro dos centros de ferro-enxofre, sob condições nas quais pode ocorrer a formação de peroxinitrito. Este pode inibir os complexos I, II/III, IV (Mahad et al, 2008) e V da MRC, a aconitase, a SOD mitocondrial, dependente de manganésio (Mn-SOD), a creatina cinase e provavelmente muitas outras proteínas. O peroxinitrito é um poderoso oxidante que também pode causar danos no DNA, induzir peroxidação lipídica e aumentar a permeabilidade da mitocôndria aos prótons (Brown et al, 2002).

Para além da inibição da respiração, o NO[•] tem outros efeitos na mitocôndria, relevantes no desencadeamento de morte celular: 1) aumento da produção de ROS e RNS; 2) indução do poro de transição mitocondrial (MPT) pelas RNS (Brown et al, 2002), estando o envolvimento de ambos proposto na etiopatogenia da MS.

Os antioxidantes podem retardar ou anular os efeitos do stresse oxidativo e proteger as células e os tecidos contra o efeito deletério das ROS e RNS. Contudo, nos doentes com MS podem desenvolver-se défices ao nível das defesas antioxidantes durante o decurso da doença, em resultado da inflamação crónica, acompanhada pelo aumento do stresse oxidativo. Estes eventos moleculares acompanham a alteração da função mitocondrial, ocorrendo perturbações ao nível da homeostase do cálcio, levando por sua vez à redução dos níveis de ATP (Smith et al, 2006; Ghafourifar et al, 2008), como já foi referido anteriormente. Estas alterações bioquímicas estão associadas à apoptose dos neurónios da retina, cérebro e da medula espinal (Kalman et al, 2007).

O desenvolvimento de estratégias que permitissem reverter o metabolismo anormal e restaurar o funcionamento normal e a sobrevivência dos neurónios constituiriam a abordagem terapêutica ideal na MS, sendo actualmente uma realidade distante.

Capítulo 2

Materiais e métodos

2.1 Materiais

Todos os reagentes usados são do mais elevado grau de pureza comercialmente disponível.

2.2 Amostragem

Os doentes descritos neste estudo foram seguidos na consulta especializada de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Todos eles tinham uma história clínica de MS com mais de 5 anos de duração. Adicionalmente, foram recolhidas amostras de indivíduos saudáveis, sem qualquer doença neurodegenerativa conhecida, voluntários, para servirem de controlo. Todos os indivíduos mencionados neste estudo deram o seu consentimento informado para a realização do estudo.

Na avaliação da actividade enzimática dos complexos da MRC entraram: i) 50 indivíduos controlo com uma média de idades de 31,7 anos (21 – 49) (mínimo – máximo), sendo 18 indivíduos do sexo masculino e 32 do sexo feminino (Grazina, 2004); ii) 50 indivíduos doentes MS com uma média de idades de 40,56 anos (22 – 61) (mínimo – máximo), sendo 15 indivíduos do sexo masculino e 35 do sexo feminino.

Nos estudos genéticos foi usada a seguinte amostragem: i) 216 indivíduos controlo com uma média de idades de 51,7 anos (1 – 90) (mínimo – máximo), sendo 82 indivíduos do sexo masculino e 134 do sexo feminino (Oliveira, 2007); ii) 87 indivíduos doentes, com MS, com uma média de idades de 43,3 anos (22 – 63) (mínimo – máximo), sendo 26 indivíduos do sexo masculino e 61 do sexo feminino.

Usou-se a Escala de *Kurtzke* ampliada, em inglês, *Extended Disability Status Scale* (EDSS), para avaliação da severidade na MS de todos os doentes que foi de, na altura da análise, $3,7 \pm 2,3$ (média \pm desvio padrão), numa gama de (1 – 8) (mínimo – máximo),

sendo a média de duração da doença em anos $11,3 \pm 8,7$ (média \pm desvio padrão) numa gama de (1 – 39) (mínimo – máximo).

