



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

FREDERICO GOMES ALVES DE PAIVA

***ESCLEROSE MÚLTIPLA: UMA DOENÇA
PRIMARIAMENTE INFLAMATÓRIA OU
NEURODEGENERATIVA?***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

DR.^a LÍVIA SOUSA

DR.^a SÓNIA BATISTA

JANEIRO DE 2012

Esclerose Múltipla: uma doença primariamente inflamatória ou neurodegenerativa?

Frederico Gomes Alves de Paiva

fredpaiva87@hotmail.com

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Trabalho elaborado sob orientação da Dr.^a Lúvia Sousa¹ e co-orientação da Dr.^a Sónia Batista².

¹Chefe de Serviço, Serviço de Neurologia, Hospitais da Universidade de Coimbra. Responsável pela Consulta de Esclerose Múltipla dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

²Interna Doutoranda de Neurologia, Serviço de Neurologia, Hospitais da Universidade de Coimbra



Dissertação de Mestrado em Medicina

Artigo de Revisão

Janeiro 2012

Multiple Sclerosis: a primarily inflammatory or neurodegenerative disease?

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS | 2 |
| RESUMO | 4 |
| ABSTRACT..... | 6 |
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. MÉTODOS..... | 9 |
| 3. DESENVOLVIMENTO | 13 |
| 3.1. Tipos de lesões na EM | 13 |
| 3.1.1 LESÕES AGUDAS | 13 |
| 3.1.2 LESÕES CRÓNICAS ACTIVAS | 14 |
| 3.1.3. LESÕES CRÓNICAS INACTIVAS | 14 |
| 3.1.4. PLACAS “SOMBRA” | 14 |
| 3.2. A HETEROGENEIDADE E COMPLEXIDADE DA EM: CARACTERÍSTICAS DOS PROCESSOS INFLAMATÓRIO E NEURODEGENERATIVO. | 15 |
| 3.2.1. Inflamação: Papel de diferentes fenótipos celulares | 15 |
| 3.2.1.1. Linfócitos TCD4⁺ (ou T_{helper}) | 16 |
| 3.2.1.2. Linfócitos T CD8⁺ | 18 |
| 3.2.1.3. Linfócitos B | 19 |
| 3.2.1.4. Macrófagos/Microglia | 21 |
| 3.2.1.5. Células NK (Natural Killer) | 22 |
| 3.2.1.6. Astrócitos | 23 |
| 3.2.2. Neurodegeneração e perda axonal na EM | 24 |
| 3.2.2.1. LESÕES AGUDAS/CRÓNICAS ACTIVAS | 25 |
| 3.2.2.2. LESÕES CRÓNICAS INACTIVAS | 28 |
| 3.3. INFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO: PROCESSOS INDEPENDENTES? | 32 |
| 3.4. QUAL A VERDADEIRA PATOGÉNESE DA EM?: O PARADIGMA POR ESCLARECER. | 34 |
| 3.4.1. Inflamação: um possível mecanismo primário à luz de diversas etiologias | 34 |
| 3.4.1.1. Infecções | 36 |
| 3.4.1.2. Genética | 38 |
| 3.4.1.3. Modificações ambientais | 40 |
| 3.5. Neurodegeneração: uma nova perspectiva na fisiopatologia da EM? | 40 |
| 4. CONCLUSÃO | 46 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 48 |
| AGRADECIMENTOS..... | 59 |

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

APC - Célula Apresentadora de Antígeno

APP – Proteína Precursora da Amiloide

BHE – Barreira hemato-encefálica

CE – Células Endoteliais

CMV - Citomegalovírus

CNP - 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterase

EAE – Encefalite Auto-imune Experimental

EBNA - antígeno nuclear do EBV

EBV - Vírus Epstein-Barr

HERV - Retrovírus Endógeno Humano

HHV6 - Herpes Vírus 6

HSP – Proteína de Choque Térmico

ICAM - molécula de adesão intercelular

IL – interleucina

INF - Interferão

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

MAG – Glicoproteína Associada à Mielina

MHC - Complexo Major de Histocompatibilidade

NAA – Ácido N-Acetil Aspártico

NAWM – Substância Branca Aparentemente Normal

OD – oligodendrócitos

PCR – Reacção em cadeia

PLP - proteína proteolipídica

RM – Ressonância Magnética

SCI - Síndrome Clínico Isolado

SNC - Sistema Nervoso Central

Tc – Linfócitos T citotóxicos

TGF - Factor de Transformação do Crescimento

Th – Linfócitos T *helper*

TNF- α – Factor de Necrose Tumoral alfa

VCAM – Molécula de Adesão Celular Vascular

RESUMO

Objectivo: Os desenvolvimentos da genética, imunologia, patologia e técnicas de imagem têm permitido uma nova visão sobre o verdadeiro mecanismo inicial da Esclerose Múltipla (EM). Lesões que precedem as placas desmielinizantes, típicas desta doença que afecta o SNC, têm vindo a ser observadas, colocando a hipótese de uma oligodendropatia como causa inicial, contrariando a teoria inflamatória defendida pela grande maioria dos autores. Este trabalho pretende rever e apresentar as conclusões retiradas de pesquisas recentes de forma a tentar perceber o verdadeiro processo patológico que despoleta a EM.

Métodos: Foi realizada uma revisão sistemática através dos 5 níveis da Pirâmide de Haynes, excluindo apenas o primeiro nível, *Systems*, por ainda não ser uma ferramenta completamente desenvolvida. Equações que incluíram os termos *multiple sclerosis, inflammation, inflammatory, neurodegeneration, neurodegenerative e imunopathology* foram usadas em fontes como **UpToDate, Dynamed, Evidence Based Medicine, ACP Journal Club, Cochrane Library, PubMed e Medical Subject Headings**. De 971 artigos encontrados em toda a pesquisa, 158 foram seleccionados com base em vários critérios de selecção.

Resultados: Confirma-se a presença de um processo imune e degenerativo na EM, que podendo ser independentes, se envolvem num leque de possíveis etiologias que incluem genética, infecções, tóxicos, entre outras. Anormalidades nos oligodendrócitos e activação de microglia são observados em áreas do SNC aparentemente normais, antecipando em meses o aparecimento de lesões inflamatórias típicas da EM e o surgimento de sinais clínicos.

Conclusões: São necessários mais estudos que ultrapassem as dificuldades inerentes à caracterização desta patologia, como recolha de amostras e pesquisa de biomarcadores específicos. Contudo, são várias as pesquisas que apontam para um aparecimento precoce de lesões a que os autores chamam de pré-activas, surgidas antes do processo imune e que podem representar o mecanismo precursor da EM. A causa para a oligodendropatia observada

nestas lesões é, no entanto, ainda muito incerta, apesar de hipóteses como toxicidade pelo glutamato, disfunção mitocondrial e alterações oligodendrocíticas internas estarem a serem seriamente consideradas.

Palavras-chave: esclerose múltipla, imunopatologia, histopatologia, inflamação, neurodegeneração.

ABSTRACT

Objective: The development of genetics, immunology, pathology and imaging techniques have allowed new insight into the actual initial mechanism of Multiple Sclerosis (MS). Lesions that precede the demyelinating plaques, typical of this disease which affects the CNS, have been observed, placing the possibility of an oligodendropathy as the initial cause, opposing to the inflammatory theory advocated by most authors. This paper aims to review and present the conclusions from recent research and try to understand the true pathological process that triggers MS.

Methods: I performed a systematic review through the five levels of the Pyramid of Haynes, excluding only the first level, Systems, since it is a tool that it is not yet fully developed. Equations that included the terms *multiple sclerosis, inflammation, inflammatory, neurodegeneration, neurodegenerative and imunopathology* were used in sources such as **UpToDate, Dynamed, Evidence Based Medicine, ACP Journal Club, Cochrane Library, PubMed and Medical Subject Headings**. From 971 articles found throughout the search, 158 were selected based on various selection criteria.

Results: It is confirmed the presence of an immune and degenerative process in MS, which can be independent, engaged in a range of possible causes including genetics, infections, toxic, among others. Abnormalities in the activation of microglia and oligodendrocytes are observed in apparently normal areas of the CNS, months ahead from the appearance of typical inflammatory lesions and clinical signs.

Conclusions: Further studies are needed to overcome the inherent difficulties in characterizing this pathology, such as sampling and research of specific biomarkers. However, there are several studies that point out an early appearance of lesions so called preactive, that arise before the immune process and may represent the precursor mechanism of MS. The cause for the observed oligodendropathy in these lesions is, however, still very

uncertain, although hypothesis such as glutamate toxicity, mitochondrial dysfunction and oligodendrocyte internal changes are being seriously considered.

Keywords: multiple sclerosis, immunology, histopathology, inflammation, neurodegeneration.

1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença progressiva, caracterizada pela presença de lesões multifocais no Sistema Nervoso Central onde predominam a desmielinização e perda axonal. Estas lesões são geralmente observadas sobretudo no nervos ópticos, substância branca periventricular e medula espinhal, mas podem afectar outras áreas como córtex cerebral a substância cinzenta subcortical. A sua apresentação clínica pode ser muito diversa, mas são distinguidos dois acontecimentos básicos: os **surtos** ou **recidivas**, onde os sintomas neurológicos aparecem abruptamente e revertem parcial ou totalmente, e **progressão** de défices como as incapacidades cognitivas, que se instalam gradualmente e não são reversíveis, podendo, no entanto, haver períodos de estabilização. Actualmente, usam-se as seguintes definições para as formas de evolução clínica: Esclerose Múltipla Recidivante-Remitente (EMRR) ou evoluindo por surtos-remissão, Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP), Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP) e Esclerose Múltipla Progressiva-Recidivante.(1)

A EM é considerada actualmente, pela maioria dos autores, uma doença inflamatória crónica desmielinizante que cursa com uma desregulação do sistema imunitário, através de uma cascata que inclui, entre outros, linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, linfócitos B e macrófagos. Ela foi sumariamente caracterizada pela primeira vez por Charcot(2) e Frommann(3) no século XIX, com contribuições de Carswell (1838)(4) e Cruveilhier (1841)(5) na caracterização macroscópica das lesões em doentes e de Rindfleisch (1863)(6) no campo da microscopia, com a descoberta de aglomerados celulares perivenosos associados à inflamação, existentes nestas lesões. Contudo, e apesar de desvendados ao longo dos anos os principais mecanismos de destruição do tecido nervoso, a heterogeneidade e complexidade na apresentação clínica, histopatológica e resposta terapêutica da EM a fármacos imunomoduladores e imunossuppressores, tem tornado difícil descobrir se realmente o processo inflamatório é

primário na patogênese da doença. Acredita-se hoje que factores genéticos, ambientais e tóxicos estejam implicados nesta patologia e novas abordagens e teorias têm surgido com o desenvolvimento da imunohistoquímica, da neurobiologia, da genética e de técnicas imagiológicas como a Ressonância Magnética (RM).

A necessidade de encontrar uma causa e de identificar biomarcadores específicos da doença e de tratamentos que atrasem ou interrompam eficazmente o seu progresso, sobretudo em estadios mais avançados, tem sido motivo de investigação intensa. Trabalhos recentes têm vindo a abrir novos horizontes para o esclarecimento da etiopatologia da EM. Teorias baseadas num pressuposto de que a EM tem origem numa oligodendroglíopatia primária têm-se contraposto a outras ideias comumente mais aceites, segundo as quais a doença se inicia com um processo imune dirigido contra os constituintes da bainha de mielina ou do oligodendrócito, consequência de uma sensibilização prévia periférica de linfócitos T.

