



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INFLUÊNCIA DO USO DE ESTATINAS SOBRE A ESTABILIDADE DE
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS EM PORTADORES DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

Estudante: **Mariana Vaini de Freitas**

UBERLÂNDIA, MG
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INFLUÊNCIA DO USO DE ESTATINAS SOBRE A ESTABILIDADE DE
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS EM PORTADORES DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

Estudante: Mariana Vaini de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Nilson Penha-Silva

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Sheila Bernardino Fenelon

UBERLÂNDIA, MG
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DO USO DE ESTATINAS SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS EM PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

Estudante: **Mariana Vaini de Freitas**

Orientador: **Prof. Dr. Nilson Penha-Silva**

Co-orientadora: **Prof^a Dr^a Sheila Bernardino Fenelon**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F475e Freitas, Mariana Vaini de, 1984-

Influência do uso de estatinas sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de esclerose múltipla / Mariana Vaini de Freitas. - 2009.

56 f.: il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

Co-orientadora: Sheila Bernardino Fenelon.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla - Teses. 2. Membranas de eritrócitos - Teses. 3. Estatinas (Agentes cardiovasculares) - Teses. I. Penha- Silva, Nilson. II. Fenelon, Sheila Bernardino. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU:616-004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DO USO DE ESTATINAS SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS EM PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

Estudante: Mariana Vaini de Freitas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente:	Prof. Dr. Nilson Penha-Silva	[INGEB-UFU]
Examinador:	Prof^a Dr^a Ana Graci Brito Madurro	[INGEB-UFU]
Examinador:	Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori	[FM-USP]

Data: 30/07/2009

As sugestões da Comissão Organizadora e as normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.

Professor Dr. Nilson Penha-Silva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

**A minha mãe, Madalena,
meu pai, Valdir,
e meu namorado, Daniel.
Tenho o amor, a dedicação
e a grande alegria de vocês
dentro de mim.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos bons resultados que colhi durante meu mestrado e vida pessoal, principalmente por ter colocado em meu caminho colegas e amigos que me ajudaram a crescer como bióloga e ser humano.

A meus pais, Valdir e Madalena, e ao meu irmão, Rodrigo, todos os agradecimentos ainda serão poucos diante da perseverança e carinho deles em construir uma família estruturada e muito feliz. Minha vida não teria sentido sem o apoio dessas pessoas tão essenciais.

Agradeço ao meu namorado, Daniel, pelo constante incentivo a meu trabalho e, acima de tudo, pela compreensão e paciência comigo. Nosso amor é algo que nunca imaginei encontrar na vida. Obrigada pelo olhar de perseverança em todos os momentos!

Agradeço aos membros da minha família, especialmente minha avó Ignês e minhas tias Cida e Vânia, por se interessarem pelo meu bem estar e pela minha vida profissional.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Nilson Penha Silva, que tem sido realmente um professor desde a minha graduação. Esse tempo que fiquei no seu laboratório me deixou algo muito valioso: a vontade de sempre aprender e lutar pelo melhor. Obrigada, professor, pelos ensinamentos.

À professora Dra. Sheila Bernardino Fenelon, por participar da realização desta dissertação. Seu apoio profissional foi essencial durante meu mestrado. Obrigada por todos os conselhos.

Às voluntárias que se dispuseram em doar um pouco de sangue para a construção dessa pesquisa. Sem a solidariedade de vocês nada poderia ser feito.

Agradeço as minhas grandes amigas, Alice, Ana Paula, Flávia, Juliana, Rita e Tatiana pelo companheirismo, alegrias e sabedoria em todos os momentos. Nossas vidas estão entrelaçadas numa história muito bonita desde a graduação.

Agradeço as minhas companheiras de laboratório, Júnia, Lúbia, Letícia, Liandra e novamente a Rita. O ambiente de trabalho se tornou muito agradável com as histórias e alegrias de vocês. Desejo muito sucesso a todas!

Agradeço à Marcela Ramos de Oliveira e ao Diogo Fernandes Cunha por iniciarem o trabalho com a esclerose múltipla.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica, pela estrutura e ambiente de trabalho propício para o desenvolvimento desta dissertação. E também aos funcionários do Hospital das Clínicas pela coleta do sangue dos voluntários.

Aos funcionários da biblioteca, COMUT, pela atenção diante das minhas solicitações de artigos científicos e eficiência no trabalho que desenvolvem.

Agradeço, finalmente, a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte deste trabalho: professores, técnicos e colegas. Obrigada a todos!

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	vii
Apresentação	01
Capítulo I (Fundamentação teórica)	03
O SNC	04
A esclerose múltipla	04
Características	04
Origem	05
Tratamento	07
As membranas celulares	09
A estabilidade de membrana de eritrócitos	11
As membranas de eritrócitos na esclerose múltipla	13
Considerações finais	15
Referências	18
Capítulo II (Trabalho experimental)	26
Resumo	27
Abstract	29
Introdução	31
Material e métodos	34
Resultados	37
Discussão	44
Conclusões	49
Referências	50

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

	Página
Tabela 1.1 Revisão bibliográfica sobre as propriedades encontradas para as estatinas no organismo humano	16
Tabela 2.1 Comparação de escores para escala de incapacidade (EDSS) e algumas variáveis hematológicas e bioquímicas entre portadores de EM em e sem tratamento com sinvastatina	39
Tabela 2.2 Comparação dos valores de H₅₀ e D₅₀ entre o grupo controle e os grupos de portadores de EM em e sem tratamento com sinvastatina	42
Figura 1.1 Dependência da estabilidade e da funcionalidade de uma membrana celular com sua fluidez	17
Figura 2.1 Ajuste simultâneo das curvas de fragilidade osmótica dos eritrócitos de voluntárias do grupo controle e dos grupos de portadoras de esclerose múltipla em uso e sem uso de sinvastatina	40
Figura 2.2 Ajuste simultâneo das curvas de estabilidade de eritrócitos contra a ação de etanol das voluntárias do grupo controle e dos grupos de portadoras de esclerose múltipla sem e com tratamento com sinvastatina	41
Figura 2.3 Mecanismos comuns que afetariam a homeostase estrutural de membranas em células neurais e eritrócitos em portadores de esclerose múltipla	43

ABREVIATURAS

A₅₄₀	Densidade óptica em 540 nm
CNS	Central nervous system (sistema nervoso central)
COx-2	Ciclooxigenase 2
D₅₀	Concentração de etanol que causa 50% de hemólise
D_{50R}	Concentração de etanol que causa 50% de lise do estado R dos eritrócitos
D_{50T}	Concentração de etanol que causa 50% de lise do estado T dos eritrócitos
dD	Amplitude da variação da concentração de etanol na transição de lise dos eritrócitos
dS	Amplitude da concentração do sal responsável pela transição da lise dos eritrócitos
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EDSS	Expanded Disability Status Scale (Escala Expandida do Estado de Incapacidade)
EM	Esclerose múltipla
Estado R	Estado expandido ou relaxado do eritrócito
Estado T	Estado compactado ou tenso do eritrócito
FA	Ácidos graxos
FOE	Fragilidade osmótica de eritrócitos
H₅₀	Concentração de NaCl que produz 50% de hemólise
HDL-C	Colesterol de lipoproteína de alta densidade
IDL-C	Colesterol de lipoproteína de densidade intermediária
INF-β	Interferon-β
LDL-C	Colesterol de lipoproteína de baixa densidade
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
NOS^{ase}	Enzima óxido nítrico sintetase
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
RBC	Red blood cell (eritrócito)
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas do oxigênio)
SFA	Ácidos graxos saturados
SNC	Sistema Nervoso Central
VLDL-C	Colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade
ω3-PUFA	Ácidos graxos polinsaturados da família ω3
ω6-PUFA	Ácidos graxos polinsaturados da família ω6

APRESENTAÇÃO

As membranas celulares proporcionam a definição do meio intra e extracelular e possibilitam que as reações bioquímicas se desencadeiem em cada meio, permitindo trocas seletivas de acordo com as necessidades do organismo. É através de características próprias das membranas, como fluidez e estabilidade, que a célula suporta estresses externos e garante sua integridade e funcionalidade.

Um modelo conveniente de estudo da estabilidade de membranas é o eritrócito, em função da menor invasividade em seu processo de obtenção e da simplicidade de monitoração, baseada na liberação de hemoglobina, que pode ser quantificada facilmente por espectrofotometria.

O Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica padronizou métodos de estudo de efeito de solutos, como sorbitol, glicerol, etanol e sais, na estabilidade de membrana de eritrócitos e tem estudado este comportamento em diversas condições, tais como envelhecimento e doenças degenerativas. Esses métodos compreendem o choque hipotônico e o estresse pelo etanol, que têm sido usados para elucidar o comportamento físico-químico de membranas frente a solutos estabilizantes e desestabilizantes. A dinâmica da lise pela hipotonicidade ou pela ação caotrópica do etanol é caracterizada por uma transição entre dois estados, o estado íntegro e o estado lisado dos eritrócitos. A linha de transição espectrofotométrica é então analisada por regressão sigmoide, com a determinação do ponto de meia-transição, que representa a concentração de NaCl (H_{50}) ou de etanol (D_{50}) onde 50% dos eritrócitos estão lisados. O rigor matemático e estatístico deste formalismo garante grande fidelidade aos pontos de meia-transição de lise.

Neste trabalho, os parâmetros H_{50} e D_{50} são usados para avaliar se a esclerose múltipla está associada a alterações na estabilidade de membranas de eritrócitos. Devido à dificuldade no acesso às células neurais que são diretamente responsáveis pelas características da doença, os eritrócitos apresentam uma alternativa válida de avaliação do comportamento de membranas em portadores de esclerose múltipla. Os eritrócitos são células pós-mitóticas como as células

neurais e apesar de sua curta meia-vida eles têm composições e comportamentos de membranas que devem sofrer como outras células do organismo o impacto de condições homeostáticas estacionárias, determinadas pela alimentação e pelo estilo de vida, que supostamente teriam importância na determinação e/ou desenvolvimento da esclerose múltipla. Por exemplo, alterações nas condições de oferta na alimentação de $\omega 6$ em relação a $\omega 3$ -PUFA, que estão associadas a exacerbação da imunidade e da inflamação (condições determinantes da esclerose múltipla), também devem estar associadas a alterações na composição e comportamento de membranas, não somente das células neurais como também dos eritrócitos.

Isto quer dizer que há sim racionalidade em estudar o comportamento de eritrócitos na esclerose múltipla, como feito neste trabalho.

A vinculação da inflamação com a patogênese da esclerose múltipla suscitou na literatura a iniciativa de investigar o uso de estatinas no tratamento da doença, dadas as propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras descritas para aquelas drogas em adição aos seus reconhecidos efeitos no abaixamento da colesterolemia. Por uma razão ou por outra, as estatinas devem também interferir na composição e comportamento de membranas.

É por isso que este trabalho também descreve o impacto do uso de estatinas sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de esclerose múltipla.

Tudo isso foi possível por causa da professora Dra. Sheila Bernardino Fenelon, neurologista que fundou e coordena o Centro Triangulino de Esclerose Múltipla (CETEM) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e é claro da boa vontade das voluntárias que integraram a população de estudo.

Conforme as normas definidas pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU, o capítulo I desta dissertação traz a fundamentação teórica do assunto e o capítulo II traz a íntegra do trabalho experimental realizado.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O SNC

O sistema nervoso central (SNC), que inclui o cérebro e a medula espinhal, é constituído por neurônios e células gliais. Estas últimas somam 90% das células dos SNC e se apresentam em quatro tipos: astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais. Os oligodendrócitos são as células responsáveis pela produção e manutenção da bainha de mielina que envolve os axônios no SNC. Quando ocorre uma lesão nas células neurais, fagócitos residentes (microglia) rapidamente retiram detritos celulares e de mielina do meio (desmielinização). Pode ocorrer remielinização se não houver constante exposição ao agente lesivo [MILLER, et al., 2005; GONSETTE, 2008].

O SNC tem a segunda maior concentração de lipídios do organismo depois do tecido adiposo [HORROCKS; FAROOQUI, 2004]. Na membrana de mielina, o alto conteúdo de ácidos graxos insaturados certamente está relacionado com a estrutura e função dessa membrana especializada [HUETHER et al., 1986].

A ESCLEROSE MÚLTIPLA

Características

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central com origem ainda não completamente conhecida. A nomenclatura esclerose múltipla provém das múltiplas áreas cicatrizadas visíveis ao exame macroscópico do cérebro. Essas lesões são denominadas placas e se apresentam principalmente na substância branca cerebral. A heterogeneidade clínica e a etiologia complexa da EM têm sido fatores limitantes para seu estudo [KENEALY et al., 2003].

O pesquisador Kurtzke [1983] desenvolveu uma escala que mede o comprometimento neurológico e incapacidade na EM, denominada Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) ('Expanded Disability Status Scale'), a qual se baseia em escores de oito sistemas funcionais do indivíduo: piramidal, cerebelar, do tronco encefálico, sensorial, intestinal, vesical, visual e mental. Essa escala classifica as condições do indivíduo de 0 a 10 e é

amplamente utilizada em todo o mundo para caracterizar o estado de saúde do paciente.

Quatro categorias reúnem as várias formas de evolução clínica da doença. A primeira, denominada **EM recidivante-remitente**, é caracterizada por episódios recorrentes e imprevisíveis de disfunção neurológica, e o paciente não exhibe progressão do comprometimento neurológico entre os surtos. A segunda, **EM progressiva secundária**, possui um padrão recidivante-remitente inicial e posteriormente há uma progressão gradual da incapacidade. A terceira categoria, **EM progressiva primária**, afeta menos de 15% dos pacientes e é a mais comum em pessoas acima de 40 anos. Caracteriza-se por progressão gradual da incapacidade desde o início da doença. A quarta e última, a **EM progressiva recidivante**, é uma evolução clínica incomum, na qual pacientes que parecem apresentar EM progressiva primária sofrem recidivas superpostas [HAUSER; GOODKIN, 1998; CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008].

Em relação à epidemiologia da EM, essa doença é mais elevada em caucasóides que em outros grupos étnicos, cerca de duas vezes mais freqüente no sexo feminino que no masculino, e sua incidência aumenta da adolescência até os 35 anos de idade e, a partir daí, diminui gradualmente [HAUSER; GOODKIN, 1998].