2.3 Métodos

2.3.1 Isolamento de linfócitos

Partindo de 10 ml de sangue venoso colhido para tubos com EDTAK₃ a uma concentração de 0,34 M, fez-se uma diluição de 1:1 em solução salina de tampão fosfato PBS (phosphate-buffered saline: NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM, SIGMA), a 10 mM e pH=7,4 a 25°C. A solução diluída foi cuidadosamente colocada sobre um volume de 10 ml de Ficoll (Ficoll-Paque Plus; GE Healthcare Bio-Science AB Uppsala, Sweden), num tubo cónico de 50 ml (tipo Falcon). O tubo foi centrifugado a 800 g durante 20 minutos a 20°C (Centrifuga SIGMA 302 K, com rotor 11133). A camada superior do plasma e o anel de linfócitos foram retirados cuidadosamente e transferidos para um novo tubo de centrifugação, ao qual adicionámos 10 ml de PBS. Fez-se nova centrifugação a 800 g durante 10 minutos a 20° C para obter o sedimento celular. O sobrenadante foi removido e os linfócitos foram ressuspensos em 100 - 200 µl de PBS, consoante o rendimento celular.

2.3.2 Medição da actividade enzimática dos complexos da MRC

Foi utilizada a técnica de espectrofotometria de absorção molecular para medir a actividade enzimática dos complexos da MRC. A espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS) envolve a espectroscopia de fotões (espectrofotometria). Esta técnica utiliza luz na faixa do visível, do ultravioleta (UV) próximo e do infravermelho próximo. Para se obter informação sobre a absorção de uma amostra, ela é inserida no caminho óptico do aparelho, aí a luz UV e/ou visível num certo comprimento de onda (ou uma faixa de comprimentos de ondas) é passada pela amostra. O espectrofotómetro mede a quantidade de que luz foi absorvida pela amostra.

A absorvância (A) é a quantidade de luz absorvida por uma solução. Através dela, chegamos ao valor da concentração (c), através da Lei de Beer- Lambert (equação 6), onde I_0 é a radiação incidente no composto, I_t a radiação transmitida, ϵ é o coeficiente de extinção molar e l é o percurso da radiação que atravessa a amostra (dada pela espessura do tubo de reacção em cm). Para a medir com precisão, é necessário eliminar a dispersão da luz e na ausência de turbidez, A é igual à densidade óptica (DO), assim sendo, convencionámos usar A em vez de DO.

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \epsilon l c \quad (6)$$

A actividade enzimática dos diferentes complexos da MRC é medida através da absorção selectiva de radiação a determinado comprimento de onda (λ), por diversos compostos específicos em solução na *cuvette*.

O espectrofotómetro utilizado (SLM Aminco 2000) permite a monitorização espectral de A em condições de único ou duplo comprimento de onda, em função do tempo. Quando em duplo comprimento de onda, permite monitorizar A por ter a capacidade de fazer passar dois feixes de luz monocromática com 2 comprimentos de onda diferentes, ao mesmo tempo, por uma única cuvete contendo a amostra e o meio de reacção com o cromóforo. A um dos monocromadores (monocromador 2) fica atribuído o comprimento de onda de referência (λ_{ref}) (usualmente o ponto isobéstico no espectro de absorção do cromóforo) e ao outro (monocromador 1) fica atribuído o comprimento de onda da amostra (λ_{amostra}), associado a um pico (ou vale) vizinho do ponto isobéstico no espectro de absorção do cromóforo. O valor da DO ao λ_{ref} permanece constante e a medição da amostra corresponde à diferença de DO entre os dois comprimentos de onda. Este método permite monitorizar a cinética de pequenas alterações de A , as quais normalmente não seriam detectadas, devido à absorção e dispersão elevadas. Já que ambos os feixes atravessam a mesma porção de uma única cuvete, os efeitos de sedimentação e dispersão da amostra são cancelados.

O registo espectral é exibido no monitor, observando-se os eixos de acordo com escalas pré definidas a partir do painel de controlo e traçado, ao mesmo tempo, num registador *Graphtee Pen Plotter MP 4400* ligado ao espectrofotómetro.

Todas as medidas são adquiridas no espectrofotómetro em duplo comprimento de onda, medindo a variação da diferença de absorvância dos 2 comprimentos de onda, ao longo do tempo, a 37°C. O protocolo foi seguido de acordo com Rustin et al (1994), com algumas modificações (Grazina, 2004).