2. MÉTODOS

Pesquisa da literatura: Foi elaborada uma pesquisa seguindo o modelo da pirâmide dos 5 S (5 níveis) de Haynes. Apesar de ser recomendado começar pelo último nível (*Systems*) este foi excluído por representar um conjunto de ferramentas computadorizadas, de apoio à decisão clínica, que ainda não estão completamente desenvolvidas. No nível seguinte, *Summaries*, recorreu-se as fontes de informação que incluem o **UpToDate** (<http://www.uptodate.com/index>) e **Dynamed** (<http://dynamed.ebscohost.com/>). No **UpToDate** a pesquisa foi realizada com os termos: multiple sclerosis, inflammation, neurodegeneration e imunopathology, tendo sido encontrados 3 documentos. No **Dynamed**, foram pesquisadas as equações *multiple sclerosis + inflammation* (0 documentos), *multiple sclerosis + inflammatory* (0 documentos), *multiple sclerosis + neurodegeneration* (0

documentos), *multiple sclerosis + neurodegenerative* (1 documento). O recurso seguinte a ser utilizado pertence ao nível das *Synopses*. Aqui através do **Evidence Based Medicine** (<http://ebm.bmj.com>) foram encontrados 236 documentos quando introduzida a equação *multiple sclerosis + inflammation* e o mesmo número quando introduzido *multiple sclerosis + neurodegeneration*. Usando o **ACP Journal Club** (<http://acpjc.acponline.org>), os resultados obtidos com a pesquisa foram: *multiple sclerosis + inflammation* (0 documentos), *multiple sclerosis + inflammatory* (1 documento), *multiple sclerosis + neurodegeneration* (0 documentos), *multiple sclerosis + neurodegenerative* (0 documentos) e *multiple sclerosis + immunopathology* (0 documentos). O quarto nível representado por bases de dados de revisões sistemáticas, *Synthesis*, inclui a pesquisa na **Cochrane Library** (<http://www.cochrane.org/>). Foram encontrados sete documentos com *multiple sclerosis + inflammation*, oito documentos com *multiple sclerosis + inflammatory*, seis documentos com *multiple sclerosis + neurodegeneration*, um documento com *multiple sclerosis + neurodegenerative* e zero documentos com *multiple sclerosis + immunopathology*. De seguida foi utilizado a **PubMed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), recorrendo ao filtro metodológico das *Clinical Queries*, para incluir *Systematic Reviews*, *Meta-analysis*, *Consensus*, *Evidence Based Medicine e Guidelines*. Com a equação “*multiple sclerosis*” AND (*inflammation OR inflammatory*), foram encontrados 106 documentos, sem aplicação de mais nenhum filtro. Foram aceites todos os idiomas nesta pesquisa. Com a equação “*multiple sclerosis*” AND (*neurodegeneration OR neurodegenerative*), 23 artigos foram seleccionados. Por último, a equação “*multiple sclerosis*” AND *immunopathology*, 3 documentos foram encontrados. Recorrendo, por fim, a estudos originais, através do nível *Studies*, foi efectuada uma pesquisa utilizando **MeSH (Medical Subject Headings - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>)** com vocabulário controlado. O termo MeSH para o conceito *neurodegeneration*, é *neurodegenerative disease*, ao que se associou o termo MeSH *multiple sclerosis*. Utilizando

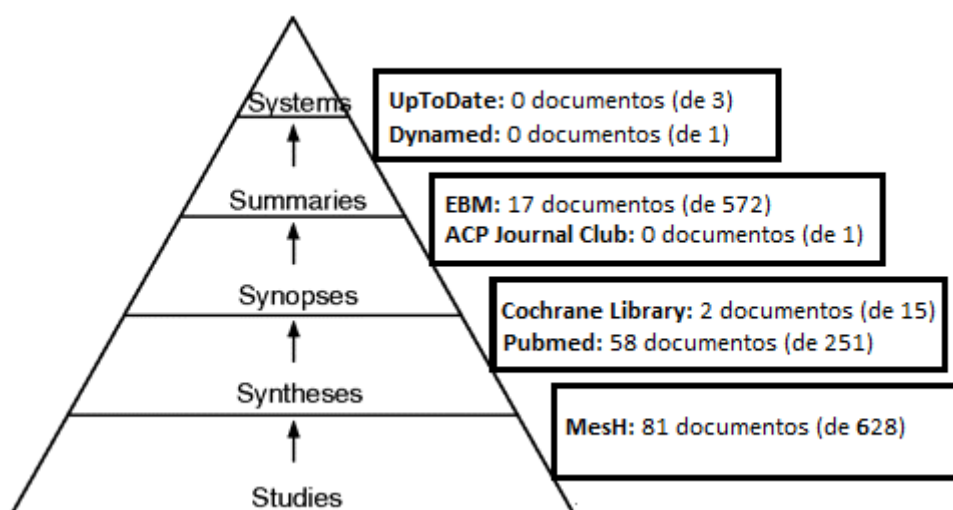
como equação “*multiple sclerosis*”[Majr] AND “*neurodegenerative disease*”[Majr] foram encontrados 455 documentos. Delimitando a pesquisa usando os *Limits* com ano de publicação entre 1980 e 2011, e seleccionado os idiomas: Português, Inglês e Espanhol, o número foi reduzido a 277 documentos, dos quais 67 são de revisão. Pelo facto de existirem artigos que ainda não foram indexados (termos MeSH atribuídos), efectuou-se igualmente pesquisa em texto livre através de “*multiple sclerosis*” AND (*neurodegeneration OR neurodegenerative*), tendo sido recuperados 172 artigos. Destes foram seleccionados 34 artigos. O termo MeSH para os conceitos *Inflammation, Inflammatory e neuroinflammation é Inflammation*. Através do uso dos *Limits* anteriormente definidos, foram encontrados 116 artigos, sendo 56 destes de revisão, através da equação “*multiple sclerosis*”[Majr] AND “*inflammation*”[Majr]. Em texto livre, a pesquisa “*multiple sclerosis*” AND (*inflammation OR inflammatory OR neuroinflammation*) obteve 63 artigos. Cruzando as pesquisas efectuadas através dos conceitos esclerose múltipla e doença neurodegenerativa com esclerose múltipla e inflamação no MeSH, 6 artigos são em duplicado. Esta pesquisa foi efectuada a 10 de Novembro de 2011.

Seleção de estudos: Todos os artigos incluídos seguiram os seguintes critérios de inclusão: i) conter informação original e estar presente em publicações com arbitragem científica, alto número de citações e factor de impacto e boa credibilidade dos autores e instituição a que pertencem; ii) incluir pelo menos um grupo de doentes com Esclerose Múltipla (EM) que seja comparado com um controlo; iii) estudar doentes de todas as idades em diferentes estadios da doença e observar todo o tipo de lesões em matéria branca e cinzenta do Sistema Nervoso Central; iv) realizar estudo anatómico destas lesões e imunohistoquímico das lesões, sangue e LCR de doentes e estudos genéticos e ambientais que possam explicar processo patológico inicial da EM; v) estudar e comparar o modelo animal mais semelhante à EM, o da Encefalite Alérgica Experimental; vi) referir e explicar o sucesso/insucesso de tratamentos anti-

inflamatórios e neuroprotectivos na EM. Os títulos e resumos de todos os artigos pesquisados foram vistos independentemente por mim e pelas minhas orientadora e co-orientadora. Estudos que aparentaram ser relevantes e concordantes com estes critérios foram seleccionados e obtida a versão *Full Text* dos mesmos. Desacordos entre a selecção dos artigos foram discutidos entre os três para obter consenso na escolha.

Bibliografia seleccionada: Do conteúdo encontrado no **UpToDate** e **Dynamed** nenhum fazia referência directa ao tema deste trabalho. Foram seleccionados 17 documentos dos 572 encontrados no **Evidence Based Medicine** e nenhum dos pesquisados pelo **ACP Journal Club**. Quanto à pesquisa na **Cochrane Library**, 2 dos 15 documentos foram retirados e na **Pubmed** 23 documentos dos 132 demonstraram relevância suficiente para integração neste trabalho. Os resultados obtidos através do **MeSH** resultaram na selecção de 81 artigos num total de 628 encontrados.

Figura 1. Esquema representativo da selecção de bibliografia segundo a Pirâmide de Haynes



3. DESENVOLVIMENTO

No que respeita à neuropatologia, a EM caracteriza-se pela presença de múltiplas lesões no SNC, que podem apresentar diferentes graus de inflamação, desmielinização e destruição axonal, consoante o seu tempo de evolução. É a presença destas lesões que determina o surgimento dos sinais e sintomas da doença e as expressões clínicas já mencionadas e estas podem ser divididas em quatro grandes grupos.

3.1. Tipos de lesões na EM

3.1.1 LESÕES AGUDAS

São lesões hipercelulares que possuem uma margem mal definida, com um componente inflamatório e desmielinizante muito acentuado e presença de edema. São observados frequentemente em doentes com um episódio inicial, designado Síndrome Clínico Isolado (SCI) e apresentam macrófagos com inclusões lipídicas (provenientes de fagocitose de componentes mielínicos) e astrócitos hipertróficos. Predominam os linfócitos T CD8⁺ e os linfócitos B são escassos. Células residentes e infiltrativas, existentes no parênquima e espaço perivascular, expressam uma proteína (chaperona), a HSP60 (*Heat Shock Protein*), ligada a um conjunto de outras patologias auto-imunes. Outras moléculas com expressão aumentada incluem interleucinas (IL)-1,2,4 e 10, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*), TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*), VCAM (*Vascular Celular Adhesion Molecule*) e VLA (*Very Late Antigen*)-4. Existe um grau de dano axonal consideravelmente alto e é rara a astrogliose fibrilhar. (7-9)

[Citocinas:

Crescimento e diferenciação hematopoiética: IL-3, 5, 7, 9 e 1

Resposta imune inata: IL-1, 6, 10, 12, 18 e TNF- α

Resposta imune adaptativa: IL-2, 4, 13, 15, 16, TGF- β e INF- γ

Anti-inflamatórias: IL-3, 4 e 10.

Pró-inflamatórias: IL-1, 6, TNF- α e INF- γ]

3.1.2 LESÕES CRÓNICAS ACTIVAS

Observadas sobretudo em doentes com EMRR, têm um centro hipocelular, com desmielinização da grande maioria dos axónios, senão a totalidade destes, acompanhando uma astrogliose fibrilhar extensa. Nas suas margens bem delimitadas com componente inflamatório, são observadas áreas hipercelulares com desmielinização em curso. Podem ser encontrados também na periferia, oligodendrócitos (OD) em grande número, numa tentativa de remielinização. Está aumentada a expressão de IL1,2,4,6 e 10 e TNF- α assim como VCAM e a molécula de adesão intercelular (*ICAM – intercelular adhesion molecule*) nas células endoteliais (CE) da barreira hematoencefálica (BHE).(7-9)

3.1.3. LESÕES CRÓNICAS INACTIVAS

Lesões sem sinais inflamatórios, com desmielinização completa. Algumas podem conter ainda números reduzidos de linfócitos T e macrófagos nas áreas perivasculares. Uma característica típica é a cicatrização glial, caracterizada por um número alto de astrócitos empacotados com filamentos de glia. São observadas em doentes com Esclerose Múltipla Progressiva.(7-9)

3.1.4. PLACAS “SOMBRA”

Enquanto que alguns autores defendem que são placas com desmielinização incompleta,(10) a maioria alega que são lesões em que existiu uma tentativa de remielinização dando origem a áreas com axónios recobertos por uma mielina menos espessa que a normal. São assim designadas por serem mais escuras que as placas desmielinizadas, aparecendo bem delimitadas no seio de grandes áreas sem mielina.(7-9)

3.2. A HETEROGENEIDADE E COMPLEXIDADE DA EM: CARACTERÍSTICAS DOS PROCESSOS INFLAMATÓRIO E NEURODEGENERATIVO.

3.2.1. Inflamação: Papel de diferentes fenótipos celulares

Passaram já quase 150 anos desde que Eduard Rindfleisch(6) observou nos seus estudos que as lesões desmielinizantes em pacientes com EM tinham um infiltrado de diferentes células inflamatórias a circundar os seus pequenos vasos. Foi Fromman(3) em 1978 quem evidenciou que estes grupos celulares eram sobretudo constituídos por leucócitos e macrófagos e que a estes, segundo Babinski (1885),(11) estariam associados produtos intracitoplasmáticos de degradação miélnica. Com o desenvolver de técnicas de imunologia e histoquímica foi também possível detectar em variados estudos grandes quantidades de um vasto leque de citocinas pró e anti-inflamatórias(12), quimiocinas(13), moléculas co-estimuladoras e quimiotáxicas e os seus respectivos receptores(14) nestas lesões e no sangue periférico dos doentes. Existem hipóteses, umas mais fundamentadas que outras, sobre os fenótipos celulares mais ligados com a etiopatogenia da doença, com ênfase para os linfócitos $T_{\text{citotóxicos}}$, T_{helper1} (Th1) e Th2, e os actualmente reconhecidos Th17.(15, 16) Estas hipóteses surgiram por estudos anatomopatológicos e serológicos que comparam doentes com EM e controlos e através do modelo animal que mais se parece assemelhar com a EM em humanos, a Encefalomielite Auto-imune Experimental (EAE).(17) Esta doença do sistema nervoso, imuno-dirigida, é induzida em ratos de laboratório, quando transferidos para estes fracções de mielina, proteínas constituintes da mielina ou linfócitos T previamente sensibilizados a estes antígenos ou provenientes de indivíduos com EM.(18) Mesmo assim, não existe uma semelhança completa entre as duas já que, por exemplo, terapêuticas que funcionam e permitem a regressão da EAE em ratos não têm, na grande maioria das vezes, o mesmo efeito em doentes com EM.(19) A identificação dos fenótipos celulares directamente relacionados com a EM é um passo importante para a compreensão e tratamento da doença, mas deve ter-

se em atenção que esta inflamação poderá não ser totalmente específica da EM, já que o SNC parece responder de igual forma a qualquer tipo de lesão tecidual ou infecção.