Os sintomas iniciais comuns da doença consistem em fraqueza nos membros, visão turva devido à neurite óptica, distúrbios sensoriais, diplopia e ataxia. Outros sintomas incluem vertigem associada a vômito, urgência vesical e ainda disfunções cognitivas (perda de memória, falta de atenção, dificuldade na resolução de problemas) na fase avançada da doença [HAUSER; GOODKIN, 1998].

Origem

Pesquisas em humanos e animais experimentais sugerem que EM é uma doença auto-imune mediada por células T antígeno-específicas, as quais, eventualmente, provocariam um processo inflamatório levando aos danos teciduais, desmielinização e degeneração axonal [SELLNER et al., 2008c]. A lesão da bainha de mielina das células nervosas provoca, dentre outros, liberação de seus componentes e morte de oligodendrócitos [DUARTE et al., 1994]. A

desmielinização leva a anormalidades e até bloqueio na condução do impulso nervoso [HAUSER; GOODKIN, 1998].

Estudos em grupos étnicos e em famílias apóiam uma possível susceptibilidade genética à EM [HAUSER; GOODKIN, 1998; RAMAGOPALAN et al., 2008]. O óxido nítrico apresenta toxicidade para os oligodendrócitos e indução na degeneração do axônio. A região do genoma responsável pela produção da enzima óxido nítrico sintetase (NOS^{ase}) está localizada no cromossomo 12, o qual contém um 'loci' gênico relacionado à EM. O gene responsável pela síntese dessa enzima foi mostrado como indutor da resposta inflamatória na esclerose múltipla. Estas evidências reforçam que a ação da NOS^{ase} implique em uma maior susceptibilidade à doença [TAJOURI et al., 2004]. A enzima ciclooxigenase 2 (COx-2) pode também estar relacionada à patogenia da doença, uma vez que é responsável pela síntese de eicosanóides que desencadeiam inflamação, processo associado à degeneração celular da EM [ROSE et al., 2004].

Além de fatores intrínsecos ao indivíduo, fatores ambientais são considerados como desencadeadores do aparecimento da EM. Foi encontrada, em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de vários pacientes, elevada quantidade de anticorpos contra muitos vírus, incluindo os da rubéola, sarampo, herpes-simples, varicela e vírus da influenza C, em comparação aos indivíduos saudáveis sem a doença. Há suspeita de que o vírus possa atuar como superantígeno capaz de ativar células T indutoras de doença na EM [HAUSER; GOODKIN, 1998]. Com a disponibilidade de estudos epidemiológicos atuais, o consenso é que infecções podem provocar recaídas na esclerose múltipla [CONFAVREUX; VUKUSIC, 2008].

Muitos trabalhos também investigaram a relação entre a incidência dessa doença e os hábitos alimentares dos indivíduos [SCHWARZ; LEWELING, 2005], especialmente a natureza dos ácidos graxos (FA) da dieta. Por muitos anos se suspeitou que a EM estivesse associada com o desequilíbrio entre ácidos graxos insaturados e saturados, uma vez que teores elevados de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) associados a baixos teores de ácidos graxos saturados (SFA) estão implicados na redução de inflamações e severidade de algumas doenças [KOCH et al., 2006]. O estudo de Swank e colaboradores [1952] encontrou alta incidência de EM em áreas de grande

ingestão de gordura animal saturada comparada a áreas com alto consumo de peixes (ricos em lipídios insaturados). Posteriores estudos epidemiológicos relacionados à incidência de EM e nutrição não foram uniformes em confirmar a ingestão de gorduras e casos da doença [BERR et al., 1989; TOLA et al., 1994; ZHANG et al., 2000].

Tratamento

A terapêutica convencional de EM é feita com imunossupressores e imunomoduladores, como interferon β 1a (IFN- β 1a) e interferon β 1b (IFN- β 1b), que são capazes de diminuir a frequência e a severidade das recidivas em portadores da forma recidivante-remitente da doença [HAUSER; GOODKIN, 1998; RIO; MONTALBAN, 2005]. Entretanto, em portadores da forma progressiva primária, não há comprovação clínica da eficácia terapêutica dos imunomoduladores [CALLEGARO et al., 2001]. Entre os diversos mecanismos de ação propostos para INF- β se tem a interferência no balanço Th1/Th2, com diminuição de Th1 (pró-inflamatório) e indução de Th2 (anti-inflamatório) [GRABER et al., 2007].

Recentemente foram iniciados estudos e terapia da EM com estatinas. As estatinas podem ser classificadas em duas categorias com base na sua origem: as derivadas de fermentação por fungos (lovastatina, sinvastatina, mevastatina e pravastatina) e as sintéticas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitavastatina e rosuvastatina) [van der MOST et al., 2009]. Lovastatina e sinvastatina são administradas como formas inativas, enquanto atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina e pravastatina como compostos ativos (forma ácida). O metabolismo hepático é o principal lugar de ação dessas drogas [BLUMENTHAL, 2000].

Grandes grupos de pesquisa no mundo realizam estudos entre a relação das estatinas e seus efeitos benéficos em várias condições patológicas, tais como o MAAS ('Multicentre Anti-Atheroma Study') e o 4S ('Scandinavian Simvastatin Survival Study Group'), que trabalham com sinvastatina, o LIPID ('The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease') e o WOSCOPS ('West Of Scotland Coronary Prevention Study'), grupos que estudam a pravastatina.

As estatinas são inibidores, oralmente administrados, da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) e impedem assim a produção de L-mevalonato, um produto intermediário na síntese de colesterol. As estatinas são específicas e efetivas, uma vez que fazem mais que competir com o substrato normal no sítio ativo da enzima, pois elas também alteram a conformação da HMG-CoA redutase quando se ligam a ela [CORSINI et al., 1999]. Elas são amplamente prescritas devido a suas propriedades hipolipidêmicas [BLUM, 1994; SACKS et al., 1996; LIPID, 1998].

O fígado é o grande órgão alvo das estatinas, justamente onde ocorre a maior parte da síntese de colesterol no corpo humano. A inibição da síntese de colesterol nos hepatócitos, o que resulta na diminuição de colesterol intracelular, favorece a expressão e mobilização de receptores de LDL na membrana da célula para promover a captação de lipoproteínas que contém apo-B100 (VLDL, IDL e LDL) [SEHAYEK et al., 1994], o que tem um grande impacto na diminuição do teor de colesterol aterogênico circulante.

A redução da concentração de LDL-C plasmático pelas estatinas é mais eficiente do que aquela promovida por outras drogas hipolipidêmicas, o que proporciona regressão da aterosclerose, melhorando o estado de saúde e a sobrevivência do paciente em relação à doença arterial coronariana [SACKS et al., 1996; LIPID, 1998; NASSIEF; MARSH, 2008].

As estatinas apresentam propriedades pleiotrópicas, ou seja, outros efeitos além do efeito principal para o qual elas foram desenvolvidas. A **Tabela 1.1** reúne as propriedades gerais já descritas na literatura para as estatinas.

Estudos clínicos e laboratoriais revelaram que as estatinas apresentam propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras [SELLNER et al., 2008]. Os efeitos benéficos reportados em modelos animais de EM incluem: 1) inibição da NOS^{ase} e da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, 2) promoção de uma mudança no perfil de citocinas de Th1 para Th2, e 3) redução da apresentação de antígeno MHC-II específico, gerando uma boa expectativa para tratamento da EM [PAHAN et al., 1997; KWAK et al., 2000; SENA et al., 2003]. Além disso, elas melhoram a função endotelial [VAUGHAN et al., 1996] e diminuem a hipercoagulabilidade do sangue [SIRTORI; COLLI, 1993].

Alguns trabalhos têm reportado que as estatinas também apresentam ação antioxidante, por diminuir a susceptibilidade da LDL à oxidação. Os mecanismos que podem explicar essa propriedade são: 1) diminuição do substrato-alvo da oxidação (LDL) em função do efeito hipolipidemiante da estatina; 2) atenuação da formação de superóxido em células endoteliais [WAGNER et al., 2000] e preservação da atividade de sistemas antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase [CHEN et al., 1997]; e 3) prevenção da difusão de radicais livres para o núcleo da lipoproteína pela ligação da estatina à sua superfície [AVIRAM et al., 1998a].

Entretanto, é preciso ressaltar que as estatinas devem ser administradas com precaução, por causa de seus efeitos colaterais. Eles são poucos, mas incluem sintomas gastrointestinais, dores musculares e, em uma pequena quantidade de pacientes, hepatotoxicidade [CLARK, 2003]. Sellner e colaboradores [2008c] encontraram um aumento na secreção de IL-12p70 em pacientes com EM tratados por três meses com atorvastatina, corroborando resultados de experimentos 'in vitro' que constataram estímulo ou inibição da liberação de citocinas Th1 e Th2, além de aumento de citocinas potencialmente nocivas como IFN- γ e IL-12 [NEUHAUS et al., 2002].

AS MEMBRANAS CELULARES

As membranas celulares devem congrega**r estabilidade e funcionalidade**, propriedades que dependem de seu grau de **fluidez**. A **fluidez** é uma propriedade da matéria que aumenta à medida que se vai do estado sólido para o estado líquido. A organização de uma membrana biológica exige um nível intermediário de fluidez, entre o estado sólido e o estado líquido, que pode ser designada de **fluidez crítica (Figura 1.1)**.

No ponto de fluidez crítica, a membrana congrega a estabilidade necessária para sua preservação com um nível de elasticidade necessário para que as células sofram as alterações conformacionais exigidas pelo exercício de funções complexas, como a transdução de sinais hormonais para moléculas no

interior da célula, onde elas vão regular funções celulares relacionadas com o metabolismo, a diferenciação e a proliferação [SINENSKY, 1974].

A manutenção dessa fluidez crítica depende de vários mecanismos homeostáticos, como o balanço no teor de colesterol e ácidos graxos saturados (SFA) de fosfolípidos em relação ao teor de ácidos graxos insaturados (UFA) de fosfolípidos [CRIBIER et al., 1993].

A fluidez de membrana é aumentada pela elevação nos teores de ácidos graxos insaturados (nos fosfolípidos) e diminuída pela elevação no teor de ácidos graxos saturados e de colesterol (**Figura 1.1**). Um aumento excessivo no teor de UFA e/ou uma diminuição exagerada no teor de colesterol pode promover fusão da membrana, tornando-a sujeita à lise por fusibilidade. Por outro lado, um aumento excessivo no teor de SFA e/ou de colesterol vai promover rigidificação de membrana, tornando-a sujeita à lise por friabilidade. Assim, tanto aquém quanto além da fluidez crítica, a membrana perde estabilidade e funcionalidade. Mas os prejuízos à funcionalidade não são somente determinados pelas situações extremas, em que ela pode se desfazer por friabilidade ou fusibilidade. Uma diminuição ou aumento exagerado no teor de colesterol pode levar a disfunções nas células [CALISKAN et al., 2000].

O calor também aumenta a fusibilidade de membrana (**Figura 1.1**). O impacto da temperatura sobre a estabilidade de membrana num organismo homeotérmico não tem maior importância, diferentemente de organismos poiquilotérmicos. Microorganismos que têm seu 'habitat' em regiões de altas temperaturas têm maior teor em ácidos graxos saturados em seus fosfolípidos de membrana do que organismos que vivem em baixas temperaturas [YATVIN, 1977].

O controle da estabilidade de complexos biológicos também pode ocorrer por alterações na osmolaridade do meio pela produção e acúmulo de pequenos solutos chamados osmólitos [BOLEN, 2004], de acordo com um mecanismo chamado de solvofóbico [TIMASHEFF, 1998] ou osmofóbico [BOLEN; BASKAKOV, 2001].

Uma ameaça às membranas biológicas são as espécies reativas do oxigênio (ROS), moléculas altamente reativas que podem ativar cascatas de lipoperoxidação. Na mitocôndria uma significativa fração do oxigênio (O₂) produz

ROS, que incluem o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila [HENSLEY et al., 2000; GONSETTE, 2008]. Quando formados em pequenas quantidades, os ROS podem ser combatidos pelas defesas antioxidantes e mecanismos de reparo celular; no entanto, quando produzidos em excesso, eles geram um estado de desequilíbrio chamado estresse oxidativo, que promove dano em ácidos nucleicos, proteínas e lipídios [GILGUN-SHERKI et al., 2004]. Os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) de membranas constituem as estruturas mais vulneráveis a esses danos, sendo alvo do processo chamado lipoperoxidação [BEGUM; TERAU, 2002]. Como o SNC tem a segunda maior concentração de lipídios depois do tecido adiposo [HORROCKS; FAROOQUI, 2004], a geração de um estado de estresse oxidativo deve causar danos graves às células neurais.

A estabilidade de membrana de eritrócitos

A membrana eritrocitária, como outras, consiste em uma bicamada fosfolipídica que representa aproximadamente 50% de sua massa total. A deformabilidade e complexidade dessa membrana asseguram as funções de transporte de O₂ dos pulmões e remoção do dióxido de carbono (CO₂) dos tecidos para os pulmões [COOPER, 1997].

Os eritrócitos constituem um modelo efetivo para estudo das membranas biológicas, principalmente de sua estabilidade, uma vez que sua lise, provocada por fatores de estresse, libera hemoglobina, que pode ser quantificada pela leitura espectrofotométrica da absorvância da luz visível em 540 nm. Essa absorvância é proporcional à extensão da lise dos eritrócitos (hemólise) [NELSON; COX, 2000].

Vários fatores interferem na estabilidade osmótica de eritrócitos, tais como volume, tamanho e forma, tipo e quantidade de hemoglobina, viscoelasticidade e composição química e estrutural das membranas [PERK et al., 1964]. Além disso, variações fisiológicas (variações pós-prandiais) ou patológicas (presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos autoimunes, hepatopatias, insuficiência renal) [JAIN, 1973] e outros fatores, como pequenas alterações no pH, temperatura, idade, quantidade de O₂ e de CO₂ [SUESS et al., 1948] e vários

tipos de drogas [AKI; YAMAMOTO, 1991] também alteram a estabilidade dos eritrócitos.

A avaliação da estabilidade dessas células pode ser realizada através de experimentos que incluem o choque hipotônico [JAIN, 1986; CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2007; DE FREITAS et al., 2008] e a ação de solutos estabilizantes e caotrópicos (como o etanol) [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; PENHA-SILVA et al., 2008].