Os linfócitos isolados a partir do sangue periférico foram usados para a avaliação espectrofotométrica das actividades dos complexos II (succinato desidrogenase, SDH, EC1.6.5.1), III (ubiquinol citocromo c reductase, QCR, EC1.10.2.2), IV (citocromo c

oxidase, COX, EC1.9.3.1), II+III (succinato-citocromo c oxireductase, SCCR, EC1.3.99.1), e CS (citrato sintetase, CS, EC 4.1.3.7). A citrato sintetase é usada como enzima marcadora mitocondrial (Grazina, 2004).

Os meios usados foram: **Tampão 1** - KH_2PO_4 10 mM, BSA 1 mg/ml, pH=6,5 e **Tampão 2** – EDTA, KH_2PO_4 10 mM, BSA 1 mg/ml, pH=7,8.

Todos os reagentes usados são SIGMA, excepto ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) e Cianeto de potássio (KCN), que são MERCK.

2.3.3 Complexo II

A SDH é medida a 600 nm pela redução do 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) 80 mM, iniciada pelo succinato 5 μM , em tampão 2. Inibe-se com a reacção com malonato 5 mM.

2.3.4 Complexo II+III e complexo III

A SCCR é medida a 550 nm seguindo a redução do citocromo c 60 mM pelo complexo III acoplado à oxidação do succinato 5 mM, em tampão 2. A actividade do complexo III é avaliada na presença de decilubiquinol (DUQH_2) 80 mM.

2.3.5 Complexo IV

A citocromo c oxidase é medida à velocidade máxima, seguindo a oxidação do citocromo c reduzido 10 mM em tampão 1, a 550 nm, usando o dodecilmaltoside 1,25 mM como detergente permeabilizante da membrana externa mitocondrial com o objectivo de facilitar a entrada do citocromo c reduzido, sem comprometer a integridade membranar.

2.3.6 Citrato sintetase

A citrato sintetase é responsável pela reacção de condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato, que ocorre ao nível da matriz mitocondrial e é a primeira reacção do ciclo de Krebs. Este ensaio segue a reacção do ácido 5'-ditiobis 2-nitrobenzoico 0,4 µM (DTNB), com a coenzima A, a qual é formada a partir da reacção da acetil-CoA 0,2 mM e oxaloacetato 8 mM catalizada pela citrato sintetase e medida a 412 nm em tampão 2, usando Triton X-100 a 20% como detergente que permite a permeabilização das membranas mitocondriais.

2.3.7 Concentração de Proteína

O teor proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Este método baseia-se na alteração de cor de um corante (*Brilliant Blue G*) em resposta às várias concentrações proteicas. Efectuou-se uma curva padrão

com albumina plasmática bovina (BSA) a 0.4%. Depois de obter a curva padrão procede-se à determinação da quantidade de proteína da amostra, diluída com Triton X-100 a 2% e H₂O mili-Q, na proporção de 1:6. A medição foi feita a 595 nm.

Os resultados espectrofotométricos são convertidos em nmol de substrato oxidado/minuto/mg de proteína.

2.4 Critério de deficiência para a MRC

A actividade enzimática é considerada deficiente quando tem valores abaixo de 40% de actividade, considerando o valor médio normalizado para a CS (Grazina, 2004).

2.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, mínimo e máximo do grupo indicado. Os dados seguem uma distribuição gaussiana, ou seja, passam o teste da normalidade quando $p \geq 0,05$. A significância estatística, para os resultados bioquímicos, é determinada usando o teste t de *Student* não emparelhado, sempre que o teste de normalidade apresente $p \geq 0,05$. No caso dos resultados não passarem este teste, será aplicado o teste de *Mann-Whitney*.

Os testes de qui-2 e exacto de *Fisher* para as probabilidades são realizados para esclarecer se há diferenças estatisticamente significativas nas frequências genéticas

observadas entre doentes MS e o grupo controlo, tanto para haplogrupos como para alterações do mtDNA.

Uma diferença é considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com os controlos.

Todos os testes são aplicados num intervalo de confiança de 95%.

Os programas estatísticos usados são *GraphPad Prism* versão 3.0 para Windows (*GraphPad Software, San Diego; CA, USA*) e SPSS versão 16.0.