3.2.1.1. Linfócitos TCD4⁺ (ou T_{helper})

Tanto os doentes com EM como os indivíduos saudáveis têm células T com reacção específica para a mielina mas normalmente estas são do tipo *naive* e entram no SNC sem criarem qualquer reacção(15). Em indivíduos doentes, estas células TCD4⁺ encontram antígenos provenientes da mielina, através de uma interacção com componentes do Complexo Major de Histocompatibilidade (*MHC - Major Histocompatibility Complex*) Classe II de células dendríticas em gânglios linfóides periféricos e mais tarde noutras células apresentadoras de antígeno (*APC - Antigen Presenting Cell*) no SNC e activam uma cascata inflamatória, com recrutamento de mais células imunitárias, libertação de citocinas e outras moléculas que são quimiotáticas e que modificam a BHE, aumentando a permeabilidade a estas células.(16, 20)

Desde a sua primeira caracterização que têm vindo a ser identificados linfócitos TCD4⁺ nas lesões, LCR e sangue de doentes e o espectro de citocinas e quimiocinas e respectivos receptores coincidem também com a presença destas células. Outro suporte para esta teoria é que a inoculação de ratos com este tipo de linfócitos, provoca uma doença muito semelhante à EM, em modelo animal, a EAE.(18) As células TCD4⁺ parecem, portanto, iniciar o processo inflamatório mas a evolução da EM deve-se a outro tipo de células T mencionado abaixo neste trabalho, as CD8⁺. Os linfócitos T_{helper} não conseguem destruir OD directamente, pois estes não expressam MHC II, mas podem activar macrófagos e microglia, que por sua vez secretam moléculas tóxicas tanto para os OD como para a mielina, explicando-se assim parte do seu papel na EM.

Estas células têm uma funcionalidade muito variada na imunidade em geral e na EM em particular, já que se diferenciam em diversos fenótipos provenientes de uma célula original, Th0, consoante a estimulação que sofrem e as citocinas que libertam(21), depois de apresentação antigénica pelas APC. Os mais relevantes são os fenótipos Th1, Th2 e os

[A interleucina 17 é uma citocina que age como um potente mediador em reacções inflamatórias do tipo tardio, aumentando a produção de quimiocinas em vários tecidos e recrutando monócitos e neutrófilos ao local da inflamação, à semelhança do interferão-gama.]

recentemente tidos como principais gatilhos da EM, os Th17. Os linfócitos Th1 provêm normalmente de uma resposta a infecções virais e outros patógenos intracelulares, depois de estimulados pelas interleucinas(IL)-16 e IL-18. Libertam IL-2, TNF- α e

INF- γ (Interferão-gama). São estimuladores da imunidade mediada por outras células; os Th2 são sobretudo formados pela estimulação com IL-4 e costumam responder a microrganismos extracelulares. Libertam IL-4, 5, 10 e 13 e constituem uma arma na imunidade humoral, estimulando diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos;(22) os Th17 têm sido considerados como fundamentais no aparecimento da EM por terem um papel relevante na EAE, induzindo a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e a maturação de células dendríticas. Outras razões apontam para a sua relevância, como elevados níveis de secreção de IL-17, o facto de estas células eficientemente migrarem facilmente pela BHE, acumularem-se em lesões patológicas e secretar uma protease designada granzima B e outras enzimas citolíticas que destroem os neurónios.(23) São células que se diferenciaram por estimulação com TGF- β e IL-6, produzindo por sua vez TNF- α , IL-1, 17 e 22, recrutando, activando e promovendo a migração de neutrófilos para o local de inflamação.(24) Acredita-se ainda que um quarto tipo de células TCD4⁺ possa estar alterado na EM. Elas diferenciam-se através de estimulação por TGF- β e IL-2 e são denominadas de T_{reguladoras}, conferindo tolerância imunitária, mas permitindo uma imunidade auto-reactiva quando em menor número ou funcionalidade.(25) Libertam TGF- β , IL-10 e a sua proliferação é inibida através da IL-6.

Análises sanguíneas de doentes com EMRR mostram uma capacidade supressiva diminuída destas células e diminuição de FoxP3, uma proteína que controla a actividade de genes que estão envolvidos na regulação do sistema imunitário, o que já não parece acontecer em doentes com EMSP, onde estas células aparentemente são normais.(26) Apesar de algumas terapêuticas contra estas células terem falhado, depois de funcionarem em ratos com EAE, torna-se irrefutável o papel preponderante dos linfócitos T_{helper} na doença pelos aspectos já referidos. Uma explicação para este facto prende-se com a complexidade e as diferenças ainda por desvendar da EM em relação ao seu protótipo animal e a capacidade que estas células parecem adquirir de resistir a uma morte celular programada, depois de se diferenciarem num determinado fenótipo.(27) Estudos sugerem que estas terapias destruiriam linfócitos naive, e não linfócitos Th diferenciados. (28)

3.2.1.2. Linfócitos T CD8⁺

A inclusão destas células na patogenia da EM é apoiada por vários estudos(29-32) que incluem citometrias de fluxo (onde é avaliada a resposta proliferativa antigénio-específica) e PCR (que mostra uma expressão clonal mais proeminente de CD8⁺ em relação às CD4⁺). (33) Estes linfócitos encontram-se predominantemente nos locais de maior destruição celular neuronal, estando a extensão da lesão correlacionada com números mais elevados destas células, que por sua vez vão diminuindo com a “idade” da lesão. Eles reconhecem antigénios apresentados por moléculas MHC classe I, expressas apenas durante os processos inflamatórios em alguns tipos de células como os neurónios e oligodendrócitos, e destroem células neuronais em variados modelos *in-vivo* de inflamação induzida por vírus.(34) Muitas vezes estas células T activadas, podem adquirir uma citotoxicidade não restringida aos MHC e destruir neurónios e axónios directamente. O seu perfil funcional, ao contrário das TCD4⁺ que tendem a exibir um perfil de Th1, não é tão simples de identificar, parecendo haver uma

tendência para detecções de grandes quantidades de $\text{INF-}\gamma$ e receptor quimiocina-3, acompanhados de aumento da produção de IL-10 nas áreas onde estão presentes. A sua prevalência é maior em doentes com EMRR, quando comparados com outros tipos de EM e apesar de se afirmar que estas células têm um papel importante, ele ainda é bastante indefinido, e os antigénios que poderão provocar a sua activação incertos e merecedores de estudos no futuro. Acredita-se que podem exercer um papel importante na progressão da doença, já que algumas destas células infiltrativas persistiram no LCR e sangue de doentes por mais de 5 anos.(32) Existem igualmente suspeitas de que possam ter um papel regulador, à semelhança das TCD4^+ , tanto na EAE como na EM.(35, 36)

3.2.1.3. Linfócitos B

A expansão clonal de células B é detectada no LCR de doentes com EM em estadios iniciais da doença,(37) indicando que estes linfócitos podem ter um papel precoce na iniciação da cascata inflamatória, que inclui produção de imunoglobulinas e moléculas do Complemento, muitas vezes detectadas em oligodendrócitos e no interior da microglia.(38) A função destes linfócitos na doença é, apesar disso, também bastante incerta. Sabe-se que sozinhos não conseguem induzir EAE em animais, mas que, em certas circunstâncias terapias com anti-IgM podem atrasar a progressão da doença neste modelo animal.(39) Além disso, verificou-se em laboratório que a mielina quando opsonizada pelo Complemento torna-se mais facilmente digerida pelos macrófagos e microglia, estando mais predisposta a lesão. (40)

Existem várias hipóteses que tentam explicar como estas células se tornam auto-reactivas: i) Expansão clonal e diferenciação por reconhecimento de antigénios provenientes da destruição mielínica, resultando num maior recrutamento de células que participarão na resposta imune. ii) Reacção cruzada entre antigénios virais ou bacterianos e componentes da

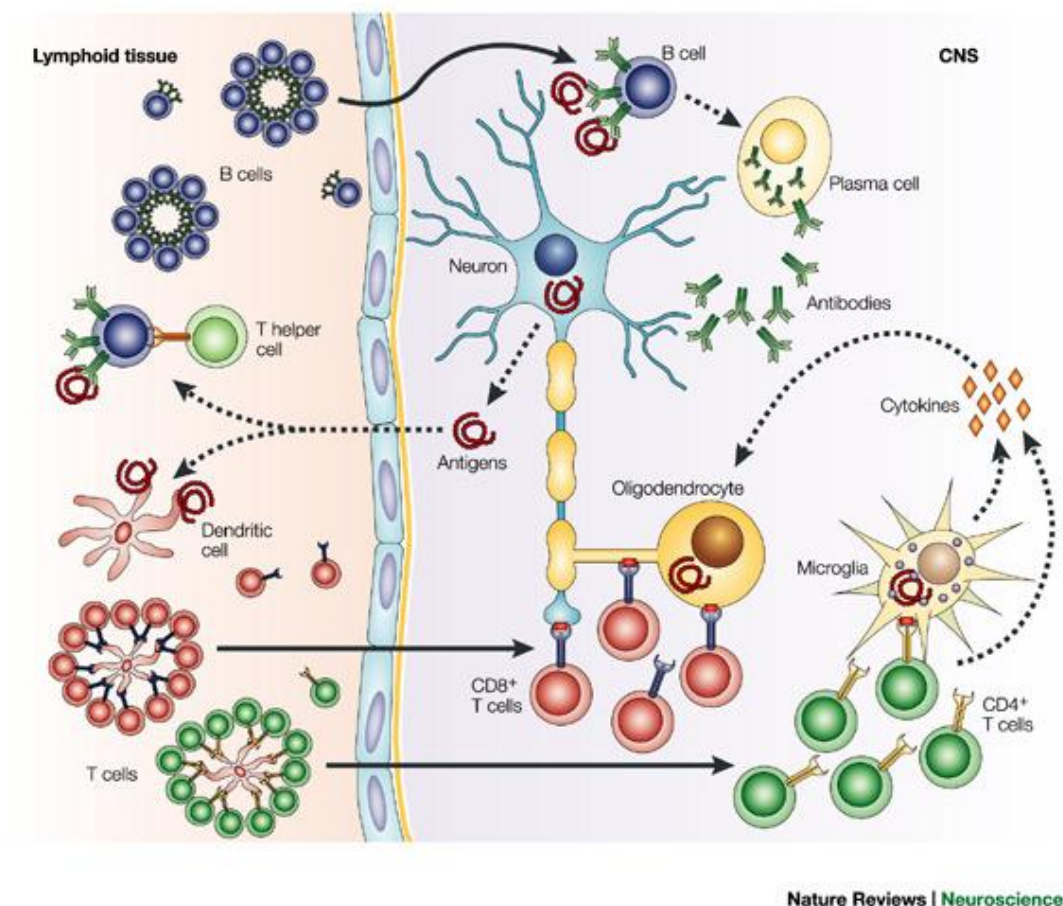
mielina, onde os linfócitos B depois de activados para o combate contra a infecção criam anticorpos, que por mimetismo molecular, são reactivos também para as bainhas que recobrem os neurónios. Um processo muito semelhante ocorre, por exemplo, com o Vírus Linfotrófico Humano tipo-1. iii) Mudança de produção de IgM por parte das células B auto-reactivas, para IgG, podendo isto contribuir sobretudo para a progressão da doença. iv) Edição do receptor (mudança da cadeia leve do anticorpo produzido) que acontece no LCR numa tentativa de diminuir a auto-reactividade e que deveria desencorajar mais danos mas que contrariamente, parece muitas vezes produzir anticorpos ainda mais reactivos ou com reconhecimento para mais do que um tipo de antígeno do SNC.(41)

Para além da produção de imunoglobulinas, estas células estimulam a resposta inflamatória através de uma molécula membranar (CD40) que ao ligar-se a um ligando (CD40L) existente nos TCD4⁺, estimula a produção de uma proteína B7 e converte estes linfócitos em APC. A prevenção da EAE parece passar pelo tratamento com anticorpos contra o ligando CD40L.(42)

[Os ligandos CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) pertencem à família das imunoglobulinas e expressam-se em células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B activados.]

Sobretudo na EM progressiva, são encontradas estruturas linfóides ectópicas semelhantes a folículos com centros germinativos que fornecem uma fonte contínua de resposta de linfócitos B não específicos para nenhum antígeno, alterando a ideia inicial de que o SNC apresenta “privilégios imunológicos”.(43) Também em casos de EAE foram identificados folículos nas meninges de ratos e detectados centroblastos no LCR, células estas que só costumam ser encontradas em nódulos linfáticos periféricos.(44) Isto parece explicar uma característica muito própria da EM: a persistência de produção de imunoglobulinas não neuroantígeno-específicas, depois dos surtos inflamatórios.