Os efeitos do etanol nas propriedades das membranas de eritrócitos têm sido extensamente reportados na literatura. Eles incluem aumento da fluidez de membrana [SUN; SUN, 1985; BENEDETTI et al., 1986; BENAÏM et al., 1994]. Os eritrócitos não metabolizam o etanol, pois são desprovidos de atividade da enzima álcool desidrogenase [ZORZANO et al., 1989], mas suas membranas são vulneráveis à ação dos metabólitos oxidantes formados em outros locais do organismo a partir do metabolismo de etanol. De fato, o alcoolismo crônico está associado a aumento na taxa de hemólise e anemia crônica [WISLOFF; BOMAN, 1979; COLMAN; HERBERT, 1980].

O etanol, além de soluto caotrópico, também afeta a osmolaridade do meio, o que significa que ele congrega propriedades desestabilizantes e estabilizantes de membranas biológicas. Os eritrócitos podem sofrer alterações morfológicas e alterações de volume em meio de alta osmolaridade [BAKALTCHEVA et al., 1996; LANG et al., 1998]. Essas alterações de volume foram consideradas em um modelo de equilíbrio morfológico, que considera a existência dos eritrócitos em um estado expandido ou relaxado (**R**), presente nas condições naturais do sangue, e um estado condensado ou tenso (**T**), presente em situações de alta osmolaridade [AVERSI-FERREIRA, 2004; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA et al., 2007; DE FREITAS REIS, 2007; PENHA-SILVA et al., 2008]. Em soluções salinas fisiológicas com baixas concentrações de etanol, os eritrócitos estão presentes no estado **R**. Com o aumento na concentração de etanol, os eritrócitos do estado **R** sofrem lise. Mas a incubação dos eritrócitos em soluções salinas com concentrações mais elevadas de etanol (em torno de 5 mol.L⁻¹) causa contração de volume que caracteriza o estado **T** daquelas células, as quais também podem sofrer lise com elevação na concentração de etanol [AVERSI-FERREIRA, 2004; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA et al., 2007; DE FREITAS REIS, 2007].

Realmente, eritrócitos íntegros foram encontrados em um estado expandido (**R**), sob baixas concentrações de etanol, e em um estado contraído (**T**), sob as altas concentrações de etanol [GOUVÊA-E-SILVA, 2006]. Aquele modelo de equilíbrio morfológico de eritrócitos reflete a ambigüidade existente nas ações do etanol sobre as membranas plasmáticas. Embora o etanol seja um típico caotrópico, ação que se configura em qualquer concentração desse soluto, ele também promove osmoestabilização de complexos biológicos, ação que prevalece somente quando ele está em altas concentrações [CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008].

A fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) pode ser avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,9% a 0% [JAIN, 1986]. As células, suspensas em meio hipotônico, aumentam até alcançar um volume crítico de hemólise antes de serem lisadas. A fragilidade celular, portanto, é dependente da concentração de sal e segue uma distribuição normal em animais sadios [JAIN, 1973], ocorrendo diferenças entre as espécies [JAIN, 1986] e idades dos indivíduos de uma mesma espécie [PENHA-SILVA et al., 2007].

A FOE é aplicada em diagnóstico de doenças, em caracterização de substâncias hemolíticas, em estudos de permeabilidade da membrana e nas alterações no processo de destruição dessas células [SUESS et al., 1948; DE FREITAS et al., 2008].

As membranas de eritrócitos na esclerose múltipla

Defeitos originados nos mecanismos promotores da homeostase estrutural nas membranas da bainha de mielina poderiam ser comuns a outras membranas celulares do organismo, especialmente se estes defeitos tiverem origem estocástica associada a hábitos alimentares e/ou estilos de vida. Isso justifica a busca de quebra desses mecanismos homeostáticos nas células sangüíneas [KURANTSIN-MILLS et al., 1982], no sentido de estender essas informações às células nervosas [PREDETECHENSKAYA; IERUSALIMSKII, 1991].

De fato, anormalidades físicas e funcionais foram descritas para os eritrócitos de pacientes com EM. Foi reportado aumento na fragilidade de RBC, tanto de origem osmótica [LASZLO, 1964; CASPARY et al., 1967; STASIW et al.,

1977; KURANTSIN-MILLS et al., 1982] quanto mecânica [SCHAUF et al, 1980], assim como aumento no diâmetro médio e elipticidade dessas células [PLUM; FOG, 1959; PRINEAS, 1968], apesar de outros estudos não terem detectado nenhuma evidência de macrocitose na EM [GRASSO et al., 1992]. Esse aumento no diâmetro médio do eritrócito não deve significar necessariamente macrocitose, mas é possível que sua causa possa ser algum distúrbio no metabolismo, ligação ou transporte de vitamina B₁₂.

CASPARY e colaboradores [1967] constataram que os eritrócitos são osmoticamente mais frágeis durante a fase aguda da doença do que quando ela está quiescente. Ainda nessa fase quiescente, os eritrócitos são mais frágeis que as células de pessoas saudáveis. Outro dado importante encontrado por PLUM e FOG [1959] foi o comportamento anormal de cultura de células da medula óssea de portadores de EM.

Concentrações elevadas de colesterol foram encontradas na membrana de eritrócitos em pacientes com hipercolesterolemia [SCHICK; SCHICK, 1985; MARTINEZ et al., 1996; ÖZDEMIRLER et al., 2001], quadro que pode ser comum ao portador de EM que apresente dislipidemia.

Concentrações elevadas de SFA e baixas de UFA foram encontradas nos fosfolipídeos de membrana dos eritrócitos de portadores de EM [CHERAYIL, 1984; NAVARRO; SEGURA, 1989]. Essa composição lipídica da membrana de eritrócitos (RBC) reflete os padrões de alimentação e de atividade física dos indivíduos durante o período equivalente à meia-via dos eritrócitos (em torno de 4 meses), diferentemente da composição dos lipídeos plasmáticos, que reflete mais os hábitos circadianos [KOCH et al., 2006].

Esses achados são importantes e refletem as condições da homeostase de membrana dos eritrócitos no período de sua determinação. Eles poderiam ser meramente uma consequência de mudanças no estilo de vida associadas ao desenvolvimento da doença, mas poderiam também estar associadas a um estilo de vida que possa ter tido implicações no desenvolvimento da EM. Há razões para acreditar que a última hipótese é verdadeira, porque deficiência no teor de ω 3-PUFA nos eritrócitos reflete deficiência em seu teor em todo organismo, situação que é capaz de gerar uma alta razão ω 6-PUFA/ ω 3-PUFA, fato que está

vinculado à exacerbação da imunidade e da inflamação [CALDER, 1996; CALDER, 2005; SCHWAB, SERHAN, 2006].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As membranas biológicas apresentam papel primordial na homeostase celular, mas sua homeostase estrutural é largamente dependente da alimentação e do padrão de atividade física. Desequilíbrios nutricionais que elevem as razões entre $\omega 6$ e $\omega 3$ -PUFA, freqüentemente associados a dislipidemia, podem exacerbar processos de oxidação, inflamação e imunidade, os quais parecem ser os fatores desencadeantes da esclerose múltipla em indivíduos geneticamente predispostos. Curiosamente, essa é a esfera de ação das estatinas, que tem ações hipolipemiantes, anti-oxidante, antiinflamatória e imunomoduladora. Diante desse painel, que precisa ser devidamente elucidado, a dietoterapia e a atividade física podem se configurar em alternativas importantes na prevenção e mesmo no tratamento da esclerose múltipla [SIMOPOULOS, 2002].

Tabela 1.1. Revisão bibliográfica sobre as propriedades encontradas para as estatinas no organismo humano.

Propriedades das Estatinas	Publicações
Ação hipolipidemiante	Nassief; Marsh, 2008; Sena et al., 2003; Corsini et al., 1999; LIPID, 1998; Martinez et al., 1996; Sacks et al., 1996; Blum, 1994; Sehayek et al., 1994; Rabini et al., 1993
Ação antiinflamatória	Sellner et al., 2008; Sellner et al., 2008c; Endres, 2006; Pahan et al., 1997
Ação imunomoduladora	Sellner et al., 2008; Weber et al., 2006; Sena et al., 2003; Kwak et al., 2000
Melhoramento da função endotelial	Merx; Weber, 2008; Endres, 2005; Wagner et al., 2000; Vaughan et al., 1996
Ação anti-trombótica	Rosenson; Tangney 1998; Sirtori; Colli, 1993
Ação antioxidante	Koter et al., 2002; Wagner et al., 2000; Aviram et al., 1998b; Chen et al., 1997

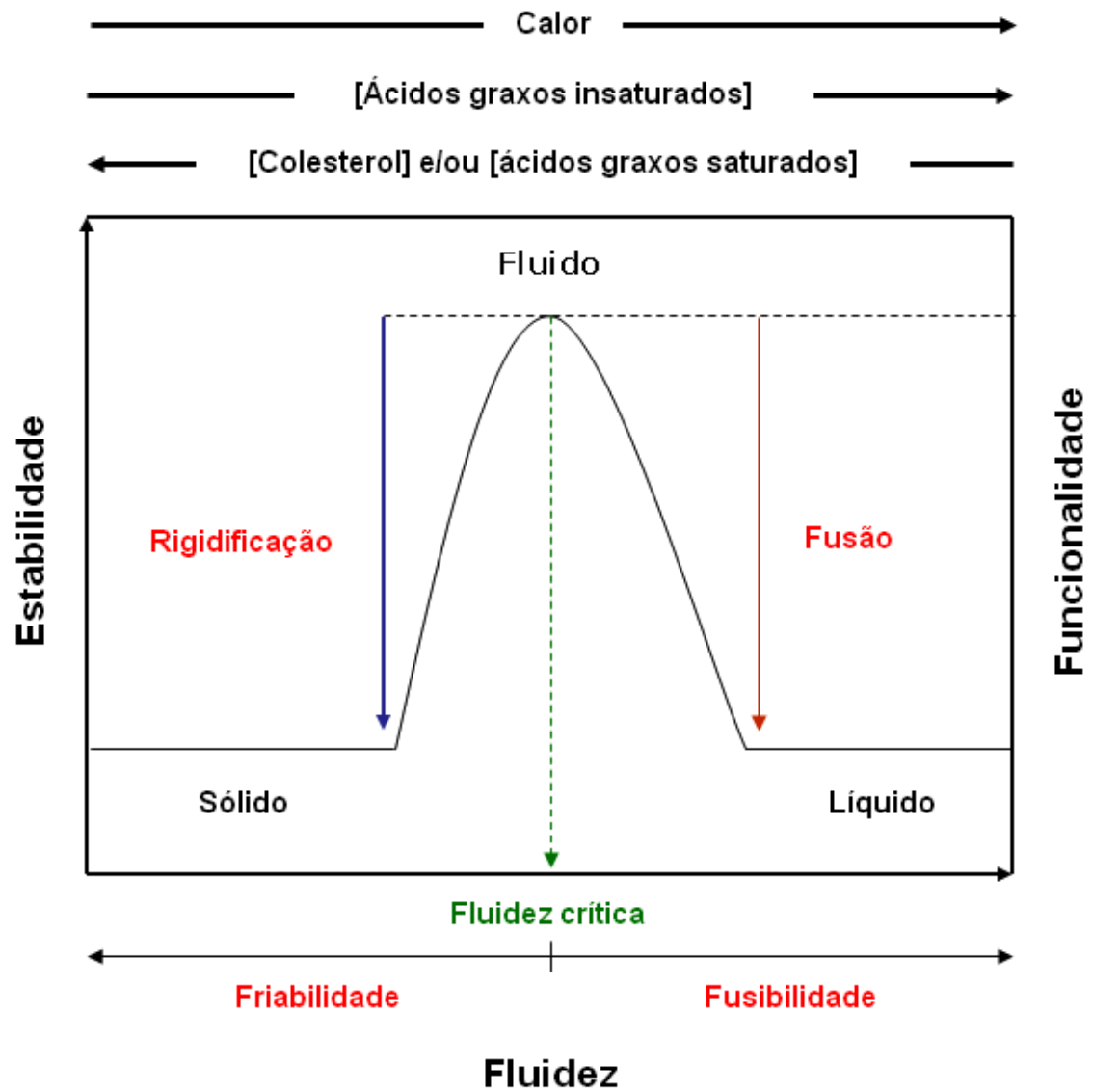


Figura 1.1. Dependência da **estabilidade** e da **funcionalidade** de uma membrana celular com sua **fluidez**.

REFERÊNCIAS

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. **Biochemical Pharmacology**, v.41, p.133-38, 1991.

AVERSI-FERREIRA, T.A. **Efeitos pós-natais do etanol sobre o desenvolvimento do neocórtex de ratos Wistar**, 2004. 70 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2004.

AVIRAM, M.; HUSSEIN, O.; ROSENBLAT, M.; SCHLEZINGER, S.; HAYEK, T.; KEIDAR, S. Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.31, p.39-45, 1998a.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C.L.; NEWTON, R.S. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. **Atherosclerosis**, v.138, p.271-280, 1998b.

BAKALTCHEVA, I.B.; ODEYALE, C.O.; SPARGO, B.J. Effects of alkanols, alkanediols, and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1280, p.73-80, 1996.

BEGUM, A.N.; TERAQ, J. Protective effect of α -tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, p. 398-403, 2002.

BENAIM, G.; CERVINO, V.; LOPEZ-ESTRANO, C. WEITZMAN, C. Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1195, p.141-48, 1994.

BENEDETTI, A.; BIRARELLI, A.M.; BRUNELLI, E.; CURATOLA, G.; FERRETTI, G.; JEZEQUEL, A.M.; ORLANDI, F. Effect of chronic ethanol abuse on the physico-chemical properties of erythrocyte membranes in man. **Pharmacological research communications**, v.18, p. 1003-14, 1986.

BERR, C.; PUEL, J.; CLANET, M.; RUIDAVETS, J.B.; MAS, J.L.; ALPEROVITCH, A. Risk factors in multiple sclerosis: a population-based case-control study in Hautes-Pyrennes, France. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.80, p. 46-50, 1989.

BLUM, C.B. Comparison of properties of four inhibitors on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **The American Journal of Cardiology**, v.73, p.3D-11D, 1994.

BLUMENTHAL, R.S. Statins: effective antiatherosclerotic therapy. **American Heart Journal**, v.139, p.577-583, 2000.

BOLEN, D.W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. **Methods**, v.34, p. 312-22, 2004.

BOLEN, D.W.; BASKAKOV, I.V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v.310, p. 955-63, 2001.

CALDER, P.C. Effects of fatty acids and dietary lipids of the immune system. **The Proceedings of the nutrition society**, v.55, p.127-150, 1996.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v.33, n.2, p.423-427, 2005.