Capítulo 3

Resultados e discussão

3.1 Análise Bioquímica da MRC

3.1.1 Resultados

Analisámos a actividade enzimática dos complexos da MRC em linfócitos de 50 doentes com MS.

Na tabela I estão sumariadas as características desse grupo.

Tabela I – Caracterização dos doentes com MS.

Número de indivíduos	50
Sexo F/M	35F/15M
Idade média (anos) \pm SD (mín-máx)	40,6 \pm 10,9 (22-61)
EDSS média (anos) \pm SD (mín-máx)	4,5 \pm 2,3 (1-8)
Idade de início média (anos) \pm SD (mín-máx)	29,8 \pm 10,5 (15-52)
Duração média da doença (anos) \pm SD (mín-máx)	13,4 \pm 8,4 (2-34)

Legenda – F: feminino; M: masculino; EDSS: Escala de Kurtzke ampliada; (Média \pm (SD: Desvio padrão); (mín-máx): (mínimo – máximo).

Na tabela II apresentam-se os resultados para a actividade específica (valor médio \pm desvio padrão (SD)) dos complexos II, III, IV e do segmento II + III da MRC, expressos em nmol/min/mg prot.

Todos os valores passaram no teste da normalidade, excepto para o CIV no grupo MS ($p^* = 0,0447$).

Na tabela III apresentamos os quocientes (valor médio \pm desvio padrão) entre a actividade específica para cada complexo e a actividade da CS. Ao normalizar os valores para a citrato sintetase corrigem-se, não apenas as diferenças na densidade celular e composição das amostras, mas também uma potencial diferença no número de mitocôndrias.

Tabela II – Actividade enzimática específica para os complexos II, III, IV e segmento CII+III da MRC de controlos e doentes.

Actividade enzimática (nmol/min/mg prot) (média ± SD) (mín-máx)					
	C II	C III	C IV	C II+III	CS
Controlos (n=50)	30,43 ± 13,79 (12,0-77,32)	78,10 ± 43,48 (18,60-177,0)	133,5 ± 40,67 (6,10-249,0)	26,58 ± 12,88 (1,79-56,27)	76,79 ± 23,56 (40,45-176,3)
Doentes MS (n=50)	22,51 ± 12,61 (8,42-66,46)	105,1 ± 63,39 (17,16-340,1)	75,98 ± 50,55 (10,01-212,3) *	39,49 ± 22,87 (8,6-109)	100,6 ± 58,45 (44,43-406,0)

Legenda – Média ± Desvio padrão: (SD); (mín-máx): (mínimo – máximo).

Tabela III – Actividade enzimática dos complexos II, III e IV segmento CII+III da MRC, corrigido para a CS.

Actividade enzimática da MRC corrigida para a CS média ± SD (mín-máx)				
	C IV/CS	C II/CS	C III/CS	C II+III/CS
Controlo (n=50)	1,69 ± 1,01 (0,53-5,27)	0,35 ± 0,22 (0-1,32)	0,93 ± 0,77 (0-3,6)	0,55 ± 0,37 (0,14-1,84)
Doentes MS (n=50)	0,75 ± 0,34 (0,18-1,59)	0,23 ± 0,07 (0,07-0,52)	1,17 ± 0,80 (0,20-4,49)	0,40 ± 0,14 (0,11-0,86)

Legenda – Média ± Desvio padrão: (SD); (mín-máx): (mínimo–máximo).

Todos os valores passaram no teste da normalidade.

A análise de comparação das médias das actividades dos vários complexos para os dois grupos de estudo, doentes e controlos, pelo teste t de *Student* ou pelo teste de *Mann-Whitney* (quando os resultados não passaram o teste de normalidade), mostrou que existia uma diferença significativa na actividade dos complexos II ($p^*=0,0114$), IV ($p^{**}=0,0050$), II+III ($p^{***}=0,0008$) e da CS ($p^{**}=0,0088$), em valor absoluto, no grupo dos doentes. Após correcção para a CS, apenas a actividade do complexo IV

apresentou redução significativa nos doentes ($p^*=0,0189$). No entanto, foi necessário verificar para cada doente se tinha ou não défice da MRC.