Figura 2. Imunologia da EM: papel de alguns fenótipos celulares. (Adaptado de “New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis”. Hemmer, B.; Archelos, J.; Hartung, H. (2002))



3.2.1.4. Macrófagos/Microglia

Numericamente, os macrófagos ultrapassam os linfócitos T em lesões patológicas da EM, tanto em lesões agudas como crônicas. Estas células têm uma enorme capacidade de produzir neurotoxinas, secretam IL-1 e 6 e TNF- α , podem alterar a estrutura e função da BHE e são capazes de lesar directamente oligodendrócitos e mielina depois de activados pelas células TCD4⁺ ou na presença de imunoglobulinas e complemento contra a mielina, através de uma citotoxicidade mediada por anticorpos.(45) Os macrófagos são também os principais APC's com moléculas MHC Classe II em locais de doença activa.(46) A microglia, conjunto de células fagocíticas de vigilância, próprias do SNC, semelhantes em função aos macrófagos, têm muitas vezes processos de activação iguais a estes. Na EAE, macrófagos e microglia são

mediadores importantes na lesão tecidual e a depleção de macrófagos inibe a sua evolução.(19) A microglia tem como particularidade a expressão de receptor para o FcRs (região constante da imunoglobulina) e proteína B7. Esta B7 liga-se ao CD28 nos linfócitos T, activando a microglia. Ela também expressa receptores do Complemento (*CR – Complement Receptor*)1 e CR2 e pode ser activada, produzindo, então IL-1 e 6 e TNF- α à semelhança dos macrófagos, ou fagocitar outras células revestidas por Complemento.(47) Consoante o tipo de lesão que se estuda e observa, a abundância deste tipo de células vai diferindo. Elas revelam um fenótipo predominantemente macrofágico em todas as lesões activas, enquanto que em lesões de expansão lenta existe um número aumentado de microglia com apenas alguns macrófagos. Outras células fenotipicamente semelhantes a microglia, mais ramificadas são encontradas em lesões inactivas, no córtex cerebral e na substância branca aparentemente normal (*NAWM – Normal Appearing White Matter*).(48, 49) A activação da microglia, apesar de normalmente mais associada a processos lesivos com desmielinização pode ser encontrada noutras situações, como em processos de remielinização em cérebros afectados, dando a perceber que estas células também desempenham um papel protector(50) e que a sua função dependerá do tipo de estimulação que recebe, podendo ser, então, reconstrutora ou destrutiva.

3.2.1.5. Células NK (Natural Killer)

As células NK, assim designadas por terem a capacidade de atacar e destruir células sem primeiro passarem por processos de maturação, têm sido rotuladas de imuno-reguladoras com base no seu padrão de expressão de citocinas e na sua proliferação durante estados de maior tolerância imunológica, como é exemplo a gravidez.(51) Estas células têm a capacidade de suprimir em muitos casos, a EAE em animais.(19) Sabe-se igualmente que o número de células NK aumenta e o de surtos diminui aquando tratamento com INF- β ou com anticorpos anti-CD25.(52, 53) Estes dados não exibem propriamente uma prova concreta e objectiva da

significância patogénica destas células, mas demonstram a complexidade da regulação imunológica na EM.

3.2.1.6. Astrócitos

Estas células apesar de não pertencerem ao arsenal clássico de uma cascata inflamatória parecem ter um papel no processo imunológico do SNC na EM e tanto podem ser imunoreguladoras como perpetuadoras da doença. No primeiro cenário, estas células produzem TGF- α , diminuem a produção de INF- γ e reduzem a proliferação de linfócitos T. Pelo contrário num cenário muito diferente, estas células participam num processo deletério desmielinizante, provocando uma cicatrização astrogliar, tão característica das lesões na EM.(54)

Estas células podem ser divididas em dois grupos morfológicamente diferentes: i)astrócitos protoplasmáticos encontrados na substância cinzenta e ii)astrócitos fibrosos encontrados sobretudo na substância branca cerebral. Elas são detectadas no SNC através da expressão de proteína glial fibrilar acídica (*GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein*). Esta proteína encontra-se aumentada em casos de EAE, acompanhada de proliferação e hipertrofia dos astrócitos, e a sua expressão ocorre em estadios precoces da doença.(55)

Uma característica dos astrócitos na EM é a perda de receptores β 2-adrenérgicos. Esta diminuição de receptores expressos tem um papel em ambas as lesões mediadas por inflamação e por neurodegeneração progressiva e parece ter várias consequências que explicam as mudanças patológicas das lesões. Sabe-se por exemplo que durante a inflamação, linfócitos, microglia, e macrófagos libertam grandes quantidades de glutamato e que a escassez destes receptores diminui o aporte do glutamato por parte dos astrócitos e contribui para o dano excitotóxico dos oligodendrócitos através da activação de receptores do

glutamato (*AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*). O défice deste receptor também parece permitir a expressão de moléculas MHC Classe II pelos astrócitos, que actuam como APC's, e facilitar a libertação de citocinas pró-inflamatórias pelos mesmos, como o TNF- α .(56, 57) Também estimulam a produção de NO, comprovada através de uma expressão aumentada de NO sintetase.(58) O bloqueio desta produção de NO costuma melhorar a condição patológica de ratos em que foi induzida EAE.(59, 60) Por fim, este menor número de receptores β 2-adrenérgicos tem implicações negativas no metabolismo dos axónios e OD, ao reduzir quantidades de lactato (utilizado no metabolismo dos OD) produzidas pelos astrócitos, sendo este efeito mais notado em situações de maior actividade neuronal.(61)

3.2.2. Neurodegeneração e perda axonal na EM

São muitas e inequívocas as demonstrações histológicas *postmortem* de transecção e perda axonal em cérebros de doentes com EM.(62-66) Além disso, também os estudos com RM e espectroscopia demonstraram uma redução significativa de ácido N-acetilaspártico (*NAA - N-Acetylaspartic Acid*),(67) um marcador da integridade neuronal produzido apenas pelas mitocôndrias dos neurónios. O desenvolvimento de coloração imunológica da proteína precursora da amilóide (*APP - amyloid precursor protein*)

[A proteína precursora da amilóide (*APP - amyloid precursor protein*) percorre o axónio através de transporte axonal rápido e só é detectada nos axónios quando estes são transectados. Estruturas observadas em lesões, que reagem imunologicamente para a APP parecem ser bolbos/esferóides terminais associados a esta transecção.]

como um marcador de lesão axonal foi um avanço que permitiu também demonstrar que existe um processo activo de destruição de axónios sobretudo em **lesões agudas** e nas margens de **lesões crónicas activas**. Contudo, estruturas neuronais positivas para o APP, ainda estão presentes em lesões de pacientes com EM prolongada, indicando que a perda axonal continua durante a progressão da doença. O reduzido número de infiltrados

inflamatórios nestes doentes de longa data parece indicar que os mecanismos que levam a disfunção axonal em **lesões crónicas inactivas** podem ser completamente independentes de processos imunes e portanto, diferentes daqueles observados em lesões activas.(62, 68).

As particularidades de cada lesão parecem oferecer algumas ideias sobre existência ou não de uma relação entre o processo inflamatório e a neurodegeneração nos diferentes estadios da doença:

3.2.2.1. LESÕES AGUDAS/CRÓNICAS ACTIVAS

Nestas lesões, a perda de axónios parece estar intimamente relacionada com o processo inflamatório. O número de bolbos axonais positivos para a APP correlaciona-se com o grau de inflamação e a sua presença em doentes com curta duração de doença aponta para que esta lesão axonal comece num estadio precoce.(62, 63) Hipoteticamente, estes danos ocorreriam

[As lesões observadas em mitocôndrias incluem uma diminuição da actividade do complexo IV da cadeia respiratória (Citocromo C Oxidase) e são encontradas em axónios desmielinizados, em lesões agudas (mas também em crónicas activas) e estão relacionadas com o número de macrófagos e microglia.]

devido a uma maior vulnerabilidade à inflamação, dos axónios desmielinizados. Parece, então, existir uma maior incidência de lesão axonal aguda em placas de desmielinização activa, sendo que a extensão desta lesão se correlaciona com o número de macrófagos, de

linfócitos TCD8⁺ e com a severidade do processo imune.(62, 69) A lesão é aparentemente mediada por citocinas que estas células produzem e libertam, assim como por outras moléculas presentes no microambiente inflamatório (enzimas proteolíticas, produtos oxidativos e radicais livres produzidos por células imunes e gliais).(70)

Outros factores que podem influenciar o grau de dano axonal nestas lesões são o mecanismo de desmielinização, e possivelmente a susceptibilidade de cada indivíduo. Apesar do evento inicial de dano axonal poder diferir, o percurso que leva a destruição dos axónios

parece ser sempre o mesmo: alterações nos canais iónicos que causam distúrbios na homeostase de proteases dependentes do cálcio, degradação local de elementos do citosqueleto, bloqueio do transporte axonal e finalmente, morte celular.

Vários mecanismos e substâncias, de lesão axonal directa ou indirecta, como o óxido nítrico (NO)(71-73) e proteases, alterações na funcionalidade mitocondrial, mudanças na conectividade e transporte axonal e toxicidade pelo glutamato têm sido alvo de estudo em inúmeros trabalhos efectuados nos últimos anos.

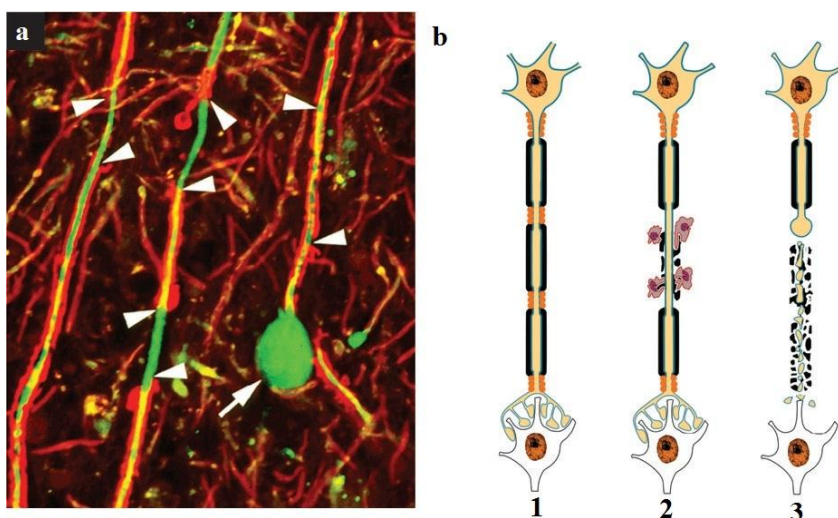
Quanto ao NO, este pode ter um efeito prejudicial na sobrevivência axonal,(72) modificando a acção de canais iónicos chave, transportadores importantes e enzimas glicolíticas.(74-76) O NO e um derivado, o peroxinitrito, também inibem a resposta mitocondrial e limitam a capacidade dos axónios em produzir ATP.(77) Esta redução do metabolismo energético nos axónios desmielinizados pode também ser devida à inflamação por si só, (78) já que alguns intermediários inflamatórios podem actuar directamente nas mitocôndrias alterando o seu funcionamento.

Uma outra consequência da inflamação prende-se com uma disrupção de transporte axonal via translocação de deacetilase histona (HDAC1) do núcleo até ao citosol e a inibição da formação de um complexo com proteínas motoras de cinesina, alterando o correcto metabolismo e funcionamento dos neurónios.(79)

A excitotoxicidade pelo glutamato, por sua vez, foi já observada em muitas condições neurodegenerativas agudas e crónicas.(80) Quando o glutamato é libertado em excesso, activa receptores inotrópicos e metabotrópicos, resultando numa acumulação citoplasmática de Ca^{2+} e morte celular. Células do sistema imunitário activas,(81) axónios(78) e astrócitos(82, 83) podem ser potenciais fontes de glutamato nas lesões de EM.

Por fim, parece também haver uma alteração da conectividade entre neurónios nas lesões desmielinizantes inflamatórias, como por exemplo a redução de componentes para a transmissão GABAérgica, sendo esta acompanhada por uma redução imunohistoquímica de interneurónios.(84) Estudos electrofisiológicos reproduziram estes resultados, mostrando uma ligação entre transmissão alterada e exposição crónica a citocinas inflamatórias. Apesar da perda axonal poder ser muito extensa em lesões activas, as incapacidades permanentes em doentes com EM nas fases iniciais da doença são raras devido à plasticidade do SNC que compensa esta disfunção axonal, mecanismo este demonstrado por detecção de novas regiões cerebrais activadas, em estudos com RM funcional.(85-89)

Figura 3. Neurodegeneração em lesões activas (Adaptado de “Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?”, D. Trapp, B. e col. (2008))



Os axónios são seccionados durante desmielinização inflamatória. (a) imagem confocal de uma lesão desmielinizante com coloração para a detecção de mielina (vermelho) e os axónios (verde). Os três axónios orientados verticalmente têm áreas de desmielinização (pontas de seta), que é mediada por microglia e monócitos hematogénicos. O axónio da direita termina numa grande tumefação (seta), ou bulbo de retração axonal, que é a marca da extremidade proximal de um axónio seccionado. (b) resumo esquemático da resposta axonal durante e após a transecção. 1. Cérebro normal, aparecendo axónios mielinizados. 2. Desmielinização é imunomediada 3. Até 11 mil axónios/mm³ na área de lesão são seccionados durante o processo desmielinizante. A extremidade distal do axónio seccionado degenera rapidamente enquanto a extremidade proximal conectada ao corpo celular neuronal sobrevive. Após transecção, o neurónio continua a transportar moléculas e organelos ao longo do axónio, e eles acumulam-se no local proximal da transecção (bolbos).