CALISKAN, S.; CALISKAN, M.; KURALAY, B.; ÖNVURAL, B. Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. **Research in Experimental Medicine**, v.199, p.189-194, 2000.

CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAES, L.; TILBERY, C.P.; MOREIRA, M.A.; GABBAI, A.A.; SCAFF, M. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.104, p. 208-13, 2001.

CALLEGARO, D.; LANA-PEIXOTO, M.A.; MOREIRA, M.A.; MARCHIORI, P.E.; BACHESCHI, L.A.; ARRUDA, W.O.; CAMPOS, G.B.; LINO, A.M.M.; MELO, A.S.; ROCHA, F.C.G.; FERREIRA, M.L.B.; ATAIDE, L. JR.; MACIEL, D.R.K. The BCTRIMS Expanded Consensus on treatment of multiple sclerosis: I. The evidences for the use of immunosuppressive agents, plasma exchange and autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.60, p. 869-74, 2002.

CASPARY, E.A.; SEWELL, F.; FIELD, E.J. Red blood cell fragility in multiple sclerosis. **British Medical Journal**, v.2, p. 610-611, 1967.

CHEN, L.; HAUGHT, W.H.; YANG, B. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanism of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. **Journal of the American College of Cardiology**, v.30, p.569-575, 1997.

CHERAYIL, G.D. Sialic acid and fatty acid concentrations in lymphocytes, red blood cell and plasma from patients with multiple sclerosis. **Journal Neurological Sciences**, v.63, p. 1-10, 1984.

CLARK, L.T. Treating dyslipidemia with statins: the risk-benefit profile. **American Heart Journal**, v. 145, p.387-396, 2003.

COLMAN, N.; HERBERT, V. Hematologic complications of alcoholism: overview. **Seminars in Hematology**, v.17, p.164-76, 1980.

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

COOPER, G.M. The cell surface. In: **The cell: A molecular approach**. Washington: ASM Press, 1997. p.467-517.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v.84, p.413-428, 1999.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids**, v.48, p. 24-32, 1993.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M.; HUSS, J.C.C.; DE SOUZA, T.M.T.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.219-224, 2008.

DUARTE, F.; PITTELLA, J.E.H.; AVILA, C.M.; ROSEMBERG, S.; HAHN, M.D.; CHIMELLI, L.; PAOLA, D. Sistema Nervoso. BOGLIOLO, L. (Ed.) **Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 723-825.

ENDRES, M. Statins an stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.25, p.1093-1110, 2005.

ENDRES, M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, p.31-35, 2006.

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

GONSETTE, R.E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. **Journal of the Neurological Sciences**, v.274, p.48-53, 2008.

GOUVÊA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**, 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

GRABER, J.J.; FORD, D.; ZHAN, M.; FRANCIS, G.; PANITCH, H.; DHIB-JALBUT, S. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response. **Journal of Neuroimmunology**, 185, 168-174, 2007.

GRASSO, M.G.; COLLELUORI, A.; MILLEFIORINI, E.; POZZILLI, C. Lack of association between macrocytosis and multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 55, p. 1096-1097, 1992.

HAUSER, S.L.; GOODKIN, D.E. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. FAUCI, A.D. et al. (Eds.) **Harrison's Principle of Internal Medicine**. 14 ed. New York: McGraw Hill, 1998. p. 2452-2461.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, p.1456-1462, 2000.

HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.70, p.361-372, 2004.

HUETHER, G.; KLAPPROTH, M.; NEUHOFF, V. Fatty acid composition of myelin lipids from developing rat forebrain and spinal cord: influence of experimental hyperphenylalaninaemia. **Neurochemical Research**, v. 11, p.1303-1311, 1986.

JAIN, N.C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**. v. 63, p. 411-423, 1973.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p.1221.

KENEALY, S.J.; PERICAK-VANCE, M.A.; HAINES, J.L. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.143, p.7-12, 2003.

KOCH, M.; RAMSARANNING, G.S.M.; FOKKEMA, M.R.; HEERSEMA, D.J.; KEYSER, J.D. Erythrocyte membrane fatty acids in benign and progressive forms of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Science**, v.244, p. 123-26, 2006.

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **Pharmacodynamics**, v.58, p.501-506, 2002.

KURANTSIN-MILLS, J.; SAMJI, N.; MOSCARELLO, M.A.; BOGGS, J.M. Comparison of membrane structure, osmotic fragility, and morphology of multiple sclerosis and normal erythrocytes. **Neurochemical Research**, v.7, p. 1523-1540, 1982.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis. An expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v.83, p.1444, 1983.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nature Medicine**, v.6, p. 1399-1402, 2000.

LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HÄUSSINGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 247-306, 1998.

LASZLO, S. Fragilit'e osmotique des globules rouges dans la scl'erosse en plaques. **Acta Neurologica Belgica**, v. 64, p. 529-533, 1964.

LIPID. The long-term intervention with pravastatin in ischemic disease study group : prevention cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and broad range of initial cholesterol levels. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p.1349-1357, 1998.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; MARTI, R.; GIL, L.; LUCH, J.; CARMENA, R. et al. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and haemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. **Thrombosis Research**, v.83, p.375-388, 1996.

MERX, M.W. ; WEBER, C. Benefits od statins beyond lipid lowering. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, p. e325-e331, 2008.

MILLER, A.; KOREM, M.; ALMOG, R.; GALBOIZ, Y. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 233, p.93-97, 2005.

NASSIEF, A.; MARSH, J.D. Statins therapy for stroke prevention. **Stroke**, v.39, p.1042-1048, 2008.

NAVARRO, X.; SEGURA, R. Red blood cell fatty acids in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.79, p.32-7, 1989.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3ed. New York: Worth, 2000. p.1200.

NEUHAUS, O.; STRASSER-FUCHS, S.; FAZEKAS, F.; KIESEIER, B.C.; NIEDERWIESER, G.; HARTUNG, H.P.; ARCHELOS, J.J. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. **Neurology**, v.59, p. 990-997, 2002.

ÖZDEMIRLER, G.; KÜÇÜK, S.; ORHAN, Y.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. Lipid and protein oxidation in erythrocyte membranes of hypercholesterolemic subjects. **Clinical Biochemistry**, v. 34, p.335-339, 2001.

PAHAN, K.; SHEIKH, F.G.; NAMBOODIRI, A.M.S.; SINGH, I. Lovastatin and phenilacetate inhibit the reduction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia and macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, p. 2671-79, 1997.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B., DE FREITAS REIS, F.G.; HUSS, J.C.C.; DE SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.128, p. 444-49, 2007.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-

NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v. 25, p. 1241-48, 1964.

PLUM, C.M.; FOG, T. Studies in multiple sclerosis. **Acta Psychiatrica et Neurologica Scandinavica**, v. 34 (suppl. 128), p. 13-18, 1959.

PREDTECHENSKAYA, P.V.; IERUSALIMSKII, A.P. The functional activity of cell membranes in multiple sclerosis. **Zhurnal Nevropatologii i Psikiatrii**, v.91, p.14-17, 1991.

PRINEAS, J. Red blood cell size in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 44, p. 81-90, 1968.

RABINI, R.A.; POLENTA, M.; STAFFOLANI, R.; TOCCHINI, M.; SIGNORI, R. TESTA, I. et al. Effect of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors on the functional properties of erythrocytes membranes. **Experimental and Molecular Pathology**, v.59, p.51-57, 1993.

RAMAGOPALAN, S.V.; DYMENT D.A.; EBERS, G.C. Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. **Trends in Neurosciences**, v.31, p. 645-652, 2008.

RIO, J.; MONTALBAN, X. Interferon-beta 1b in the treatment of multiple sclerosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, p. 2877-2886, 2005.

ROSE, J.W.; HILL, K.E.; CARLSON, N.G. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase 2 in the multiple sclerosis lesion. **Journal of Neuroimmunology**, v.149, p. 40-49, 2004.

ROSENSON, R.S.; TANGNEY, C.C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. **Journal of the American Medical Association**, v.279, p.1643-1650, 1998.

SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOYE, L.A.; ROULEAU, J.L. RUTHERFORD, J.D.; COLE, T.G. et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. **The New England Journal of Medicine**, v.335, p.1001-1009, 1996.

SCHAUF, C.L.; FRISCHER, H.; DAVIS, F.A. Mechanical fragility of erythrocytes in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 30, p. 323-325, 1980.

SCHICK, B.P.; SCHICK, P.K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 833, p.281-290, 1985.

SCHWAB, J.M.; SERHAN, C.N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, p.414-420, 2006.

SCHWARZ, S.; LEWELING, H. Multiple sclerosis and nutrition. **Multiple Sclerosis**, v.11, p.24-32, 2005.

SEHAYEK, E. ; BUTBUL, E. ; AVNER, R. Enhanced cellular metabolism of very low lipoprotein by simvastatin : a novel mechanism of action of HMG-CoA reductase inhibitors. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24, p.173-178, 1994.

SELLNER, J. ; GREEVE, I. ; FINDLING, O. ; GRANDGIRARD, D. ; LEIB, S.L. ; MATTLE, H.P. Atorvastatin does not alter serum levels of sCD95 and sCD95L in multiple sclerosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v.152, p. 280-284, 2008.

SELLNER, J.; GREEVE, I.; FINDLING, O. ; KAMM, C. P. ; MINTEN, C. ; ENGELHARDT, B. ; GRANDGIRARD, D. ; LEIB, S.L. ; MATTLE, H.P. Effect of interferon- β and atorvastatin on Th1/Th2 cytokines in multiple sclerosis. **Neurochemistry International**, v.53, p.17-21, 2008c.

SENA, A.; PEDROSA, R.; MORAIS, M.G. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v.250, p. 754-55, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal American College Nutrition**, v.21, p. 495-505, 2002.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.71, p.522-525, 1974.

SIRTORI, C.R.; COLLI, S. Influences of lipid-modifying agents on hemostasis. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.7, p.817-823, 1993.

STASIW, D.M.; ROSATO, S.; MAZZA, J.; CERNY, L.C. Quantitative osmotic fragility and disease states: a preliminary study. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 89, p. 409-413, 1977.

SUESS, J.; LIMENTANI, D.; DAMESHEK, W.; DOLLOFF, M. A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. **Blood**, v.3, p.1290-1303, 1948.

SUN, G.Y.; SUN, A.Y. Ethanol and membrane lipids. **Alcohol Clin Exp Res**, v.9, p. 164-80. 1985.

SWANK, R.L.; LERSTAD, O.; STROM, A.; BACKER, J. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. **The New England Journal of Medicine**, v.246, p. 722-728, 1952.

TAJOURI, L. ; FERREIRA, L. ; OVCHARIC, M.; CURTAIN, R. LEA, R. CSURHES, P. ; PENDER, M.P. ; GRIFFITHS, L.R. Investigation of a neural nitric oxide synthase gene (NOS 1) polymorphism in a multiple sclerosis population. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 218, p. 25-28, 2004.

TIMASHEFF, S.N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. **Advances in Protein Chemistry**, v.51, p. 355-432, 1998.

TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; MALAGU, S.; CANIATTI, L.; CASETTA, I.; GOVONI, V.; et al. Dietary habits and multiple sclerosis. A retrospective study in Ferrara, Italy. **Acta Neurologica (Napoli)**, v.16, p. 189-97, 1994.

van der MOST, P.J.; DOLGA, A.M.; NIJHOLT, I.M.; LUITEN, P.G.M.; EISEL, U.L.M. Statins: mechanism of neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v.88, p.64-75, 2009.

VAUGHAN, C.J.; MURPHY, M.B.; BUCKLEY, B.M. Statins do more than just lower cholesterol. **Lancet**, v. 348, p. 1079-1082, 1996.

WAGNER, A.H.; KOHLER, T.; RUCKSCHLOSS, U.; JUST, I.; HECKER, M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.20, p.61-69, 2000.

WEBER, M.A.; YOUSSEF, S.; DUNN, S.; PROD'HOMME, T.; NEUHAUS, O.; STUVE, O.; GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. Statins in the treatment of central nervous system autoimmune disease. **Journal of Neuroimmunology**, v.178, p.140-148, 2006.

WISLOFF, F.; BOMAN, D. Haemolytic anaemia in alcohol abuse. A review of 14 cases. **Acta Med Scand**, v.205, p. 237-42, 1979.

YATVIN, M.B.. The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic deaths of cells. **International Journal of Radiation Biology**, v.32, p.513-521, 1977.

ZHANG, S.M.; WILLETT, W.C.; HERNAN, M.A.; OLEK, M.J.; ASCHERIO, A. Dietary fat in relation to risk of multiple sclerosis among two large cohorts of women. **American Journal of Epidemiology**, v.152, p. 1056-64, 2000.

ZORZANO, A.; RUIZ DEL ARBOR, L.; HERRERA, E. Effects of liver disorders on ethanol elimination and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in liver and erythrocytes. **Clinical Science**, v.76, p. 51-57, 1989.