Os resultados da Tabela IV e figura 9 são relativos ao grupo MS, para averiguar os défices ao nível dos complexos da MCR, para cada doente.

Tabela IV – Resultados da avaliação dos défices específicos na actividade dos complexos da MRC, nos doentes com MS.

	MS (%)
N	52
Def. Isolado IV	40
Def. Isolado III	2
Def. Isolado II	0
Def Isolado II+III	2
Def Combinado (IV+II+(II+III))	0
Def Combinado (IV+II)	0
Def. Combinado (IV+(II+III))	4

Legenda – N: percentagem de indivíduos MS com apresentação Normal; Def: défice; Def. Isolado: percentagem de indivíduos com défice isolado de um complexo específico; Def. Combinado: percentagem de indivíduos com défice combinado de dois ou mais complexos.

■ Normal ■ 1 complexo def. ■ Mais de 1 complexo def.

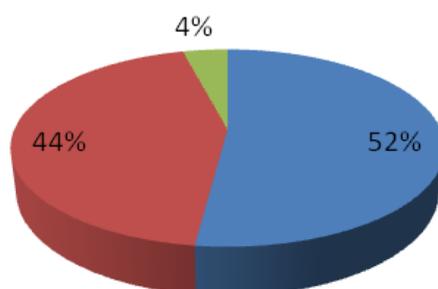


Figura 9 – Representação gráfica dos resultados da avaliação de défices da MRC nos doentes com MS. Def.: défice.

Considerando que existe défice num complexo se a sua actividade for inferior a 40% da média da actividade de referência normalizada para a CS, verificámos que 44% dos doentes apresentavam deficiência em apenas um complexo e 4% dos doentes apresentam mais do que um complexo com deficiência.

Dos dados apresentados na tabela IV, podemos concluir que os défices mais frequentes são do complexo IV da MRC em 44% dos doentes avaliados, seguida pela deficiência do segmento II+III em 6% dos indivíduos, quer na forma isolada, quer na forma combinada. Não foram encontrados défices isolados do complexo II, o que está de acordo com o facto de o CII ser codificado no genoma nuclear. Os défices isolados do complexo III estão presentes em 2% dos doentes. Os défices combinados dos complexos IV e II+III encontram-se presentes em 4% dos doentes MS.

3.1.2 Discussão

Segundo a literatura, a formação do NO[•] pode contribuir para a diminuição de energia e para a morte celular neuronal (Heales et al, 1999). A análise do CSF de doentes com MS indica a presença de actividade da NOS (Calabrese et al, 2002; Rejdak et al, 2008; Sayre et al, 2008).

Nos dados por nós analisados verificámos que o défice mais frequente na MRC é ao nível do complexo IV (Tabela IV e figura 9), o que está de acordo com trabalhos anteriores (Duncan et al, 2005; Beltrán et al, 2000; Shiva et al, 2001; Brown et al, 2002). Segundo estes autores, o complexo IV é o local de acção do NO[•] na mitocôndria mais bem caracterizado. O NO[•] compete com o O₂ para se ligar ao centro de Cu²⁺ da COX. Esta ligação reversível e competitiva aumenta o K_m aparente do complexo IV

para o O₂. Consequentemente, mesmo níveis fisiológicos relativamente baixos de NO[•] resultam na inibição da enzima citocromo c oxidase.

Verificámos também que 2% dos doentes com MS apresentam o complexo III deficiente (Tabela IV). O trabalho de Dutta et al (2006) refere uma diminuição de 40% na actividade do complexo III em fracções enriquecidas em mitocôndrias isoladas de córtex de doentes MS *pós-mortem*, quando comparadas com um grupo controlo. Eles verificaram que nestes doentes, a MCR ficava com uma capacidade diminuída para trocar electrões ao nível dos complexos I e III. Brown et al (2005) referem a inibição do CIII pelo peroxinitrito. A formação deste composto começa quando o O₂ não é totalmente reduzido a H₂O pelos complexos I e III, e, em vez disso, é reduzido a O₂⁻. O NO e o O₂⁻ combinam-se para formar ONOO⁻. A disfunção do complexo I e III conduz tanto à deficiência bioenergética como ao aumento crónico na produção de ROS e RNS (Beretta et al, 2004).