3.2.2.2. LESÕES CRÓNICAS INACTIVAS

Em lesões inactivas crónicas, o dano axonal é menos intenso mas ainda consideravelmente mais alto que o encontrado em controlos(90), sugerindo que este mecanismo de degeneração axonal continua nestas lesões, na ausência de inflamação.

Como referido anteriormente, a maioria dos axónios desmielinizados em lesões agudas sobrevive e as alterações axonais associadas a esta desmielinização podem reverter com o tempo. Os cérebros de doentes com EM, contudo, sofrem uma atrofia contínua em estadios mais avançados da doença, altura em que novas lesões desmielinizantes inflamatórias são raras, dando a entender mais uma vez que a degeneração axonal continua num ambiente que não o inflamatório. Alguns estudos sugerem que a degeneração axonal durante a EMPS, onde a inflamação não é tão acentuada, pode resultar de um efeito tardio secundário a uma desmielinização prévia durante a fase de RRMS.(91, 92) A transição de RRMS para a SPMS seria, assim, determinada pelo momento em que a perda axonal está para além daquilo que o SNC consegue compensar. Esta dedução de manutenção da função axonal por parte dos oligodendrócitos é apoiada em estudos animais, originalmente desenhados para investigar a função de proteínas da mielina durante a mielinização, nos quais foram utilizados ratinhos “null” para a glicoproteína associada à mielina (*MAG – myelin-associated glycoprotein*),(93, 94) uma fosfodiesterase (*CNP – 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*)(95) e a maior proteína estrutural da mielina, a proteína proteolípídica (*PLP – proteolipid protein*).(96, 97) Os ratos “null” para a MAG e a CNP tinham uma mielinização axonal surpreendentemente normal(95), enquanto que o último grupo, “null” para a PLP, têm uma compactação do SNC alterada. Não obstante, todas as linhas de ratos desenvolveram uma degeneração axonal progressivamente lenta e de começo tardio.(93-97) Estes trabalhos estabeleceram que os oligodendrócitos, para além de permitirem isolamento e protecção mecânica dos axónios, oferecem um suporte trófico que é essencial para a sobrevivência axonal a longo prazo.

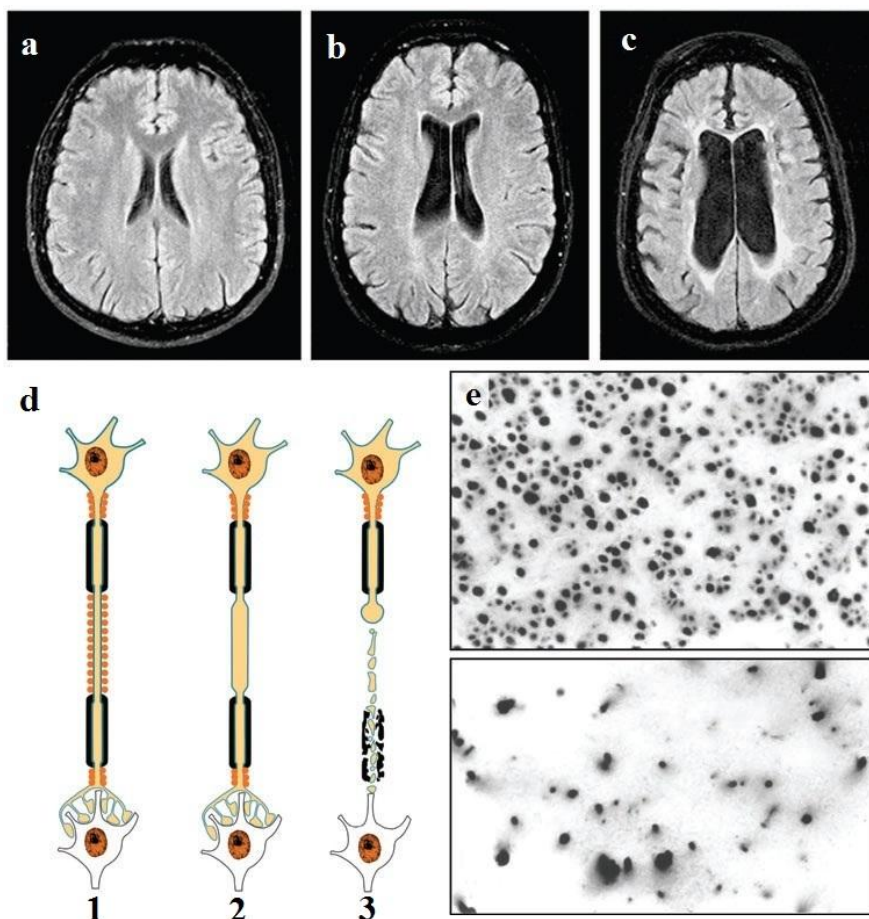
Conclui-se daqui que se a remoção de componentes minor da mielina, como a MAG ou CNP podem causar degeneração axonal sem afectar dramaticamente a estrutura da mielina, não deve surpreender que a perda de grandes segmentos de mielina durante décadas, como ocorre durante a evolução da EM, resulte em degeneração axonal.

Outros estudos apontam para a desmielinização como sendo causadora de aumento das necessidades energéticas da condução nervosa, sendo que a produção axoplásmica de ATP eventualmente torna-se comprometida em axónios desmielinizados ao longo do tempo. Esta necessidade aumentada de energia leva a um desequilíbrio iónico que aumenta o Ca^{2+} axoplásmico que eventualmente destrói o axónio. Isto pode ser explicado porque o ATP produzido em menores quantidades altera a função da Na^+/K^+ ATPase e o axónio desmielinizado não consegue “trocar” o Na^+ axoplasmático pelo K^+ extracelular. À medida que as concentrações de Na^+ vão aumentando dentro do axónio, existe um transportador dependente do ATP, a bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que é revertido funcionalmente e começa a trocar Na^+ axoplasmático pelo Ca^{2+} extracelular.(98, 99) O Ca^{2+} quando em excesso no axoplasma, causa um ciclo vicioso de activação de enzimas de degradação, uma função mitocondrial alterada, uma produção de energia ainda mais reduzida, um transporte axonal deficiente e ainda maior influxo de Ca^{2+} . Isto sugere também que muitos axónios com desmielinização crónica estão já funcionalmente “mortos” antes de degenerarem. Para além disto, o Ca^{2+} axoplasmático activa uma enzima, a calpaína, que se encontra aumentada em lesões crónicas. Ela parece contribuir para a fragmentação de neurofilamentos axonais e redução do número de mitocôndrias e microtúbulos, características estas que foram observadas em 50% dos axónios desmielinizados de lesões da medula espinhal de doentes com EM progressiva.(100)

Um processo diferente, agora nos neurónios destas lesões, parece contribuir igualmente para a degeneração crónica axonal e prende-se com o facto de que os neurónios

muito provavelmente são fonte de mitocôndrias defeituosas que são transportadas para os axónios cronicamente desmielinizados,(84) comprometendo a produção de ATP, que se faz notar ainda mais por uma maior demanda de energia nestes. Estas conclusões foram retiradas através do uso de *microarrays*, comparando o córtex cerebral de doentes e controles e verificando que nos primeiros, existiam genes mitocondriais, relacionados com os complexos I e III, com função diminuída. Em suma, todos estes insultos aos axónios tornam-nos cronicamente despolarizados, inexcitáveis, e incapazes de sustentar funções homeostáticas dependentes de uma produção suficiente de energia e de um gradiente de Na^+ normal.

Figura 4. Neurodegeneração em placas crônicas inativas (Adaptado de “Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?”, D. Trapp, B. e col. (2008))



Os axónios cronicamente desmielinizados degeneram devido à perda de mielina e suporte trófico. A contínua e irreversível perda de tecido cerebral ocorre durante a fase crónica da EM, apesar de uma redução dramática ou escassez de novas lesões desmielinizantes. (a) cérebro normal. (b) cérebro de um paciente de EMRR. (c) Cérebro de um paciente com EMPP na fase final da doença. Aumento progressivo do ventrículo. O volume destaca a atrofia cerebral que ocorre na maioria dos pacientes com esclerose múltipla avançada. (d) Degeneração crónica de axónios desmielinizados é um dos principais contribuintes para incapacidade neurológica e atrofia cerebral. 1. Os axónios mais desmielinizados sobrevivem à desmielinização, redistribuindo canais de Na^+ , e recuperam a função. 2. Devido à perda de mielina e suporte trófico, os axónios cronicamente desmielinizados mostram sinais de tumefacção lentamente progressivo e desorganização do citoesqueleto. 3. Estes axónios, eventualmente, degeneram.

3.3. INFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO: PROCESSOS INDEPENDENTES?

Como visto anteriormente, o processo inflamatório para além de provocar desmielinização, pode ser uma causa de agressão directa sobre axónios em lesões agudas e crónicas activas. Contudo, o dano neuronal e axonal continua em lesões crónicas inactivas e este paradigma tem sido alvo de muitos trabalhos de pesquisa, onde os autores tentam esclarecer se realmente esta destruição no SNC pode ser independente da inflamação.

Falhas nas terapêuticas com imunossuppressores e outras técnicas como transplantes autólogos de células hematopoiéticas, em estadios mais avançados da doença, têm demonstrado que a o mecanismo de lesão neurológica pode ocorrer na ausência de infiltrados inflamatórios. Estudos realizados demonstraram que não existiram efeitos na progressão da atrofia cerebral e incapacidade neurológica se o alemtuzumab, um anticorpo monoclonal anti-CD52, fosse administrado a doentes com SPMS, ao contrário do que acontecia em doentes numa fase inicial da doença, a RRMS. Estes últimos ao receberem esta terapêutica, antes de desenvolverem uma progressão secundária permaneciam clinicamente estáveis durante vários anos.(101) Esta constatação poderá sugerir que a inflamação provoca danos axonais nos estadios iniciais da doença mas que a neurodegeneração se torna independente da inflamação à medida que a doença progride. Noutros estudos,(102, 103) amostras de autópsias de doentes que foram submetidos a transplante autólogo hematopoiético revelaram que em todos os casos passou a existir quase uma ausência completa de marcadores inflamatórios no cérebro, nomeadamente relacionados com linfócitos T. Não obstante, foram encontradas no cérebro inclusões com coloração positiva para o APP, o marcador de dano axonal. Isto permitiu concluir que mesmo que o processo inflamatório tivesse sido abolido a neurodegeneração continuou a ocorrer nas lesões destes doentes, e que esta neurodegeneração não era uma consequência directa, pelo menos a curto prazo, de um ataque inflamatório contra o SNC. Estes estudos entram em acordo com outros efectuados com RM onde a taxa de atrofia

cerebral era alta em doentes que receberam também estes transplantes de células hematopoiéticas, doentes estes que tinham uma actividade inflamatória cerebral muito reduzida ou ausente.(104) Não obstante, outra explicação para isto poderá residir no facto de que a supressão de células T que são ainda normais e que participam na imunovigilância do SNC pode interromper a correcta regulação da função microglial, permitindo que esta microglia liberte indiscriminadamente substâncias tóxicas, que por sua vez lesam os neurónios.

Outras observações que poderão ter implicação na independência entre inflamação e neurodegeneração são encontrados nas lesões corticais de doentes com EM. Estas lesões podem ser leucocorticais, com substância branca e cinzenta afectadas em contiguidade, ou puramente corticais e microscopicamente são caracterizadas por desmielinização assim como pela presença de neurónios transectados e apoptóticos. Apesar disso, a extensão de infiltrados inflamatórios nestas lesões, em particular nas puramente corticais, é consideravelmente mais baixa do que a inflamação observada nas lesões da substância branca, com integridade mantida da BHE.(105, 106) Mais uma vez estes factos podem, contudo, ter outras explicações como a presença de menores quantidades de mielina no córtex ou por uma adaptação natural contra morte neuronal, não permitindo tirar conclusões concretas sem estudos.

Até há algumas décadas, tendo em conta estes dados e supondo que o processo degenerativo poderia ser independente do imune, suspeitava-se de que o primeiro surgiria cronologicamente mais tarde que o segundo. Mas e se o processo degenerativo precedesse a cascata inflamatória tão caracteristicamente observada na EM?