CAPÍTULO II

TRABALHO EXPERIMENTAL

RESUMO

[Antecedentes] A esclerose múltipla (EM), doença degenerativa caracterizada por defeitos na membrana de mielina das células neurais, desenvolve-se provavelmente por mecanismos oxidativos, inflamatórios e auto-imunes em indivíduos geneticamente vulneráveis, sob a influência de fatores ambientais associados à alimentação. **[Hipótese]** Como a composição estrutural das membranas biológicas é largamente afetada pela alimentação, padrão de atividade física e uso de medicamentos, se houver interferência de fatores ambientais na homeostase estrutural das membranas das células neurais em portadores de EM, ela deve ser também compartilhada por outras células pós-mitóticas do organismo, como os eritrócitos. **[Objetivo]** Este trabalho teve como objetivo estudar a influência do uso de estatina sobre estabilidade de membrana de eritrócitos contra choque hipotônico e ação caotrópica do etanol em portadores de esclerose múltipla. **[Métodos]** A população foi constituída por 16 mulheres portadoras de EM (26-58 anos), que estavam em acompanhamento no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Elas foram divididas em dois grupos, um grupo tratado com 20 mg/dia de sinvastatina durante $2,66 \pm 1,03$ anos ($n = 6$) e outro grupo sem uso de estatina ($n = 10$). Um grupo controle foi constituído por 6 mulheres saudáveis, com IMC e idades (28-56 anos) equiparáveis ao grupo problema, todas sem uso de medicações e sem consumo crônico de bebida alcoólica. Foram avaliados escores da escala expandida do estado de incapacidade (EDSS), variáveis hematológicas e bioquímicas, além da estabilidade de membrana de eritrócitos contra choque hipotônico e etanol. A estabilidade de eritrócitos foi avaliada pelas constantes de meia-transição de lise, H_{50} e D_{50} , obtidas a partir das curvas de hemólise por choque hipotônico e ação caotrópica do etanol, respectivamente. Comparações estatísticas dos resultados entre os grupos foram feitas por ANOVA, utilizando pós-teste de Tukey. **[Resultados]** Não houve diferenças estatisticamente significantes nos escores de EDSS nem nas variáveis hematológicas entre os grupos, mas as portadoras de EM sob uso de estatina apresentaram níveis de colesterol total e LDL-colesterol significativamente menores do que aquelas sem uso daquela droga. Os valores de

H_{50} das portadoras de EM sem uso de estatina ($0,472 \pm 0,013 \text{ g.dL}^{-1} \text{ NaCl}$) foram significativamente maiores do que aqueles das voluntárias do grupo controle ($0,427 \pm 0,015 \text{ g.dL}^{-1} \text{ NaCl}$). Os valores de H_{50} das portadoras de EM com uso de estatina ($0,457 \pm 0,013 \text{ g.dL}^{-1} \text{ NaCl}$) declinaram (ainda que sem significância estatística) em relação à portadoras de EM sem uso de estatina, sem se igualar aos valores de H_{50} das voluntárias do grupo controle. Por outro lado, os valores de D_{50} das portadoras de EM sem uso de estatina ($13,87 \pm 0,74\% \text{ v/v etanol}$) foram significativamente menores do que os das voluntárias do grupo controle ($15,38 \pm 0,24\% \text{ v/v etanol}$), mas os valores de D_{50} das portadoras de EM sob uso de estatina ($15,20 \pm 0,15\% \text{ v/v etanol}$) não foram significativamente diferentes daqueles das voluntárias do grupo controle, embora eles tenham sido significativamente maiores do que aqueles das portadoras de EM sem uso de estatina. **[Conclusões]** As portadoras de EM sem uso de estatina apresentaram eritrócitos menos estáveis contra hipotonicidade e contra a ação do etanol que as voluntárias do grupo controle. O uso de estatina aumentou a estabilidade de eritrócitos contra etanol nas portadoras de EM, tornando esta estabilidade semelhante àquela das voluntárias sem a doença. Porém o uso de estatina não aumentou a estabilidade de membrana dos eritrócitos contra hipotonicidade a ponto de torná-la semelhante à estabilidade de membrana das voluntárias sem a doença. Esses achados são importantes e refletem as condições da homeostase de membrana dos eritrócitos, no período de sua determinação. Eles poderiam ser mera consequência de mudanças no estilo de vida associadas ao desenvolvimento da doença, mas poderiam também estar associadas a um estilo de vida que possa ter tido implicações no desenvolvimento da EM. As razões para acreditar na validade desta última hipótese são discutidas.

Palavras-chave: esclerose múltipla, estatina, colesterol, membrana, eritrócito, estabilidade

ABSTRACT

[Background] Multiple sclerosis (MS), degenerative disease characterized by defects in the myelin membrane of neural cells, takes place probably by oxidative, inflammatory and autoimmune mechanisms in genetically vulnerable individuals, under the influence of environmental factors associated with feeding. **[Hypothesis]** As the structural composition of biological membranes is largely affected by diet, physical activity and use of medicines, the interference of environmental factors in the homeostasis of structural membranes of neural cells in carriers of MS must also be shared by other post-mitotic cells of the body, such as erythrocytes. **[Objective]** This study aimed to investigate the influence of statin use on the stability of erythrocytes membranes against hypotonic shock and chaotropic action of ethanol in patients with MS. **[Methods]** The population was composed of 16 women suffering from MS (26-58 years) who were being monitored at the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia. They were divided into two groups, one group treated with 20 mg/day of simvastatin for 2.66 ± 1.03 years ($n = 6$) and another group without the use of statin ($n = 10$). A control group consisted of 6 healthy women with BMI and age (28-56 years) similar to problem group, all without the use of medications and without chronic consumption of alcohol. We evaluated the scores of patients in the Expanded Disability Status Scale (EDSS), hematological and biochemical variables, in addition to the stability of erythrocytes against hypotonic shock and ethanol. The stability of erythrocytes was evaluated by the half-transition points, H_{50} and D_{50} , obtained from the curves of hemolysis induced by hypotonic shock and chaotropic action of ethanol, respectively. Statistical comparisons of results between groups were made by ANOVA and Tukey post-hoc test. **[Results]** There were no statistically significant differences in EDSS scores or the hematological variables between groups, but the MS patients under use of statin showed levels of total cholesterol and LDL-cholesterol significantly lower than those without use of that drug. The values of H_{50} of the MS patients without use of statins (0.472 ± 0.013 g.dL⁻¹ NaCl) were significantly higher than those of volunteers in the control group (0.427 ± 0.015 g.dL⁻¹ NaCl). The H_{50} values of the carriers of MS with use of statins (0.457 ± 0.013 g.dL⁻¹ NaCl) declined (although not in a statistically

significant basis) compared to carriers of MS without the use of statins, but they were not equal to the values of H_{50} of volunteers in the control group. Moreover, the values of D_{50} of MS patients without use of statin ($13.87 \pm 0.74\%$ v/v ethanol) were significantly lower than those of volunteers in the control group (15.38 ± 0.24 g.dL⁻¹ NaCl), but the values of D_{50} in the MS patients under statin therapy (15.20 ± 0.15 g.dL⁻¹ NaCl) were not significantly different from those of volunteers in the control group, although they had been significantly higher than those of MS patients without use of statins. **[Conclusions]** The carriers of MS without use of statin showed erythrocytes less stable against hypotonic shock and action of ethanol than the control group. The use of statins increased the stability of erythrocytes against ethanol in the MS patients, making it similar to the RBC stability of the volunteers without the disease. But the use of statins did not increase osmotic stability of the erythrocyte membrane against hypotonicity in such a way to make it similar to the membrane stability of the volunteers without the disease. These findings are important and reflect the homeostatic conditions in the erythrocytes membranes by the moment of their evaluation. This could be merely a consequence of changes in lifestyle associated with the development of the disease, but could also be associated with a lifestyle that may have implications in the development of MS. The reasons for believing in the validity of the last hypothesis are discussed.

Key-words: multiple sclerosis, simvastatin, cholesterol, membrane, erythrocyte, stability

INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é a doença que mais freqüentemente causa incapacidade neurológica nos indivíduos entre o início e a metade da idade adulta, sendo mais freqüente no sexo feminino do que no masculino [HAUSER; GOODKIN, 1998].

Ela é uma doença degenerativa caracterizada por defeitos na membrana de mielina das células neurais, que parece desenvolver-se por mecanismos oxidativos, inflamatórios e autoimunes [HAIRE, 1977; KNIGHT, 1977; SELLNER et al., 2008c] em indivíduos geneticamente vulneráveis, sob a influência de fatores ambientais associados à alimentação [SWANK et al., 1952; SCHWARZ; LEWELING, 2005].

É possível que a EM esteja associada com alguma desproporção na natureza de ácidos graxos de lipídeos de membrana, pois altas razões de ω 6-PUFA/ ω 3-PUFA estão associados a exacerbação de inflamação e autoimunidade [CALDER, 1996; CALDER, 2005; KOCH et al., 2006; SCHWAB, SERHAN, 2006], o que envolveria a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) à patogénia da doença, uma vez que ela é responsável pela síntese de eicosanóides associados ao desencadeamento da inflamação e da imunidade. Como os ácidos graxos polinsaturados são muito vulneráveis à oxidação, o que pode gerar desproporção na natureza de ácidos graxos de membrana, isso significa que a composição de membrana contém elementos associados à tríade oxidação-inflamação-autoimunidade, que parece estar envolvida na patogénese da EM.

O exercício das funções de membrana numa base fisiológica depende da homeostase estrutural desses complexos biológicos.

Tanto o excesso quanto a falta de fluidez são características indesejáveis, que podem contribuir para perda da estabilidade e aceleração da destruição de uma membrana. Há um ponto de fluidez crítica que congrega duas propriedades importantes da membrana, a funcionalidade e a estabilidade. Para manter essa fluidez crítica, as células usam vários mecanismos homeostáticos.

Esses mecanismos incluem agentes ambientais como os solutos que estimulam a própria organização da membrana (tais como água e osmólitos) e os

solutos que podem promover sua desorganização (tais como uréia e etanol) [CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008].

Os lipídeos circulantes são também agentes ambientais importantes. A natureza qualitativa desses lipídeos é um elemento chave na homeostase estrutural da membrana.

O balanço na composição dos lipídeos de membrana é o principal mecanismo homeostático que controla sua fluidez. Um menor conteúdo de colesterol e a presença de mais ácidos graxos insaturados do que saturados nos fosfolipídeos são características que elevam a fluidez da membrana. Pelo contrário, a elevação no conteúdo de colesterol e a presença de menos ácidos graxos insaturados do que saturados nos fosfolipídeos são características que diminuem a fluidez da membrana [SINENSKY, 1974].

Quebra da homeostase de membrana ocorre em várias desordens genéticas, como a distrofia muscular de Duchenne [BUTTERFIELD; MARKESBERY, 1980] e a miotonia hereditária [SWIFT et al., 1980], situações em que há fluidez anormal na membrana de eritrócitos.

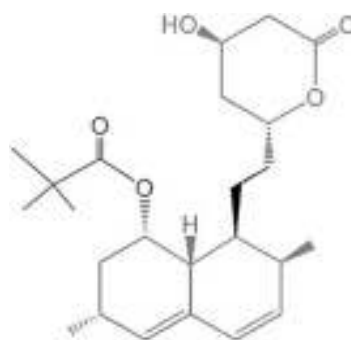
Mas a quebra dessa homeostase pode ser promovida por elevações crônicas nos níveis de LDL-C e diminuição nos níveis de HDL-C, com desencadeamento de eventos degenerativos que devem ser importantes nas alterações no comportamento de membrana ligadas ao envelhecimento [PENHA-SILVA et al., 2007] e às doenças degenerativas como a aterosclerose [ROSENSON et al., 1998] e a esclerose múltipla (EM) [NUE, 1983; NAVARRO; SEGURA, 1988; ALBERTS et al., 1992], situações que também estão associadas à tríade oxidação-inflamação-autoimunidade.

A agregação da influência do excesso de colesterol na quebra da homeostase estrutural de membrana associada à tríade oxidação-inflamação-autoimunidade traz à cena as estatinas, que congregam ações hipocolesterolemiantes com propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e imunomoduladoras [SELLNER et al., 2008], que seriam desejáveis no tratamento da EM, em função dos mecanismos postulados de desenvolvimento da doença.

Realmente, o uso de estatinas no tratamento da EM está em fase de estudos e apresenta expectativas promissoras [OLIVEIRA et al., 2007]. O estudo

das influências da EM e das estatinas no comportamento de membranas poderia agregar algum entendimento neste complexo sistema.

A sinvastatina é um tipo de estatina derivada de fungos, com característica hidrofóbica e comumente administrada na forma lactona inativa, a qual necessita ser metabolizada pelo fígado antes da ativação [CORSINI et al., 1999; BLUMENTHAL, 2000].



Sinvastatina

A porcentagem de dose dessa droga retida pelo fígado pode chegar a 80%, ou seja, a sua biodisponibilidade é de aproximadamente 5%. O metabolismo hepático da sinvastatina segue o caminho do citocromo P450 (CYP 3A4) [BLUM, 1994].

A necessidade de elucidar os processos envolvidos na relação entre causas e efeitos da EM no organismo humano exige a ampliação das pesquisas na área [KENEALY et al., 2003; SCHWARZ; LEWELING, 2005; GILLI et al., 2006], buscando encontrar implicações da doença em outras células, além das neurais [CUNNANE et al., 1989; DUARTE et al., 1994], que possam também ter sofrido quebra dos mecanismos promotores da homeostase estrutural de membrana.

Em função de experiências prévias no estudo do comportamento de membranas de eritrócitos [GOUVÊA-E-SILVA, 2006, CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2007; DE FREITAS et al., 2008; PENHA-SILVA et al., 2008], o presente trabalho estuda a influência de uma estatina típica, a Sinvastatina[®] [BLUM, 1994; CORSINI et al., 1999; BLUMENTHAL, 2000], sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos de portadoras de EM.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia e as 22 voluntárias participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A amostra foi recrutada dentre as pacientes que fazem o acompanhamento da EM no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), sem nenhum problema patológico além da doença em questão. Ela foi constituída de 16 mulheres portadoras de esclerose múltipla, na faixa etária 26 a 58 anos, sendo que neste grupo havia 6 mulheres que faziam tratamento com 20 mg de sinvastatina por dia, por $2,66 \pm 1,03$ anos (**grupo de portadoras de EM sob uso de estatina**), e outras 10 mulheres que não faziam uso de estatina (**grupo de portadoras de EM sem uso de estatina**). O **grupo controle**, foi constituído por 6 mulheres saudáveis, com IMC e idades (28 a 56 anos) equiparáveis ao grupo com EM, todas sem o uso de medicações e sem consumo crônico de bebida alcoólica.

Coleta das amostras de sangue humano

O sangue foi coletado, por punção venosa, em tubos evacuados (5 mL) contendo o anticoagulante K₄EDTA a 1 g.dL⁻¹. O procedimento da coleta ocorreu no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia após jejum noturno de 8 a 12 horas.

Determinação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos em NaCl

A cada microtubo de uma bateria contendo 1 mL de soluções com concentrações entre 0 a 0,9% de NaCl, pré-incubados a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 10 µL de sangue. Após homogeneização e incubação dos tubos por 20 minutos a 37 °C, eles foram centrifugados a 3000xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes, então, foram avaliados quanto à densidade óptica em 540 nm (**A₅₄₀**) em espectrofotômetro. Os experimentos foram conduzidos com cada tubo em duplicata. A fragilidade osmótica foi expressa em porcentagem de hemólise absoluta da seguinte forma:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A}{A_{\max.}} \times 100\% \quad (1),$$

na qual **A** é a densidade óptica ou absorvância do sobrenadante em 540 nm e **A_{max}** é a absorvância máxima encontrada naquele comprimento de onda.

A dependência da porcentagem de hemólise com a concentração de NaCl foi ajustada a uma linha de regressão sigmoideal de acordo com a equação de Boltzmann:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(S-H_{50})/dS}} + A_{\max} \quad (2),$$

onde **A_{min}** e **A_{max}** representam as porcentagens mínima e máxima de hemólise, **S** é a concentração de cloreto de sódio, **H₅₀** é a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise, e **dS** a amplitude da concentração do sal responsável pela transição da lise dos eritrócitos.