No que diz respeito ao nosso grupo de estudo, apenas 2% dos doentes MS apresentam défice ao nível do segmento II+III (Tabela IV), enquanto os complexos II e III não parecem mais afectados. O ensaio do segmento II+III requer quinona endógena, Poderoso, 1996 sugeriu no seu trabalho que o NO[•] e possivelmente, o ONOO⁻ reagem directamente com o ubiquinol e Heales et al (1999), concluiu que esta descoberta podia sugerir uma explicação para a perda irreversível da actividade do segmento II+III, que ocorre logo a seguir à exposição do ONOO⁻ e sugere que a perda oxidativa da ubiquinona possa ocorrer, sob certas condições, *in vivo*.

Os défices combinados dos complexos IV, III e II estão presentes em 4% dos doentes com MS, conforme os dados da Tabela V. A diminuição da actividade enzimática dos complexos da MRC poderão ser uma consequência tanto da inibição

enzimática causada pelas ROS ou pelas RNS, como pela diminuição da expressão proteica, devido a alterações genéticas.

3.2 Estudos genéticos

3.2.1 Resultados

Comparámos os resultados obtidos da análise do mtDNA de linfócitos em 216 controlos e 87 doentes. Os dados demográficos e as características das doenças encontram-se sumarizadas na tabela V.

Tabela V – Caracterização dos doentes com MS.

Número de indivíduos	87
Sexo F/M	61 F/26 M
Idade (anos) \pm SD (mín-máx)	43,3 \pm 10,8 (22-63)
EDSS (anos) \pm SD (mín-máx)	3,7 \pm 2,3 (1-8)
Idade de início (anos) \pm SD (mín-máx)	31,9 \pm 10,7 (15-57)
Duração da doença (anos) \pm SD (mín-máx)	11,3 \pm 8,7 (1-39)

Legenda – F: feminino; M: masculino; EDSS: Escala de Kurtzke ampliada; (Média \pm (SD: Desvio padrão); (mín-máx): (mínimo – máximo).

3.2.1.1 Haplogrupos mitocondriais

A caracterização dos haplogrupos mitocondriais foi feita por PCR-RFLP, de acordo com o protocolo previamente descrito (Oliveira, 2007). Foram usados *primers* específicos para amplificar, por PCR, os fragmentos que contêm as características polimórficas da cada haplogrupo (H, JT, I, X), sendo os grupos menos frequentes na população europeia (V, U, HV, O, L, K, PV e T) classificados como “outros”. O número de indivíduos em cada haplogrupo foi determinado pela presença ou ausência do respectivo polimorfismo no mtDNA.

Os resultados do nosso laboratório, no que diz respeito à distribuição dos haplogrupos mitocondriais, para controlos e doentes MS, encontram-se na tabela VI.

Tabela VI – Frequência dos haplogrupos mitocondriais para controlos e doentes MS e análise estatística (teste exacto de Fisher).

Haplogrupo	Controlos (n=216) frequência (percentagem)	Doentes MS n=(87) frequência (percentagem)	p	OR
H	85/216 (39,4%)	27/87 (32,1%)	0,1536	1,4770
JT	37/216 (17,2%)	20/87 (22,9%)	0,2570	0,6925
I	8/216 (3,7%)	3/87 (3,4%)	1,0000	1,0770
X	6/216 (2,8%)	6/87 (6,9%)	0,1099	0,3857
Outro	80/216 (37%)	31/87 (34,7%)	1,0000	1,0310

Legenda – OR: *odds ratio*.

A frequência global dos haplogrupos nos dois grupos de estudo não é significativamente diferente, apesar das diferenças de distribuição dos haplogrupos entre os controlos e os doentes (figura 10).