Vários estudos(107, 108) com RM mostram que mudanças focais subtis na substância branca podem ser observadas semanas antes de se formarem as lesões activas clássicas. Estas alterações, ao precederem o realce por gadolínio, indicativo de disrupção da BHE, podem

indicar eventos neurodegenerativos que ocorrem antes do processo inflamatório. Outro trabalho, também com recurso a esta técnica imagiológica encontrou um número substancial de mudanças focais na substância branca de doentes com EM numa fase muito inicial.(109) Estas lesões, às quais denominaram de **pré-ativas**, eram caracterizadas por uma inflamação perivascular muito frustre, activação da microglia e destruição oligodendrocítica marcada, apoiando a ideia de que não só a degeneração axonal pode ser independente inflamação, como esta degeneração pode mesmo ser o primeiro processo destrutivo na EM, como será discutido abaixo neste trabalho.

Todos estes dados sugerem que: i) a neurodegeneração pode ser uma consequência directa da destruição por componentes inflamatórios ou que por outro lado, ii) a destruição da mielina em determinados casos requer mecanismos imunológicos adicionais ou independentes e que a ideia geral de que uma resposta primária inflamatória é sempre responsável pela formação de lesões não é completamente correcta.

3.4. QUAL A VERDADEIRA PATOGÉNESE DA EM?: O PARADIGMA POR ESCLARECER.

3.4.1. Inflamação: um possível mecanismo primário à luz de diversas etiologias

Apesar de ser clara a presença de variadas células inflamatórias nas lesões da EM, a auto-imunidade primária ainda não foi inequivocamente comprovada. Os sistemas de modelos animais parecem apoiar os mecanismos imunológicos como causa da doença, como é o exemplo clássico da EAE, onde a transferência, para ratos, de constituintes da mielina ou linfócitos sensibilizados para estes geram lesões cerebrais muito semelhantes às da EM. Outros factores a favor incluem estudos(110, 111) que afirmaram a presença de linfócitos no LCR de doentes em todos os estadios da doença, incluindo os mais precoces e pressupondo assim que o processo inflamatório seria muito provavelmente aquele que despoletaria esta patologia. Uma resposta imune contra as proteínas constituintes da mielina estaria na base dos

acontecimentos, mas era necessário ainda explicar que mecanismos levariam um organismo a atacar as suas próprias estruturas nervosas e como conseguiria ultrapassar aquela que se sabe ser uma estrutura imunologicamente independente e dotada de uma barreira altamente selectiva, o SNC. Várias são as teorias que tentam explicar a razão desta auto-reactividade inflamatória e incluí-la como acontecimento inicial da doença. A mais debatida baseia-se na teoria do mimetismo molecular, em que durante uma infecção, porções de diferentes agentes patogénicos simulariam antígenos mielínicos, desencadeando uma resposta imunológica contra o próprio organismo. Por outro lado esta resposta poderia também ocorrer através de lesões em células neuronais, provocadas pelos mesmos microrganismos, com consequente libertação de antígenos. Por fim, uma outra hipótese considera que uma infecção provocaria uma cascata inflamatória excessiva com dano colateral às proteínas da mielina e alteração da BHE. Isto ocorreria em doentes que poderiam ser geneticamente propensos a uma desregulação imunológica ou indivíduos que por razões ambientais (como défices de vitamina D), estivessem mais susceptíveis de serem alvo de uma resposta inflamatória alterada ou terem uma menor capacidade orgânica de a controlar. A resposta a terapêuticas imunomodadoras e imunossupressoras, em estádios muito precoces da EM e o cumprimento de todos os critérios indirectos de uma doença auto-imune (Witebsky-Rose) são também factores a favor da implicação do processo inflamatório na etiopatogenia da doença. Um exemplo que tentou fundamentar igualmente esta teoria assenta num estudo(112) de uma biópsia, efectuada num doente com uma doença desmielinizante fulminante, que morreu alguns meses depois e que revelou um processo inflamatório com ausência de desmielinização. Meses depois, no *postmortem*, a autópsia cerebral diagnosticou esclerose múltipla. No trabalho concluiu-se que a formação de lesões pode começar com um

[Critérios de Witebsky-Rose: i) indução de um modelo experimental por antígenos da mielina; ii) transferência adoptiva da doença por linfócitos; iii) existência de modelos genéticos da doença e iv) identificação de anticorpos e linfócitos T auto-reactivos nas lesões desmielinizantes e em circulação nos doentes.]

mecanismo imune. A contestação da sua relevância baseia-se no facto da investigação se apoiar num só indivíduo. Numa outra pesquisa alegou-se que citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e outras provenientes de linfócitos T iniciariam a morte programada de oligodendrócitos, que por sua vez estimularia ainda mais a resposta inflamatória, culminando numa cascata auto-reactiva que incluía todo o tipo de glóbulos brancos.(113) Mesmo assim, manteve-se difícil relacionar a destruição destas células nervosas com a simples libertação de citocinas, já que a perda de OD não é uma característica típica de doenças como a EAE(114), a Encefalomielite Disseminada Aguda (EDA) e a Encefalomielite neoplástica (EN)(115), patologias nas quais a infiltração linfocítica é também regra. É assim difícil identificar as características neuropatológicas das alterações tecidulares iniciais já que isto requer, para além do cumprimento de códigos éticos e deontológicos, um número de autópsias e biópsias alto. Não obstante, muitos são ainda os autores que defendem esta teoria auto-imune primária, à luz de várias etiologias entre as quais as mais fortemente apoiadas:

3.4.1.1. Infecções

Duas grandes hipóteses ligam a infecção à EM: i) a hipótese da prevalência que sugere que o agente causador de doença é mais comum em áreas de maior risco de contrair EM; ii) a hipótese polio que defende que uma infecção precoce pode oferecer imunidade protectora. Uma terceira hipótese considerada, que no fundo é uma extensão da polio, é designada de hipótese da higiene e alega que várias infecções numa idade precoce protegem contra a EM, o que poderá explicar de certa forma o menor número de casos em países menos desenvolvidos.

Alterações imunológicas e respostas inflamatórias são encontradas em doentes com EM que apresentaram inicialmente infecção por diferentes microrganismos, entre eles Chlamydia Pneumonia, o Retrovírus Endógeno Humano (*HERV – Human Endogenous Retrovirus*)(116), o Herpes Virus 6 (*HHV6*)(117, 118) e o Vírus Epstein-Barr (*EBV – Epstein-*

Barr Virus). As evidências epidemiológicas favorecem o EBV(119), apoiadas em muitos estudos que demonstram para além de anticorpos contra este vírus, uma carga vírica elevada e alteração na função dos linfócitos T em doentes com EM.(120-123) Num conjunto de doentes pediátricos com EM seguidos num trabalho recente, foram analisadas titulações de anticorpos contra este e outros vírus comuns como EBV, CMV, parvovírus B19, Vírus Herpes Simplex e Varicela-Zoster. Aproximadamente 83% dos doentes tinham anticorpos contra o EBV, em comparação com os 42% dos controlos. Uma reactividade ligeiramente mais aumentada foi também encontrada para o Herpes Simplex tipo-1, mas nenhum outro patógeno mostrou alterações significativas na produção de imunoglobulinas.(124) Os anticorpos contra EBV eram específicos para proteínas do antígeno nuclear do EBV (*EBNA – Epstein-Barr nuclear antigen*)-1 e eram encontrados no LCR, sendo que este aparecimento de imunoglobulinas era anterior ao despoletar de sintomas característicos da EM e não parecia ser resultado de apenas uma desregulação imune inespecífica.(125) O LCR destas crianças tinha também maior frequência de Th1 específicos para o EBNA-1, que reconheciam um conjunto alargado de diferentes epitópos implicados nesta doença.(126, 127) Este tipo de perturbações não foi observado na resposta de linfócitos T a outros agentes como o CMV, sugerindo uma desregulação selectiva destas células em resposta à infecção apenas por EBV. Serafini et al.(128) encontraram evidência de infecção por este agente numa proporção considerável de células B e células plasmáticas em 21 de 22 casos de EM, ao contrário de outras doenças inflamatórias neurológicas.

Muitas destas pesquisas sugerem que oligodendrócitos e neurónios podem morrer enquanto meros espectadores de uma resposta de linfócitos TCD8⁺ a uma infecção por EBV, baseadas em observações que incluem a presença de proteína virusais latentes (regularmente expressas em lesões da EM), a existência de reactivações locais em folículos ectópicos de células B e em lesões agudas e a activação de linfócitos TCD8⁺ junto de células infectadas

com EBV. Outra relação forte entre EBV e EM encontra-se fundamentada em estudos que avaliaram o papel de uma proteína do stress, a α B-cristalina. Esta não é normalmente expressa em mielina humana de indivíduos saudáveis, mas na mielina de lesões na EM e em células B infectadas com EBV, sim. Esta proteína produz respostas fortes de linfócitos T nos humanos e promove produção de anticorpos contra o EBV e está presente no LCR de doentes e no soro de ratos com EAE. Este estudo confirmou que estes ratos normalmente são tolerantes à α B-cristalina e esta só é encefalotogénica em ratos transgênicos -/- para a proteína, quando existe uma infecção viral prévia, sugerindo a necessidade de um primeiro estímulo inflamatório.(129) Estes ratos são, então, alvo de uma EAE com maior secreção de citocinas por parte de células Th1 e Th17 e uma inflamação e apoptose oligodendrocítica mais marcada.(130) Assim, esta proteína parece ser tanto um regulador imune e um alvo para a resposta inflamatória, como um elo entre infecção e EM.

Apesar de todas estes fundamentos, muitas das pistas que ligam o EBV à EM podem significar apenas uma desregulação imune inerente à EM e podem ser consequência e não causa desta patologia. De notar que a teoria da infecção viral, apesar de ligada na maioria das vezes a processos inflamatórios iniciais, tem vindo a ser também utilizada para explicar fenómenos de oligodendropatia primária. Alterações semelhantes às encontradas em OD na EM têm sido observadas em doenças desmielinizantes inflamatórias induzidas por vírus, como a Leucoencefalopatia multifocal, realçando mais uma vez a dificuldade em estabelecer qual das duas, a inflamação ou neurodegeneração, é o verdadeiro mecanismo precursor da doença.

3.4.1.2. Genética

A única associação genética suficientemente forte e convincente está relacionada com uma desregulação entre os alelos DRB1*1501 e DRB5*0111, do complexo HLA classe II.(131,

132) O primeiro parece conferir risco acrescido, seleccionando células TCD4+ auto-reactivas, enquanto que o segundo é imuno-regulador, suprimindo a resposta inflamatória na EAE ao destruir linfócitos T reactivos em ratos transgénicos para estes genes.(133) Na EAE os genes do complexo MHC parecem interferir com a penetrância da EM, enquanto que outros loci modulam fenótipos específicos, como a localização topográfica das lesões desmielinizantes e a severidade do processo inflamatório. Estes aspectos poderão ser transpostos para a EM, nos humanos.

Outros possíveis alelos foram considerados na implicação genética da EM, mas com menor força ou com resultados inconclusivos. Entre eles estão: receptores da histamina e de várias citocinas, como o receptor- α da IL-2, 6, 7, 15 e 1, do TNF- α e da osteopontina.(134-136) Outros ainda parecem também ter maior transcrição em doentes com EM, como os ligados à sintetase de prostaglandinas.(135)

Existem por fim factores genéticos que parecem ser partilhados entre a EM e diferentes doenças auto-imunes, como a doença inflamatória intestinal e diabetes tipo I, onde parece existir um maior risco de contrair a doença, segundo alguns estudos.(137, 138) Estas conclusões não são consensuais em todos os estudos que englobam esta temática e a controvérsia poderá dever-se a diferenças metodológicas, que mais uma vez dificultam a obtenção de informações objectivas e seguras. Assim parece que a EM é uma doença em que múltiplos genes polimórficos de baixa penetrância interagem entre si, e que cada um possui um pequeno efeito no risco final de doença. Resta apurar se realmente esta relação genética se traduz num processo inflamatório inicial (que se apresenta como mais provável) ou se apenas torna os indivíduos mais propensos a responder imunologicamente de uma forma desregulada a um outro processo fisiopatológico como o degenerativo, considerado posteriormente neste trabalho.