Determinação da estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol

Em uma série de baterias de microtubos com 1 mL de etanol em concentrações variáveis entre 2 e 24 mL de etanol por dL de solução em NaCl a 0,9 g.dL⁻¹, pré-incubados a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 10 µL de sangue. Posteriormente à homogeneização, os tubos foram incubados na mesma temperatura por 20 minutos, sendo então centrifugados a 3000xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram avaliados quanto à densidade óptica em 540 nm em espectrofotômetro. Os valores de absorvância foram expressos em porcentagem de hemólise absoluta de acordo com a fórmula (1).

A determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos foi feita por regressão não-linear com base na equação de Boltzmann:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(D-D_{50})/dD}} + A_{\max} \quad (3),$$

em que **A_{min}** e **A_{max}** representam os valores mínimo e máximo de **A₅₄₀**, **D** é a concentração de etanol, **D₅₀** representa a concentração de etanol que provoca 50% de hemólise e **dD** é a amplitude da variação da concentração de etanol na transição sigmoideal entre **A₁** e **A₂**.

Determinação de variáveis hematológicas e bioquímicas

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

As variáveis hematológicas foram determinadas com a utilização do equipamento Cell-Dyn 3700. Trata-se de um analisador hematológico automotivo onde se coloca a amostra de sangue do paciente para a dosagem de leucócitos e hemácias por diferença de potencial elétrico, utilizando diferentes canais com impedância específica, além de agregar a essa função básica os recursos de citometria de fluxo, citoquímica e citologia diferencial com capacidade de distinguir células imaturas.

Os valores de referência (população feminina adulta) utilizados foram aqueles considerados pelo Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU: hemácias (4,3-5,0 milhões/mm³); hemoglobina (12,0-15,5 g%); hematócrito (35-45%); VCM (82-98 fL); colesterol total [ótimo < 200 e alto > 239 mg/dL]; LDL-C (ótimo < 100 e alto > 160 mg/dL); VLDL-C (ótimo < 100 e alto > 160 mg/dL); HDL-C (baixo < 40 e desejável > 40 mg/dL) e triglicérides (ótimo < 150 e alto > 200 mg/dL).

Edição e análises estatísticas dos dados experimentais

As edições dos dados e análises estatísticas foram executadas com a utilização do aplicativo OriginPro 8.0 (Microcal, Northampton, Massachusetts, USA). A análise da linha de regressão sigmoidal foi considerada significativa quando p era menor que 0,05. A comparação dos dados foi feita por análise de variância, com utilização do pós-teste de Tukey.

RESULTADOS

Os escores na escala de incapacidade (EDSS) e algumas variáveis hematológicas e bioquímicas de portadores de esclerose em e sem tratamento com sinvastatina foram comparados na **Tabela 2.1**. Os escores de EDSS e as variáveis hematológicas não foram significativamente diferentes entre os grupos. Mas diferenças significantes foram observadas nos níveis de colesterol total e LDL-colesterol.

A **Figura 2.1** apresenta curvas de ajustes simultâneos da fragilidade osmótica de eritrócitos das voluntárias do grupo controle e dos grupos de portadoras de esclerose múltipla com e sem uso de sinvastatina.

A **Figura 2.2** apresenta curvas de ajustes simultâneos da estabilidade contra a ação caotrópica de etanol de eritrócitos das voluntárias do grupo controle e dos grupos de portadoras de esclerose múltipla com e sem uso de sinvastatina.

Os ajustes simultâneos das figuras anteriores foram mostrados apenas a título de ilustrar as curvas de estabilidade contra etanol e de fragilidade osmótica das pacientes de cada um dos grupos. As amostras de sangue de cada uma das pacientes foi alvo de análise individualizada, com determinação de seus respectivos valores de H_{50} e de D_{50} .

Os valores médios desses parâmetros foram mostrados na **Tabela 2.2**, juntamente com os resultados das análises de comparação estatística por ANOVA, utilizando pós-teste ('post-hoc') de Tukey.

Os valores de H_{50} das portadoras de EM sem uso de estatina ($0,472 \pm 0,013$ g.dL⁻¹ NaCl) foram significativamente maiores do que aqueles das voluntárias do grupo controle ($0,427 \pm 0,015$ g.dL⁻¹ NaCl). Os valores de H_{50} das portadoras de EM com uso de estatina ($0,457 \pm 0,013$ g.dL⁻¹ NaCl) declinaram (ainda que sem significância estatística) em relação à portadoras de EM sem uso de estatina, sem se igualar aos valores de H_{50} das voluntárias do grupo controle.

Por outro lado, os valores de D_{50} das portadoras de EM sem uso de estatina ($13,87 \pm 0,74$ % v/v etanol) foram significativamente menores que os das voluntárias do grupo controle ($15,38 \pm 0,24$ g.dL⁻¹). Os valores de D_{50} das portadoras de esclerose múltipla sob uso de estatina ($15,20 \pm 0,15$ g.dL⁻¹) não

foram significativamente diferentes daqueles das voluntárias do grupo controle, embora tenham sido significativamente maiores do que aqueles das portadoras de EM sem uso de estatina.

A **Figura 2.3** apresenta os mecanismos comuns que afetariam a homeostase estrutural de membranas em células neurais e em eritrócitos de portadores de EM.

Tabela 2.1. Comparação de escores para escala de incapacidade (EDSS) e algumas variáveis hematológicas e bioquímicas entre portadores de EM em e sem tratamento com sinvastatina (média $\pm$ dp).

Parâmetros	Em tratamento (n=6)	Sem tratamento (n=10)	p
EDSS (1-10)	3,83 $\pm$ 0,82	4,25 $\pm$ 0,92	
Hemácias (milhões/mm³)	4,58 $\pm$ 0,38	4,67 $\pm$ 0,38	
Hemoglobina (g%)	14,03 $\pm$ 0,76	14,50 $\pm$ 0,96	
Hematócrito (%)	41,67 $\pm$ 2,50	43,20 $\pm$ 2,45	
VCM (fL)	91,72 $\pm$ 2,62	90,10 $\pm$ 1,09	
Colesterol total (mg/dL)	146,12 $\pm$ 25,28	206,11 $\pm$ 62,69	*
Triglicérides (mg/dL)	123,83 $\pm$ 20,57	114,55 $\pm$ 29,48	
HDL-C (mg/dL)	51,33 $\pm$ 10,14	49,07 $\pm$ 11,65	
VLDL-C (mg/dL)	25,95 $\pm$ 4,79	25,07 $\pm$ 11,088	
LDL-C (mg/dL)	77,43 $\pm$ 16,79	118,83 $\pm$ 40,59	*

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (ANOVA).

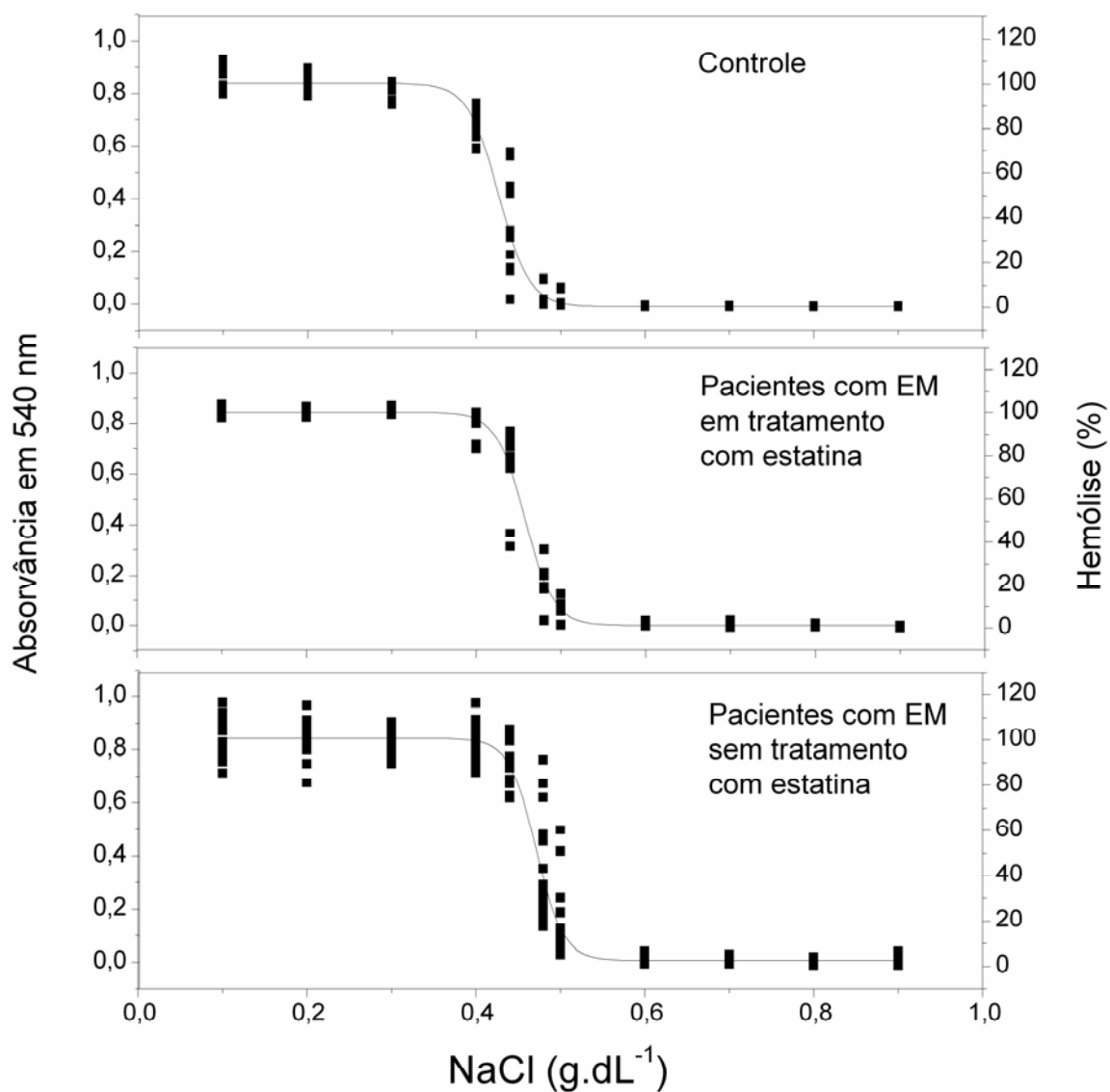


Figura 2.1. Ajuste simultâneo das curvas de fragilidade osmótica dos eritrócitos de voluntárias do grupo controle e dos grupos de portadoras de esclerose múltipla em uso e sem uso de sinvastatina. H_{50} representa a concentração de NaCl capaz de promover a lise de 50% dos eritrócitos.

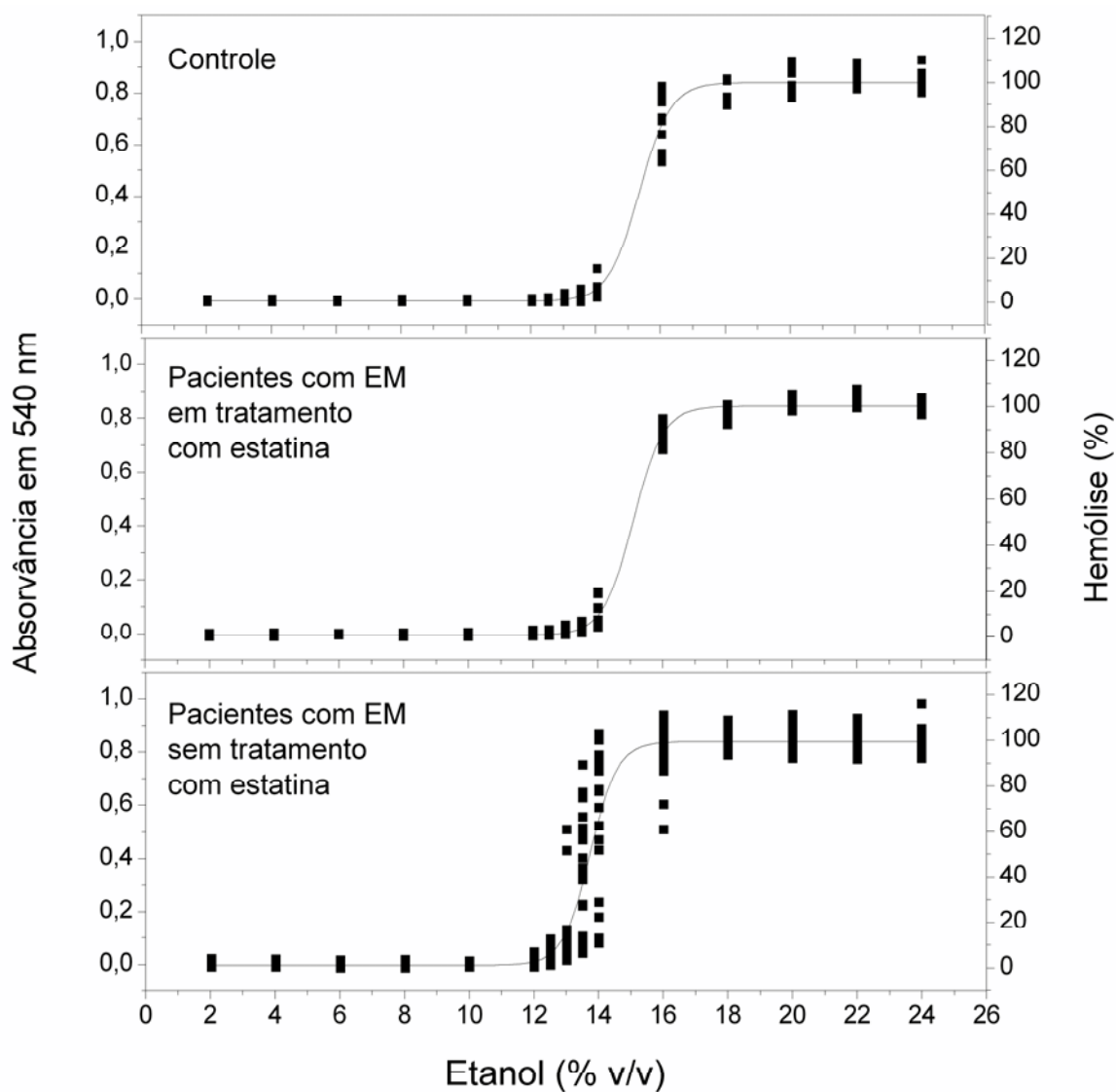


Figura 2.2. Ajuste simultâneo das curvas de estabilidade de eritrócitos contra a ação de etanol das voluntárias do grupo controle e dos grupos de portadoras de esclerose múltipla sem e com tratamento com sinvastatina. D_{50} representa a concentração de etanol capaz de promover lise de 50% dos eritrócitos.