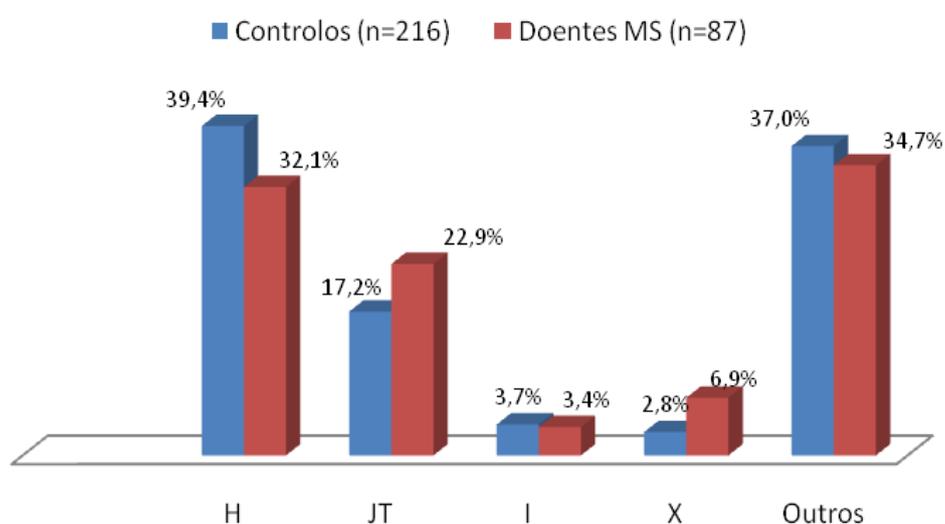


Figura 10 – Distribuição dos haplogrupos mitocondriais entre doentes MS controlos normais.

As principais diferenças entre os dois grupos estão no haplogrupo H, onde a distribuição é de 39,4% nos controlos vs. 32,1% nos doentes ($p=0,1536$), no haplogrupo JT onde a distribuição é de 17,2% nos controlos vs. 22,9% nos doentes ($p=0,2570$) e no haplogrupo X onde a distribuição é 2,8% nos controlos vs 6,9 % nos doentes ($p=0,1099$).

3.2.1.2 Variações de sequência do mtDNA

No nosso laboratório foi analisado o DNA de 50 indivíduos no grupo controlo e de 87 indivíduos no grupo de doentes MS para as variações de sequência do mtDNA nas posições dos nucleótidos 3460, 4216, 4917, 11778, 13708, 14459, 14484 e 15257, conforme descrito anteriormente (Grazina, 2007), com o objectivo de verificar as distribuições para as variações primárias e secundárias de LHON. As mutações patogénicas 3460, 11778, 14459 e 14484 não foram detectadas em nenhuma amostra.

Tabela VII – Frequência de ocorrência das variações de sequência do mtDNA para controlos e doentes MS e análise estatística pelo teste de Fisher.

Varição de sequência do mtDNA	Controlos (n=50) frequência (percentagem)	Doentes MS n=(87) frequência (percentagem)	p	OR
ausente	43/50 (86%)	38/87 (43,8%)	***0,0001	7,921
13708 G>A	0/50 (0%)	5/87 (5,7%)	0,1582	0,1485
4216 T>C	1/50 (2%)	0/87 (0%)	0,3650	5,303
4216 T>C, 13708 G>A	1/50 (2%)	10/87 (11,5%)	0,0558	0,1571
4216 T>C, 13708 G>A, 15257 G>A	0/50 (0%)	4 /87(4,6%)	0,2963	0,1837
4216 T>C, 4917A>G	1/50 (2%)	10/87 (11,5%)	0,0558	0,1571
4917A>G	1/50 (2%)	0/87 (0%)	0,3650	5,303
O	2/50 (2%)	0/87 (0%)	0,1315	9,021

Legenda – N: indivíduos sem variações de sequência secundárias de LHON; O: outras alterações; OR: *odds ratio*.

Pela análise dos dados com o teste de χ^2 , observamos que existe significância estatística ($\chi^2 = 25,87$ com $p^{***} = 0,0005$) para a distribuição das frequências entre os dois grupos.

A variação do nucleótido 13708G>A foi observada em 5,7% dos doentes, estando ausente nos controlos. A combinação das variações dos nucleótidos 4216T>C, 13708G>A está presente em 6,9% dos doentes e em 2% dos controlos. O número de indivíduos com as variações do mtDNA pesquisadas ausentes é significativamente superior no grupo controlo ($p=0,033$; tabela VII): 88% vs. 71,3%.