3.4.1.3. Modificações ambientais

Trabalhos epidemiológicos(139) têm apontado dois agentes principais que podem potencialmente aumentar a probabilidade de existir EM num indivíduo. Eles são o tabaco e o défice de vitamina D. Parece mais provável que o mecanismo relacionado com o tabaco envolva os componentes do fumo do cigarro, uma hipótese apoiada por um estudo que demonstra um maior risco de desenvolver EM, através de evidências bioquímicas da exposição passiva ao fumo.(140) Um candidato molecular altamente atractivo para o explicar é o óxido nítrico, que parece ter um papel importante na desmielinização e perda axonal.(141) O fumo de cigarro tem um papel bem definido na susceptibilidade a doenças auto-imunes, sendo que o seu efeito biológico sobre o sistema imunológico é altamente provável.(142) Modelos animais têm sugerido que a exposição ao fumo afecta vários compartimentos do sistema imune, incluindo imunidade inata, linfócitos T, B e células Natural Killer.(143-145) Por sua vez, o défice de vitamina D parece ser explicado já que esta tem capacidade de evitar a proliferação de linfócitos, a síntese de quimiocinas e o tráfico de monócitos *in vivo* e de suprimir a EAE em modelos animais.(146) É também sugerido que baixos níveis desta vitamina causam uma redução nos níveis intra-celulares de glutathione, como tem sido demonstrado em astrócitos de rato(147), e uma capacidade limitada para reduzir espécies reactivas de oxigénio.

3.5. Neurodegeneração: uma nova perspectiva na fisiopatologia da EM?

Luchinetti e col.(148) há 11 anos atrás conduziram um estudo com 51 biópsias e 32 autópsias cerebrais, e recolheram amostras que continham lesões activas desmielinizantes, que foram posteriormente analisadas usando um largo espectro de marcadores neurobiológicos e imunológicos. Foram caracterizados os padrões lesivos encontrados nas amostras, baseados na perda de proteínas mielínicas, na geografia e extensão das placas, nos

padrões da destruição oligodendrocítica e na evidência imunopatológica de activação do Complemento. Apesar das lesões parecerem ser iguais em cada indivíduo, quando comparados os doentes entre si, estes possuíam placas com uma heterogeneidade de perfis patológicos significativa. Resumiram-se, então, estas características em 4 padrões diferentes: Padrão I e II com inflamação dominada por linfócitos T e macrófagos, sendo o padrão II distinguido do I por deposição proeminente imunoglobulinas e Complemento em áreas de desmielinização activa. Ambas continham zonas com placas “sombra”. O padrão III continha igualmente um infiltrado inflamatório, com perda total (por apoptose) de OD no seu centro inactivo. Nas margens das placas a perda era considerável com microglia activada, associada também a diminuição da proteína MAG. Por fim, o padrão IV à semelhança do I e III, não continha deposição de Ig ou Complemento, mas mantinha o infiltrado imune. Neste, a desmielinização estava relacionada com morte dos OD, adjacente às zonas de destruição da mielina. Porém esta perda quase completa de OD não estava associada a apoptose. Nenhum dos padrões III ou IV apresentaram indícios de placas “sombra”. Em suma, os padrões I e II assemelhavam-se mais a uma encefalomielite auto-imune e os padrões III e IV a uma distrofia oligodendrocítica. O padrão mais observado foi o padrão II seguido em número de casos pelos padrões III, I e finalmente o IV. O padrão I e II foram observados em doentes com todos os subtipos de EM, enquanto que o III era muito raramente encontrado em doentes com EM crónica, sendo mais frequente naqueles com evolução da doença inferior a 2 meses em relação à autópsia/biópsia. O padrão IV foi apenas encontrado em 3 doentes, todos com EMPP. Este trabalho acabou por não conseguir concluir se estes padrões lesivos permanecem constantes durante a evolução da doença ou se representam alterações no seu percurso, podendo por exemplo estar na origem da transição de EMRR para EMPS. Seriam estes padrões o espelho da heterogeneidade da EM e dos mecanismos múltiplos que a podem originar?

Tabela 1. Aspectos estruturais e imunológicos de diferentes padrões de atividade lesões da Esclerose Múltipla (Adaptado de “Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination”, Lucchinetti, C., MD e col. (2002))

| Feature | Pattern I | Pattern II | Pattern III | Pattern IV |
|----------------------------|-------------|------------|------------------|------------|
| Inflammation | | | | |
| Composition of Infiltrates | | | | |
| CD3 T cells | 197 ± 68 | 133 ± 18 | 145 ± 23 | 134 ± 71 |
| Plasma cells | 5.9 ± 1.9 | 9.3 ± 2.1 | 5.4 ± 1.6 | 3.8 |
| Macrophages | 1,158 ± 105 | 931 ± 71 | 842 ± 91 | 1,650 ± 30 |
| C9neo | – | ++ | – | – |
| Demyelination | | | | |
| Perivenous pattern | + | + | – | ± |
| Lesion edge | Sharp | Sharp | Ill-defined | Sharp |
| Concentric pattern | 0/10 | 0/45 | 8/25 | 0/3 |
| Oligodendrocytes | | | | |
| #OG in DM | 295 ± 73 | 249 ± 30 | 51 ± 24 | 55 ± 55 |
| DNA frag in OG | ± | ± | ++APO | ++PPWM |
| OG apoptosis | – | – | 14–37% | – |
| Myelin protein loss | Even | Even | MAG >> Others | Even |
| Remyelination | | | | |
| Shadow plaques | ++ | ++ | – | – |

Valores apresentados na tabela representam células por milímetro quadrado.

Legenda: # OG = densidade de oligodendrócitos no centro da placa inactiva desmielinizada; DNA frag in OG = oligodendrócitos que mostram fragmentação do DNA nuclear; OG apoptosis = morte celular por apoptose de oligodendrócitos em áreas lesionais activas; MAG = glicoproteína associada à mielina; PPWM = fragmentação de DNA em oligodendrócitos na substância branca da periplaca.

No sentido de apurar o mecanismo que inicia a EM, autores tiveram já a oportunidade de analisar o cérebro de um doente jovem com RRMS que faleceu depois de dezassete horas do início de sintomas por novas lesões. Eles observaram apenas uma apoptose extensa de oligodendrócitos numa pequena área circunscrita e consideraram este como sendo o primeiro mecanismos de formação de lesões naquele doente, revolucionando a ideia geral de que a EM é primariamente inflamatória, defendida pela maioria dos autores e apoiada actualmente por estudos patológicos, de imagem, serológicos e genéticos. Propuseram que a destruição destes OD causaria a activação de microglia residente no SNC e que esta iria fagocitar os detritos mielínicos. Como parte de uma cascata apoptótica iniciada, ocorreria a deposição de complemento activado na bainha de mielina que em poucos dias apareceria com vacúolos e atrairia monócitos. Estas observações propuseram a morte do OD como a causa da inflamação, estabelecendo uma reviravolta no paradigma que engloba o processo patológico

inicial desta doença. Neste estudo, de onze doentes com EM, seis tinham estas características nas lesões cerebrais encontradas e outros cinco não tinham, sublinhando mais uma vez a heterogeneidade e complexidade desta doença. Esta teoria é também suportada por evidências *in-vivo* noutro modelo animal que demonstra perda axonal generalizada evocando uma resposta inflamatória secundária na substância branca, depois de inactivada a função dos peroxisomas oligodendrocíticos.(149) Estas características caíam no espectro de lesões tipo III segundo Luchinetti, abrindo novos horizontes sobre a patogénese da EM, mas deixando a causa da oligodendropatia inapurada. Mesmo assim, várias causas foram sugeridas como a infecção dos OD por vírus, stress hipóxico secundário a isquemia, vasculite auto-imune ou dano infligido por citocinas e outros mediadores imunes derivados da microglia activada naquilo a que se pode chamar de “fogo cruzado”.

Torna-se, logicamente, necessário perceber se os quatro subtipos propostos por Luchinetti representam realmente padrões distintos únicos na história natural da doença de um indivíduo ou se é um espectro de mudança evolutiva à medida que a doença progride durante a vida do doente. Estudos recentes(150) baseados em autópsias identificaram patologia pré-fagocítica focal em locais que se correlacionavam anatomicamente com os sintomas clínicos de doentes que tinham morrido pouco tempo depois de recaídas. Foram na altura definidos dois achados: i)áreas circunscritas por OD exibindo características de apoptose (independentes da activação de caspases), sem relação com qualquer alteração vascular e ii)microglia ramificada muito activa, a qual aparecia maioritariamente junto dos OD apoptóticos. Outras mudanças pré-fagocíticas menos relevantes incluíam vacuolização da mielina com edema intramielínico. Infiltrados de células T não foram encontrados nestas lesões. Foi proposta que a microglia, quando activada, passaria por uma transformação fisiológica, convertendo-se em macrófagos amebóides, com uma actividade tipo “perseguidor”, em resposta a ligandos fagocíticos provenientes das membranas dos OD

apoptóticos.(151) Esta microglia activa libertaria citocinas que despertariam por sua vez uma cascata inflamatória. Foi ainda colocada a hipótese de que a microglia também se converteria em fenótipos semelhantes a células dendríticas mielóides, que migrariam do SNC para nódulos linfáticos periféricos, apresentando antigénios a linfócitos T e promovendo uma resposta inflamatória contra o SNC. Apoiando a ideia de que os padrões por Luchinetti seriam uma evolução no tempo da EM, existem trabalhos que encontraram em muitos doentes nos estadios iniciais da RMSS a exibição de um espectro de mudanças patológicas que englobavam ambos os padrões II e III de Luchinetti. Um estudo por Bo e col. apoia a ideia desta evolução das lesões, ao encontrar o padrão lesivo tipo II isolado em apenas 33 lesões desmielinizantes num total de 22 doentes retirados de um grupo alargado de indivíduos com EM. Para complementar, mais estudos revelaram, através da imunohistoquímica, que anormalidades observadas na RM se correlacionavam com *clusters* bem circunscritos de células microgliais activas na ausência de desmielinização. Este estado de activação da microglia foi comprovado através da expressão aumentada de HLA-DR e CD68.(152) Adjacente aos clusters, e mais raramente no seu seio, eram por vezes observados pequenos números de células CD45⁺ (leucócitos) no espaço perivascular.(153) Ocasionalmente eram também encontrados macrófagos espumosos. Juntas, estas características sugerem que este mecanismo parece preceder a formação das placas tradicionalmente observadas, e as lesões foram designadas pelos autores de pré-activas. Contudo, nem todas pareciam evoluir para lesões inflamatórias activas, já que o seu número ultrapassa em grande escala o número de lesões desmielinizantes, dando a concluir que muitas destas lesões pré-activas, involuem por si só e que as células macrofágicas espumosas tantas vezes observadas podem ter também um papel protector e promotor de reparação. Através destes trabalhos, surgiram então duas teorias que conciliam a pré-fagocitose e a patologia das lesões activas, ao mesmo tempo que incluem uma resposta imune mediada por linfócitos T: i) Morte dos OD desmascara um antigénio

ativador de uma resposta imune sistémica que amplifica o dano tecidual; ii) um antigénio externo provoca a apoptose dos OD e simultaneamente fornece o estímulo para a resposta inflamatória. Este último conceito não existe por acaso. Precedentes clínicos existem em casos de infecção do Sistema Nervoso Periférico (SNP), com *Mycobacterium Leprae*, onde as células de Schwann são preferencialmente afectadas através de uma proteína da sua parede celular (glicolípido fenólico I).(154) Esta proteína por si só, na ausência da bactéria, pode ter o mesmo efeito desmielinizante e despoletar uma resposta imune.(155)

Um outro trabalho que sugeriu que estas lesões pré-activas surgiriam antes das lesões tradicionais, usou a RM e um marcador que reflecte a presença de microglia activada, o receptor das benzodiazepinas. Este estava aumentado em regiões focais do cérebro aparentemente normais (NAWM), onde meses mais tarde se instalariam as lesões desmielinizantes típicas de EM.(156) Mais recentemente Barnett e Prineas(150) analisaram vários casos com curta duração dos episódios iniciais (entre 60 horas e 42 dias), e juntos concluíram que a formação de lesões parecia seguir esta linha cronológica de acontecimentos: i)Em algumas horas os OD tornavam-se apoptóticos (apenas com alguma microglia ramificada, sem células T ou macrófagos e com a fagocitose da mielina ainda por começar); ii) No prazo de 1-2 dias, os OD desapareciam quase totalmente (presumivelmente pela fagocitose da microglia amebóide) e a mielina tornava-se edemaciada e degenerada; iii) Depois disto, ocorreria a quimiotaxia de linfócitos T e macrófagos, enquanto percursores dos OD começariam a aparecer; iv) Dentro de 1-2 semanas, OD diferenciados reapareciam, possivelmente para o processo de remielinização. Henderson e col.(157) apoiaram esta teoria, usando a análise de processos apoptóticos dos OD e a distribuição das células inflamatórias em lesões e apresentaram pistas de que a morte dos OD e a activação da microglia, organizada em clusters, são os eventos iniciais na fisiopatologia das placas, seguidos de uma resposta imune contra a mielina destruída. Luchinetti contestou estes estudos, afirmando que estes

autores não tinham certeza do padrão encontrado nas autópsias/biópsias e que desconheciam a duração entre o início dos sintomas e a altura de recolha de amostras de tecido cerebral.