Tabela 2.2. Comparação dos valores de **H₅₀** e **D₅₀** entre o grupo controle e os grupos de portadores de EM em e sem tratamento com sinvastatina (média $\pm$ dp).

Variáveis	Controle (n=6)	EM em tratamento (n=6)	p	EM sem tratamento (n=10)	p
H₅₀ (g/dL NaCl)	0,427 $\pm$ 0,015	0,457 $\pm$ 0,013	*	0,472 $\pm$ 0,013	*
D₅₀ (% v/v etanol)	15,38 $\pm$ 0,24	15,20 $\pm$ 0,15	§	13,87 $\pm$ 0,74	*§

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (teste de Tukey)

§ Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de portadores de esclerose múltipla em tratamento e sem tratamento (teste de Tukey)

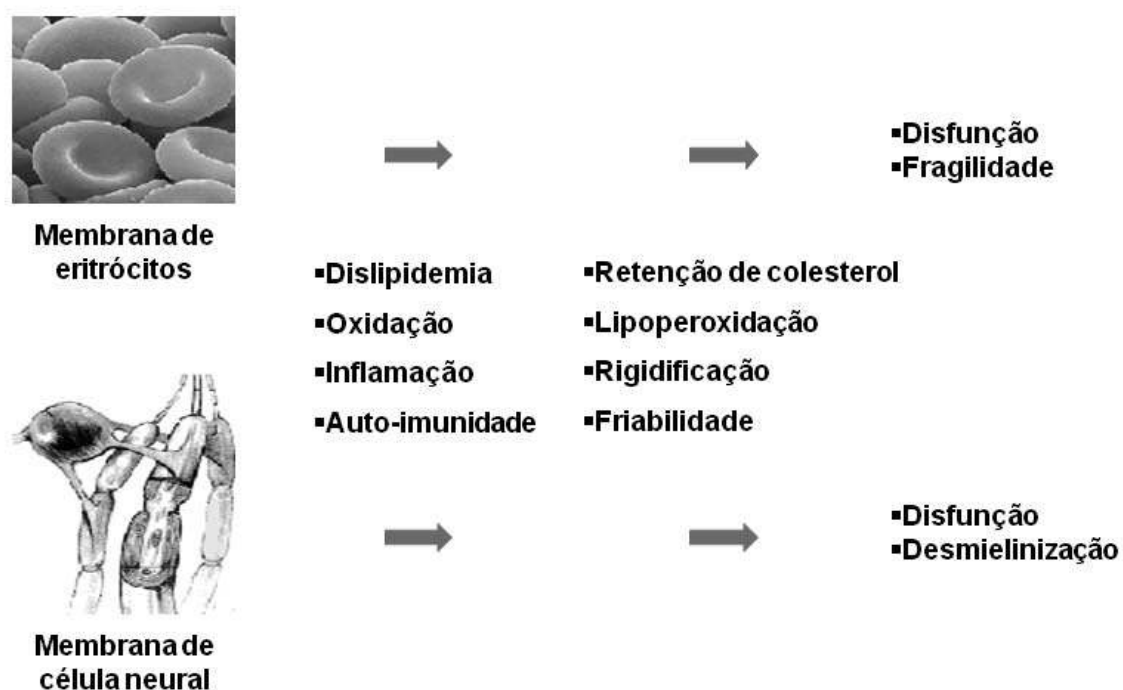


Figura 2.3. Mecanismos comuns que afetariam a homeostase estrutural de membranas em células neurais e eritrócitos em portadores de esclerose múltipla.

DISCUSSÃO

Os dados da **Tabela 2.2** mostram que as portadoras de EM não tratadas com estatina tiveram valores de H_{50} significativamente maiores do que as voluntárias do grupo controle. Isto significa que concentrações mais altas de NaCl foram suficientes para produzir hemólise, ou seja, que seus eritrócitos foram osmoticamente menos resistentes.

De fato, [Caspary e colaboradores \[1967\]](#) também relataram aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos durante a fase aguda da doença. [Kurantsin-Mills e colaboradores \[1982\]](#) encontraram ausência de alteração em pacientes externos e aumento da fragilidade osmótica em pacientes internos. Aumento da fragilidade mecânica de eritrócitos também foi relatado por [Schauf e colaboradores \[1980\]](#).

Como os valores de D_{50} foram significativamente menores para as portadoras de EM do que para as pacientes sem a doença (**Tabela 2.2**), isso significa que seus eritrócitos foram menos estáveis contra a ação caotrópica do etanol, de tal forma que esse resultado confirma essa característica no grupo de voluntárias desse estudo.

Além disso, o uso de estatina foi associado a um aumento nos valores de D_{50} , o que significa um aumento na estabilidade de membrana contra etanol nas portadoras de esclerose múltipla. Mas nas voluntárias com a doença no grupo tratado com estatina os valores de D_{50} não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação às voluntárias normais (**Tabela 2.2**). Esse resultado faz muito sentido, à luz da ação do colesterol na homeostase de membrana. Uma elevação no teor de colesterol é uma conhecida causa de diminuição na fluidez de membrana. Os eritrócitos são células particularmente sensíveis a modificações na concentração de colesterol no meio extracelular [[COOPER et al., 1975](#); [SCHICK](#); [SCHICK, 1985](#)]. Ele se acumula na membrana dessa célula, tornando-a mais rígida [[CHABANEL et al., 1983](#); [KOTER et al., 2002](#)]. O excesso de colesterol plasmático altera as propriedades dos eritrócitos e pode contribuir para hiperviscosidade sanguínea, diminuição do aporte de oxigênio e disfunção endotelial. É o colesterol da LDL que vai para a membrana celular [[MARTINEZ et al., 1996](#)], diminuindo a fluidez de membrana e a

deformabilidade do eritrócito [COOPER, 1977; MULLER et al., 1990; DWIGHT et al., 1996], o que acaba comprometendo as funções celulares [SINENSKY, 1974; CRIBIER et al., 1993].

Há evidências experimentais de que as estatinas melhoram a microcirculação sanguínea através de sua influência na viscosidade do sangue e na estrutura de membrana do eritrócito [MARTINEZ et al., 1996] e de que também melhoram a função endotelial [VAUGHAN et al., 1996], por aumentar a fluidez e diminuir a estabilidade de membrana, favorecendo assim a funcionalidade.

De fato, diminuição significativa no teor de colesterol de membrana foi associada a tratamento com lovastatina [MARTINEZ et al., 1996] e com pravastatina [LIJNEN et al., 1994].

Diminuição no teor de colesterol de membrana *deve ter sido determinante* no aumento na fluidez da membrana do eritrócito observado por Levy e colaboradores [1992] e por Martinez e colaboradores [1996] depois do tratamento com lovastatina, embora não tenha sido observada nenhuma modificação na fluidez da membrana do eritrócito após a utilização de sinvastatina por alguns autores [Van DOORMAAL et al., 1989; DWIGHT et al., 1996]. Entretanto, outro grupo de pesquisadores relatou um curso com duas fases no tratamento com sinvastatina: diminuição da lipidemia até o final do primeiro mês de tratamento e aumento na fluidez da membrana do eritrócito após quatro a seis meses do decorrer da terapia [RABINI et al., 1993].

Como as pacientes do presente estudo estavam sob tratamento com estatina por $2,66 \pm 1,03$ anos, elas seguramente já deveriam ter atingido a fase de aumento da fluidez de membrana, o que implicaria em aumento de estabilidade de membrana contra etanol, como de fato foi observado nas portadoras de EM tratadas com estatina [Tabela 2.2].

Essa alteração de comportamento coincide com os efeitos observados na colesterolemia no grupo de pacientes com EM que estava sob tratamento com estatina. Como seria de se esperar, o teor de colesterol total e de LDL-colesterol declinou em bases estatisticamente significantes com o tratamento (Tabela 2.1), o que certamente diminuiria a disponibilidade de colesterol para a captação por tecidos extra-hepáticos. Entretanto, esse efeito sobre a estabilidade de membrana contra a ação do etanol observado no grupo de pacientes tratado com estatina

não foi também observado em relação ao choque hipotônico. Embora os valores de H_{50} tenham sido maiores no grupo sem tratamento com estatina, essa diferença não chegou a ser significativa em comparação ao grupo em tratamento (**Tabela 2.2**). Esse comportamento pode ser consequência da pequena dimensão da população, mas também de alguma diferença no mecanismo da lise promovida pelo etanol em relação ao choque hipotônico. O etanol é um reconhecido agente desnaturante de proteínas [FONSECA et al., 2006], mecanismo que não está envolvido na lise por choque hipotônico, situação em que os eritrócitos absorvem água, aumentam de volume e vão ter ruptura de membrana com base em suas limitações de elasticidade [JAIN, 1973].

A hipercolesterolemia observada nas portadoras de EM (**Tabela 2.1**) neste trabalho está de acordo com dados da literatura. Anormalidade no metabolismo de lipídios não está limitada somente à bainha de mielina, mas afeta também o perfil de lipídios plasmáticos [CUNNANE et al., 1989; ALBERTS et al., 1992; SANDYK; AWERBUCH, 1994; OSMAN et al., 1995; COMOGLU et al., 2004]. A própria desmielinização das placas de EM libera lipídios no organismo dos pacientes. A concentração aumentada de colesterol, ácidos graxos, sorbitol, frutose e ácido glutâmico no fluido cérebro-espinhal em portadores de EM seria consequência da desmielinização [NUE et al., 1982; NUE, 1983; NAVARRO; SEGURA, 1988; CUNNANE et al., 1989; CHERAYIL, 1990; ALBERTS et al., 1992].

Os resultados observados neste trabalho parecem ser expressivos e refletirem uma característica das portadoras de EM. Os comportamentos descritos não podem ser reputados a diferenças entre os parâmetros hematológicos (quantidade de hemácias, hemoglobina, hematócrito e VCM) entre as portadoras de EM e as voluntárias sem a doença, pois elas não foram estatisticamente significantes (**Tabela 2.1**).

Embora a ocorrência de macrocitose durante a fase aguda da doença tenha sido relatada por Caspary e colaboradores [1967], essa característica não foi observada por Grasso e colaboradores [1999].

Outro fator que poderia contribuir para alterações no comportamento de membrana na EM é o aumento do estresse oxidativo no organismo desses indivíduos. Marcadores de oxidação foram encontrados elevados no plasma de

pacientes com EM [NAIDOO; KNAPP, 1992; GLABINSKI et al., 1993; BESLER; COMOGLU, 2003] e no SNC de animais experimentais com um modelo de doença desmielinizante auto-imune denominada encefalomielite auto-imune experimental (EAE) [MacMICKING et al., 1992]. Em portadores de EM, há envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) também na promoção de danos ao DNA, o que seguramente está associado à neurodegeneração [VLADIMIROVA et al., 1999; LU et al., 2000].

Produtos da peroxidação lipídica estão presentes em vários processos inflamatórios [KWIATKOWSHA et al., 1999]. Durante a inflamação, os macrófagos promovem ataque oxidativo e podem danificar as células ao seu redor [BESLER; COMOGLU, 2003]. Na EM é bem caracterizada a presença no SNC de infiltrações inflamatórias que consistem principalmente de linfócitos e macrófagos [FROHMAN et al., 2006; LEV et al., 2007; SCHREIBELT et al., 2007]. Esse ataque oxidativo causa alterações na organização estrutural e funcional das membranas celulares, incluindo diminuição na fluidez da membrana, aumento na sua permeabilidade, inativação de enzimas e decréscimo no teor de ácidos graxos essenciais [KOPFF et al., 1993; van GINKEL; SEVANI, 1994]. Estudos mostram que a formação de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da lipoperoxidação, está associada à rigidificação de membrana de eritrócitos, diminuindo assim sua capacidade de sofrer alterações morfológicas [PFAFFEROTT et al., 1982].

Uma propriedade importante das estatinas é seu efeito antioxidante [AVIRAM et al., 1998b]. No trabalho de Koter e colaboradores [2002], atorvastatina induziu uma diminuição na peroxidação lipídica em pacientes com hipercolesterolemia, reduzindo-a ao valor do grupo controle. Além disso, Shukla e colaboradores [1977] encontraram uma diminuição significativa na atividade da glutathione peroxidase de eritrócitos em portadores de EM, o que diminui a defesa antioxidante da célula. Sendo assim, o grupo de pacientes que utilizou sinvastatina em nosso trabalho provavelmente também teve diminuição da produção de ROS em seu organismo, levando a uma melhora na homeostase de membrana de seus eritrócitos em comparação aos portadores de EM sem o uso de estatinas.

Apesar dos benefícios até então relatados, os riscos do uso de estatinas devem ser analisados pelos profissionais de saúde. A redução da concentração de colesterol no organismo deve ser estudada com cautela e aplicada em casos de real necessidade, como dislipidemias. Um número de estudos demonstra uma correlação positiva entre baixos níveis séricos de colesterol e mortes devido a causas não-cardiovasculares, dentre elas câncer, acidente, suicídio e depressão [HERRINTON; FRIEDMAN, 1995].

Mas aumento na lipídemia em organismos humanos e de animais experimentais está relacionado a aumento na sinalização inflamatória e oxidante [MATTSON et al., 2003; WHITE et al., 2009] e na ocorrência de doenças neurodegenerativas [JOSEPH et al., 1998]. De fato, quebra na homeostase do colesterol pode ser a causa primária de um número de aspectos da neurodegeneração [Koudinov; Koudinova, 2005] e certamente se relaciona com a diminuição da estabilidade de eritrócitos na EM.

Sena e colaboradores [1985] relataram níveis gerais de mielina diminuídos e alteração na composição de ácidos graxos de membrana de mielina em camundongos geneticamente obesos. Nesse contexto, a hipercolesterolemia poderia realmente alterar a dinâmica da membrana nas células neurais e em outras células em humanos, como nos eritrócitos.