3.2.2 Discussão

No nosso estudo não encontramos qualquer associação entre a presença de um haplogrupo em particular e a ocorrência de MS. Isto está de acordo com estudos anteriores (Mihailova et al, 2006) apesar de outras investigações mostrarem que há associação entre os haplogrupos J e X ou JT e o desenvolvimento de MS, respectivamente (Otaegui et al, 2004; Houshmand M et al, 2005). Contudo em estudos comparativos deve ser dada atenção à selecção dos controlos e importância ao passado genético da população, para poder obter conclusões válidas.

3.2.3 Correlação Bioquímica – Genética

Fomos analisar, pelo teste de χ^2 , se existiria associação tanto entre os haplogrupos H e JT como entre os indivíduos com ou sem variações de sequência ao

nível do mtDNA e os défices ao nível da MRC identificados no grupo de doentes MS. Da análise resultou que $\chi^2 = 4,857$ e $p=0,0881$, não sendo a diferença estatisticamente significativa, sugerindo que não existe associação entre as variáveis dos estudos bioquímicos e genéticos dos haplogrupos mitocondriais, na amostragem analisada de 50 doentes, em cujas amostras se analisou a MRC.

Tabela VIII – Distribuição dos haplogrupos H e JT em doentes com MRC com défice ou normal e análise estatística (teste exacto de Fisher).

Haplogrupo	MRC com défice	MRC Normal	Teste exacto de Fisher
H	4/50 (8%)	10/50 (20%)	$p = 0,478$
JT	8/50 (16%)	3/50 (6%)	$p = 0,1997$
Outros	38/50 (76%)	37/59 (74%)	$p = 1,0000$

Por outro lado, quando testámos a associação entre os haplogrupos H, JT e outros para os doentes com MRC deficiente ou normal, com o teste exacto de Fisher, verificámos que não existem diferenças estatisticamente significativas.

Fomos então verificar se existia associação entre défice da MRC e a presença de variações de sequência do mtDNA. Apresentamos os resultados estatísticos na tabela IX.

Tabela IX – Distribuição de doentes com ou sem alterações ao nível do mtDNA no grupo de doentes com MRC deficiente e normal.

mtDNA	MRC Normal	MRC com Défice	Teste exacto de Fisher
Sem alterações	24/26 (92,3%)	14/24 (58,3%)	p** = 0,0074
Com alterações	2/26 (7,7%)	10/24 (41,7%)	OR = 8,571 RR = 3,789

Legenda: **p<0,01

Pelo teste do χ^2 obtivemos os seguintes resultados: $\chi^2 = 7,898$ e $p^{**}=0,0050$. Sendo o resultado estatisticamente significativo, podemos concluir que existe associação entre estas duas variáveis, o que é reforçado também pelo teste de Fisher (tabela IX).

3.2.4 Discussão

Tem sido sugerido que o genoma mitocondrial está envolvido no desenvolvimento da MS por várias razões. Primeiro, porque as variações do mtDNA desempenham um papel importante nas doenças neurodegenerativas, especialmente porque se sabe que as mutações deletérias do mtDNA causam o aparecimento de disfunções neurodegenerativas nas idades mais jovens e os polimorfismos comuns do mtDNA estão associados ao aparecimento tardio das disfunções neurodegenerativas. Em segundo lugar, porque a LHON, uma doença causada por variações de sequência no mtDNA, inclui sintomas de desmielinização inflamatória similar à MS. Estas observações sugerem que o mtDNA desempenha um papel importante na patogenia da

MS (Xinhua et al, 2008), sendo estas ideias reforçadas pelos resultados obtidos no presente trabalho.

Capítulo 4

Conclusões

Os resultados obtidos com o presente trabalho reforçam a hipótese da disfunção mitocondrial como resultado de lesão oxidativa. Num futuro próximo, esperamos poder dar novas contribuições para elucidar este aspecto com mais pormenor.

Dado o papel central da mitocôndria em tantas funções celulares importantes, incluindo a produção de energia, é razoável que a sua disfunção seja um contributo chave no processo neurodegenerativo desta doença. Consequentemente os tratamentos dirigidos à mitocôndria e os tratamentos neuroprotectores, ou a combinação de neuroprotectores e imunomoduladores poderiam representar uma abordagem mais racional à terapia da MS.