As evidências discutidas concordam com a idéia de que a conjunção de fatores (hipercolesterolemia, oxidação, inflamação e autoimunidade) determinantes da EM também estaria envolvida na degeneração de membrana dos eritrócitos (**Figura 2.3**), em função de uma conjunção de razões que compreenderiam herança genética, alimentação e estilo de vida.

Trabalhos futuros poderão investigar os efeitos do exercício físico e da adequação nutricional sobre a esclerose múltipla no organismo humano.

CONCLUSÕES

As portadoras de EM que não faziam uso de sinvastatina apresentaram eritrócitos menos estáveis contra hipotonicidade e contra a ação do etanol que as voluntárias sem a doença. O uso da estatina elevou a estabilidade de eritrócitos contra etanol em portadoras de EM, tornando-a semelhante àquela das voluntárias sem a doença. Mas o uso de estatina não afetou a estabilidade de membrana dos eritrócitos contra hipotonicidade a ponto de torná-la semelhante à estabilidade de membrana das voluntárias sem a doença.

REFERÊNCIAS¹

ALBERTS, J.J.; MARCOVINA, S.M.; CHRISTENSEN, R.H. Lecithin cholesterol acyltransferase in human cerebrospinal fluid: Reduced level in patients with multiple sclerosis and evidence of direct synthesis in the brain. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v.22, p.169-172, 1992.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C.L.; NEWTON, R.S. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. **Atherosclerosis**, v.138, p.271-280, 1998b.

BESLER, H.T.; COMOGLU, S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. **Nutritional Neuroscience**, v.6, p.189-196, 2003.

BLUM, C.B. Comparison of properties of four inhibitors on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **The American Journal of Cardiology**, v.73, p.3D-11D, 1994.

BLUMENTHAL, R.S. Statins: effective antiatherosclerotic therapy. **American Heart Journal**, v.139, p.577-583, 2000.

BUTTERFIELD, D.A.; MARKESBERY, W.R. Specificity of biophysical and biochemical alterations in erythrocyte membranes in neurological disorders. **Journal Neurological Sciences**, v. 47, p. 261-271, 1980.

CALDER, P.C. Effects of fatty acids and dietary lipids of the immune system. **The Proceedings of the nutrition society**, v.55, p.127-150, 1996.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v.33, n.2, p.423-427, 2005.

CASPARY, E.A.; SEWELL, F.; FIELD, E.J. Red blood cell fragility in multiple sclerosis. **British Medical Journal**, v.2, p. 610-611, 1967.

CHABANEL, A.; FLAMM, M.; SUNG, K.L.; LEE, M.M.; SCHACHTER, S.L.; CHIEN, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophysical Journal**, v.44, p.171-176, 1983.

CHERAYIL GD. Effects of in vitro hyperthermia on fatty acids of red blood cells and plasma lipids from patients with multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v.95, p.141-151, 1990.

¹SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FRANÇA, M.M. **Guia para normalização de trabalhos técnicos científicos**: projetos de pesquisa, trabalhos acadêmicos, dissertações e teses. 5.ed., Uberlândia: EDUFU, 2006.

COMOGLU, S.; YARDIMCI, S.; OKCU, Z. Body fat distribution and plasma lipid profiles of patients with multiple sclerosis. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v.34, p.43-48, 2004.

COOPER, R.A.; ARNER, E.C.; WILEY, J.S.; SHATTIL, J.S. Modifications of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersion. **The Journal of Clinical Investigation**, v.55, 115-125, 1975

COOPER, R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in pathogenesis of disease. **The New England Journal of Medicine**, v.297, p.371-377, 1977.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v.84, p.413-428, 1999.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids**, v.48, p. 24-32, 1993.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

CUNNANE, S.C.; HO, S.Y.; DORE-DUFFY, P.; ELLS, K.R.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acid and lipid profiles in plasma and erythrocytes in patients with multiple sclerosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.50, p.801-806, 1989.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M.; HUSS, J.C.C.; DE SOUZA, T.M.T.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.219-224, 2008.

DUARTE, F.; PITTELLA, J.E.H.; AVILA, C.M.; ROSEMBERG, S.; HAHN, M.D.; CHIMELLI, L.; PAOLA, D. Sistema Nervoso. BOGLIOLO, L. (Ed.) **Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 723-825.

DWIGHT, J.F.; MENDES-RIBEIRO A.C.; HENDRY, B.M. Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. **Clinica Chimica Acta**, v. 256, p.53-63, 1996.

FONSECA, L.C., CORRÊA, N.C.R., GARROTE-FILHO, M.S., CUNHA, C.C., PENHA-SILVA, N. Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

FROHMAN, E.M.; RACKE, M.K.; RAINE, C.S. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v.354, p.942-955, 2006.

GILLI, F.; HOFFMANN, F.; SALA, A.; MARNETTO, F.; CALDANO, M.; VALENTINO, P.; KAPPOS, L.; BERTOLOTTO, A.; LINDBERG, R.L.P. Qualitative

and quantitative analysis of antibody response against IFN β in patients with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v.12, p. 738-746, 2006.

GLABINSKI, A.; TAWSEK, N.S.; BARTOSZ, G. Increased generation of superoxide radicals in the blood of MS patients. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 88, p.174-177, 1993.

GOUVÊA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**, 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

GRASSO, M.G.; COLLELUORI, A.; MILLEFIORINI, E.; POZZILLI, C. Lack of association between macrocytosis and multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 55, p. 1096-1097, 1992.

HAIRE, M. Significance of vírus antibodies in multiple sclerosis. **British Medical Bulletin**, v.33, p. 40-44, 1977.

HAUSER, S.L.; GOODKIN, D.E. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. FAUCI, A.D. et al. (Eds.) **Harrison's Principle of Internal Medicine**. 14 ed. New York: McGraw Hill, 1998. p. 2452-2461.

HERRINTON, L.J.; FRIEDMAN, G.D. Serum cholesterol concentration and risk of brain cancer. **British Medical Journal**, v.310, p.367-368, 1995.

JAIN, N.C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**. v. 63, p. 411-423, 1973.

JOSEPH, J.A., DENISOVA, N., FISHER, D., BICKFORD, P., PRIOR, R., CAO, G. Age-related neurodegeneration and oxidative stress: putative nutritional intervention. **Neurologic Clinics**, 16, 747–755. 1998.

KENEALY, S.J.; PERICAK-VANCE, M.A.; HAINES, J.L. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.143, p.7-12, 2003.

KNIGHT, S. Cellular immunity in multiple sclerosis. **British Medical Bulletin**, v. 33, p. 45-50, 1977.

KOCH, M.; RAMSARANSING, G.S.M.; FOKKEMA, M.R.; HEERSEMA, D.J.; KEYSER, J.D. Erythrocyte membrane fatty acids in benign and progressive forms of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Science**, v.244, p. 123-26, 2006.

KOPFF, M.; ZAKRZEWSKA, I.; CZERNICKI, J.; KLEM, J.; STRZELCZYK, M. Red blood cell adenosine deaminase activity in multiple sclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v.214, p.97-101, 1993.

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.58, p.501-506, 2002.

KOUDINOV, A.R.; KOUDINOVA, N.V. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. **Journal of the Neurological Sciences**, v.229-230, p.233-240, 2005.

KURANTSIN-MILLS, J.; SAMJI, N.; MOSCARELLO, M.A.; BOGGS, J.M. Comparison of membrane structure, osmotic fragility, and morphology of multiple sclerosis and normal erythrocytes. **Neurochemical Research**, v.7, p. 1523-1540, 1982.

KWIATKOWSHA, S.; PIASECKA, G.; ZIEBA, M.; PIOTROWSKI, W.; NOWAK, D. Increased serum concentrations of conjugated dienes and malondialdehyde in patients with pulmonary tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 93, p. 272-76, 1999.

LEV, N.; GILGUN-SHERKI, Y.; OFFEN, D.; MELAMED, E. Chapter 13: The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: current state. In: QURESHI, G.A.; PARVEZ, S.H. (Eds.) **Oxidative stress and Neurodegenerative disorders**. Elsevier, 2007, p.283-295.

LEVY, Y.; LEIBOWITZ, R.; AVIRAM, M.; BROOK, J.G.; COGAN, U. Reduction of plasma cholesterol by lovastatin normalizes erythrocyte membrane fluidity in patients with severe hypercholesterolaemia. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.34, p.427-430, 1992.

LIJNEN, P.; CELIS, H.; FAGARD, R.; STAESSEN, J.; AMERY, A. Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport system. **Journal of Hypertension**, v.12, p.59-64, 1994.

LU, F.; SELAK, M.; O'CONNOR, J.; CROUL, S.; LORENZANA, C.; BUTUNOI, C.; KALMAN, B. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. **Journal of Neuroscience**, v.177, p.95-103, 2000.

MacMICKING, J.D.; WILLENBORG, D.O.; WEIDEMANN, M.J.; ROCKETT, K.A.; COWDEN, W.B. Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.176, p.303–307, 1992.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; MARTI, R.; GIL, L.; LUCH, J.; CARMENA, R., AZNAR, J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and haemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. **Thrombosis Research**, v.83, p.375-388, 1996.

MATTSON, M.P.; DUAN, W.; GUO, Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Neurochemistry**, v.84, p.417-431, 2003.

MULLER, S.; ZIEGLER, O.; DONNER, M.; DROUIN, P.; STOLTZ, J.F. Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, v.83, p.231-237, 1990.

NAIDOO, R.; KNAPP, M.L. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis. **Clinical Chemistry**, v.38, p.2449-2454, 1992.

NAVARRO, X.; SEGURA, R. Plasma lipids and their fatty acid composition in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.78, p.152-157, 1988.

NUE, I.S. PROSIEGEL, M.; PFAFENRATH, V. Platelet aggregation and multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.66, p.497-504, 1982.

NUE, I.S. Essential fatty acids in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, v.7, p.151-163, 1983.

OLIVEIRA, M.R.; SANTOS, D.F.; FENELON, S.B.; PENHA-SILVA, N. Uso de rosuvastatina em esclerose múltipla. **Revista Neurociências**, v.15, p.246-250, 2007.

OSMAN, I.; GAILLARD, O.; MEILLET, D.; BORDAS-FONFRÈDE, M.; GERVAIS, A.; SCHULLER, E.; DELATTRE, J.; LEGRAND, A. A sensitive time-resolved immunofluorometric assay for the measurement of apolipoprotein B in cerebrospinal fluid. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33: 53-58, 1995.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; DE FREITAS REIS, F.G.; HUSS, J.C.C.; DE SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.128, p. 444-49, 2007.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

PFAFFEROTT, C.; MEISELMAN, H.J.; HOCHSTEIN, P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. **Blood**, v. 59, p.12-15, 1982.

RABINI, R.A.; POLENTA, M.; STAFFOLANI, R.; TOCCHINI, M.; SIGNORI, R. TESTA, I., MAZZANTI, L. Effect of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors on the functional properties of erythrocytes membranes. **Experimental and Molecular Pathology**, v.59, p.51-57, 1993.

ROSENSON, R.S.; TANGNEY, C.C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. **Journal of the American Medical Association**, v.279, p.1643-1650, 1998.

SANDYK, R.; AWERBUCH, G.I. The relationship between melatonin secretion and serum cholesterol in patients with multiple sclerosis. **International Journal of Neuroscience**, v.76, p.81-86, 1994.

SCHAUF, C.L.; FRISCHER, H.; DAVIS, F.A. Mechanical fragility of erythrocytes in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 30, p. 323-325, 1980.

SCHICK, B.P.; SCHICK, P.K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 833, p.281-290, 1985.

SCHREIBELT, G.; van HORSSSEN, J; van ROSSUM, S; DIJKSTRA, C.D.; DRUKARCH, B.; VRIES, H. E. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. **Brain Research Review**, v.56, p.322-330, 2007.

SCHWAB, J.M.; SERHAN, C.N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, p.414-420, 2006.

SCHWARZ, S.; LEWELING, H. Multiple sclerosis and nutrition. **Multiple Sclerosis**, v.11, p.24-32, 2005.

SELLNER, J. ; GREEVE, I. ; FINDLING, O. ; GRANDGIRARD, D. ; LEIB, S.L. ; MATTLE, H.P. Atorvastatin does not alter serum levels of sCD95 and sCD95L in multiple sclerosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v.152, p. 280-284, 2008.

SELLNER, J.; GREEVE, I.; FINDLING, O. ; KAMM, C. P. ; MINTEN, C. ; ENGELHARDT, B. ; GRANDGIRARD, D. ; LEIB, S.L. ; MATTLE, H.P. Effect of interferon- β and atorvastatin on Th1/Th2 cytokines in multiple sclerosis. **Neurochemistry International**, v.53, p.17-21, 2008c.

SENA, A.; SARLIÈVE, L.L.; REBEL, G. Brain myelin of genetically obese mice. **Journal of Neurological Science**, v.68, p.233–243, 1985.

SHUKLA, V.K.S. ; JENSEN, G.E. ; CLAUSEN, J. Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 56, p. 542-550, 1977.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.71, p.522–525, 1974.

SWANK, R.L.; LERSTAD, O.; STROM, A.; BACKER, J. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. **The New England Journal of Medicine**, v.246, p. 722-728, 1952.

SWIFT, L.L.; ATKINSON, J.B.; PERKINS, K.C.; DALTON, L.R.; LEQUIRE, V.S. Electron paramagnetic resonance and saturation transfer. Electron paramagnetic resonance studies on erythrocytes from goats with and without heritable myotonia. **Journal of Membrane Biology**, v. 52, p. 165-172, p. 1980.

van DOORMAAL, J.J.; BOS, W.J.; MUSKIET, F.A.; DOORENBOS, H. Simvastatin influence linoleic acid metabolism. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, v.11, p.134-135, 1989.

van GINKEL, G.; SEVANIAN, A. Lipid peroxidation induced membrane structural alterations. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 273-88, 1994.

VAUGHAN, C.J.; MURPHY, M.B.; BUCKLEY, B.M. Statins do more than just lower cholesterol. **Lancet**, v. 348, p. 1079-1082, 1996.

VLADIMIROVA O., LU F. M., SHAWVER L.; KALMAN B., The activation of protein kinase C induces higher production of reactive oxygen species by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis than in controls. **Inflammation Research**, v.48, p.412-416, 1999.

WHITE, C.L.; PISTELL, P.J.; PURPERA, M.N.; GUPTA, S.; FERNANDEZ-KIM, S.; HISE, T.L.; KELLER, J.N.; INGRAM D.K.; MORRISON, C.D., BRUCE-KELLER A.J. Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: Contributions of maternal diet. **Neurobiology of Disease**, v.35, p.3-13, 2009.