Em suma, as conclusões retiradas a partir de todos estes e outros estudos patológicos de lesões activas na EM acabam por ser limitadas. Se por um lado é difícil avaliar o tempo decorrido entre recolha de tecido e início da clínica, por outro, como o tecido cerebral é recolhido para estudo numa determinada altura e as mudanças iniciais nas lesões são muito rápidas, (ocorrendo entre horas a dias) estas podem estar já ausentes no momento de estudo das lesões, sendo que só seriam identificadas numa pequena fracção de espécimenes com patologia. Isto condiciona evidentemente a argumentação destes trabalhos já que as características mais precoces das lesões são as mais úteis em informação sobre a sua fisiopatologia. Apesar de tudo, os estudos por Barnett e Prineas(150) não encontraram pistas conclusivas para a causa desta apoptose oligodendrocítica. À semelhança do já mencionado anteriormente, foram propostas e revistas algumas etiologias para esta destruição, como dano oxidativos, citocinas, toxicidade do glutamato, alterações mitocondriais, determinados anticorpos(158) ou defeitos funcionais intrínsecos aos OD, mas sem conclusões certas.

4. CONCLUSÃO

Torna-se extremamente difícil obter uma ideia objectiva sobre o verdadeiro mecanismo primário da EM porque são múltiplas as variáveis, sujeitas a erro, que levam ao entendimento desta doença. Desde limitações na recolha e quantidade de dados, a questões éticas e metodologias usadas, as dificuldades acometidas pelas pesquisas realizadas nos últimos anos acabam, muitas vezes, por não permitir obter evidências conclusivas. Estas implicações acrescentam à complexidade e heterogeneidade da EM uma dificuldade ainda maior em descobrir o processo inicial que provoca a doença. Tem vindo a ser demonstrado

por estudos neuropatológicos e não restam dúvidas que está implicado na sua patologia um processo inflamatório que envolve sobretudo macrófagos e linfócitos, assim como uma desmielinização, destruição oligodendrocítica e perda axonal no SNC. Também parece bastante certo que estes dois processos, inflamatório e neurodegenerativo, apesar de intimamente relacionados na maioria das vezes, podem também apresentar-se como completamente independentes. No entanto, as dúvidas sobre a cronologia destes acontecimentos mantêm-se e existe até quem considere que ambos possam traduzir mecanismos precursores possíveis, consoante o doente e/ou a forma clínica.

As aberrações imunes encontradas nas lesões não são específicas da EM, já que se observam noutras doenças inflamatórias e até mesmo em patologias não inflamatórias, como a meningite asséptica e podem simplesmente representar epifenómenos ou mecanismos de restauração tecidual. É, portanto, muito difícil provar que a autoimunidade tem um papel primordial na EM e as evidências que existem são indirectas. Em contrapartida, pesquisas recentes, que se têm mostrado promissoras, observam a existência de oligodendropatia em doentes com estadios muito precoces, na ausência de inflamação, apontando para um mecanismo degenerativo inicial. Este, por sua vez, libertaria um conjunto de antigénios neuronais para a circulação sistémica e activaria secundariamente uma cascata imune. É necessário ainda muito trabalho para conseguir encontrar um elo de ligação entre todos estes achados e comprovar com maior acuidade estas afirmações, desvendando assim o mecanismo original que despoleta a EM.

BIBLIOGRAFIA

1. Pedrosa R, editor. Introdução à Esclerose Múltipla. Lisboa: Grupo de Estudos de Esclerose Múltipla; 2010.
2. Charcot JM. Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la sapetriere (ed. A. Delahaye & E. Lecrosnier). Paris: Cerf et fils. 1880.
3. Frommann C. Untersuchungen uber die Gewebsveranderungen bei der Multiplen Sklerose des Gehirns und Ruckenmarks. Jena: Gustav Fischer. 1878.
4. Carswell R. Pathological anatomy: illustrations on elementary forms of disease. London: Longman. 1838.
5. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain. Paris: Bailliere. 1841.
6. Rindfleisch E. Histologisches Detail zur grauen Degeneration von Gehirn und Ruckenmark. Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. (Virchow). 1863.
7. McFarland HF. The lesion in multiple sclerosis: clinical, pathological, and magnetic resonance imaging considerations. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1998 May;64 Suppl 1:S26-30.
8. Greer JM, Csurhes PA, Muller DM, Pender MP. Correlation of blood T cell and antibody reactivity to myelin proteins with HLA type and lesion localization in multiple sclerosis. J Immunol. 2008 May 1;180(9):6402-10.
9. Brosnan CF, Cannella B, Battistini L, Raine CS. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. Neurology. 1995 Jun;45(6 Suppl 6):S16-21.
10. Nowacki P, Potemkowski A, Korwin-Piotrowska T, Nocon D. Morphometric analysis of axons in the minute multiple sclerosis lesions and shadow plaques in patients with multiple sclerosis. Folia Neuropathol. 2000;38(3):104-10.
11. Babinski J. Recherches sur l'anatomie pathologique de la sclerose en plaque et etude comparative des diverses varietes de la scleroses de la moelle. Arch. Physiol. Normale et Pathologique (Paris). 1885.
12. Merrill JE. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. J Immunother (1991). 1992 Oct;12(3):167-70.
13. Zhang GX, Baker CM, Kolson DL, Rostami AM. Chemokines and chemokine receptors in the pathogenesis of multiple sclerosis. Mult Scler. 2000 Feb;6(1):3-13.
14. Link H. The cytokine storm in multiple sclerosis. Mult Scler. 1998 Feb;4(1):12-5.
15. Hohlfeld R, Londei M, Massacesi L, Salvetti M. T-cell autoimmunity in multiple sclerosis. Immunol Today. 1995 Jun;16(6):259-61.
16. Raine CS. Multiple sclerosis: a pivotal role for the T cell in lesion development. Neuropathol Appl Neurobiol. 1991 Aug;17(4):265-74.

17. Petry KG, Boullerne AI, Pousset F, Brochet B, Caille JM, Dousset V. Experimental allergic encephalomyelitis animal models for analyzing features of multiple sclerosis. *Pathol Biol (Paris)*. 2000 Feb;48(1):47-53.
18. Salvetti M, Massacesi L. Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: immunoregulatory mechanisms and T cell repertoires. *Cell Immunol*. 1992 Jun;142(1):217-9.
19. Martin R. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis and their application for new therapeutic strategies. *J Neural Transm Suppl*. 1997;49:53-67.
20. Raine CS. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl:S61-72.
21. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 1998 Mar;8(3):275-83.
22. Seder RA. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Dec;94(6 Pt 2):1195-202.
23. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007 Oct;13(10):1173-5.
24. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):566-73.
25. Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med*. 2004 Aug 2;200(3):273-6.
26. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. 2008 Jan;123(1):79-89.
27. van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, et al. Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology*. 1997 Aug;49(2):351-7.
28. Rep MH, van Oosten BW, Roos MT, Ader HJ, Polman CH, van Lier RA. Treatment with depleting CD4 monoclonal antibody results in a preferential loss of circulating naive T cells but does not affect IFN-gamma secreting TH1 cells in humans. *J Clin Invest*. 1997 May 1;99(9):2225-31.
29. Tsuchida T, Parker KC, Turner RV, McFarland HF, Coligan JE, Biddison WE. Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):10859-63.
30. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4222-31.

31. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*. 2002 Mar;125(Pt 3):538-50.
32. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2428-33.
33. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000 Aug 7;192(3):393-404.
34. Howe CL, Ure D, Adelson JD, LaFrance-Corey R, Johnson A, Rodriguez M. CD8+ T cells directed against a viral peptide contribute to loss of motor function by disrupting axonal transport in a viral model of fulminant demyelination. *J Neuroimmunol*. 2007 Aug;188(1-2):13-21.
35. Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, Ratts RB, Brenchley JM, Ambrozak DR, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(5):641-9.
36. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986 Dec 1;137(11):3436-9.
37. Mussini JM, Hauw JJ, Delasnerie N, Schuller E, Escourolle R. Intracytoplasmic immunoglobulin-binding lymphoid cells (IgGLC) of the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological disorders. *Ann Immunol (Paris)*. 1980 Jan-Feb;131C(1):55-67.
38. Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today*. 1994 May;15(5):218-24.
39. Willenborg DO, Prowse SJ. Immunoglobulin-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1983 Oct;5(2):99-109.
40. Sellebjerg F, Christiansen M, Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1998 Jun;4(3):127-31.
41. Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gilden DH. Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2725-33.
42. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, et al. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2499-504.
43. Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, Aloisi F. Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2004 Mar;148(1-2):11-23.
44. Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, et al. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 27;101(30):11064-9.

45. Scolding NJ, Compston DA. Oligodendrocyte-macrophage interactions in vitro triggered by specific antibodies. *Immunology*. 1991 Jan;72(1):127-32.
46. Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, Miller SD. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):265-74.
47. Rajan AJ, Gao YL, Raine CS, Brosnan CF. A pathogenic role for gamma delta T cells in relapsing-remitting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):941-9.
48. Adams CW, Poston RN. Macrophage histology in paraffin-embedded multiple sclerosis plaques is demonstrated by the monoclonal pan-macrophage marker HAM-56: correlation with chronicity of the lesion. *Acta Neuropathol*. 1990;80(2):208-11.
49. Woodroffe MN, Bellamy AS, Feldmann M, Davison AN, Cuzner ML. Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J Neurol Sci*. 1986 Jul;74(2-3):135-52.
50. Diemel LT, Copelman CA, Cuzner ML. Macrophages in CNS remyelination: friend or foe? *Neurochem Res*. 1998 Mar;23(3):341-7.
51. Airas L, Saraste M, Rinta S, Elovaara I, Huang YH, Wiendl H. Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. *Clin Exp Immunol*. 2008 Feb;151(2):235-43.
52. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci*. 2007 Jun;28(3):121-6.
53. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5941-6.
54. Barna BP, Chou SM, Ransohoff RM, Jacobs B. Astrocyte interactions with immune modifiers: a possible role for astrocytes in the immunopathogenesis of multiple sclerosis (MS). *Prog Clin Biol Res*. 1984;146:153-7.
55. Brock TO, O'Callaghan JP. Quantitative changes in the synaptic vesicle proteins synapsin I and p38 and the astrocyte-specific protein glial fibrillary acidic protein are associated with chemical-induced injury to the rat central nervous system. *J Neurosci*. 1987 Apr;7(4):931-42.
56. De Keyser J, Zeinstra E, Frohman E. Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch Neurol*. 2003 Jan;60(1):132-6.
57. Nakamura A, Johns EJ, Imaizumi A, Abe T, Kohsaka T. Regulation of tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by beta2-adrenoceptor in the rat astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1998 Aug 1;88(1-2):144-53.
58. De Keyser J, Wilczak N, Leta R, Streetland C. Astrocytes in multiple sclerosis lack beta-2 adrenergic receptors. *Neurology*. 1999 Nov 10;53(8):1628-33.

59. Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *J Neuroimmunol*. 1993 Jul;46(1-2):19-24.
60. Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG. Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2684-90.
61. Sanchez-Abarca LI, Taberner A, Medina JM. Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. *Glia*. 2001 Dec;36(3):321-9.
62. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 1997 Mar;120 (Pt 3):393-9.
63. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998 Jan 29;338(5):278-85.
64. Ganter P, Prince C, Esiri MM. Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999 Dec;25(6):459-67.
65. Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain*. 2000 Feb;123 (Pt 2):308-17.
66. Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology*. 2001 Oct 9;57(7):1248-52.
67. Narayana PA, Doyle TJ, Lai D, Wolinsky JS. Serial proton magnetic resonance spectroscopic imaging, contrast-enhanced magnetic resonance imaging, and quantitative lesion volumetry in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1998 Jan;43(1):56-71.
68. Schirmer L, Antel JP, Bruck W, Stadelmann C. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2011 Jul;21(4):428-40.
69. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*. 2000 Jun;123 (Pt 6):1174-83.
70. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain*. 1997 May;120 (Pt 5):865-916.
71. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, Mork S, Choi S, Kong PA, et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol*. 1994 Nov;36(5):778-86.
72. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002 Aug;1(4):232-41.
73. Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*. 2001 Jun;158(6):2057-66.
74. McDonald LJ, Moss J. Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 1;90(13):6238-41.

75. Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Nitric oxide blocks fast, slow, and persistent Na⁺ channels in C-type DRG neurons by S-nitrosylation. *J Neurophysiol*. 2002 Feb;87(2):761-75.
76. Muriel P, Castaneda G, Ortega M, Noel F. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. *J Appl Toxicol*. 2003 Jul-Aug;23(4):275-8.
77. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002 Dec 1;33(11):1440-50.
78. Lassmann H. Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci*. 2003 Feb 15;206(2):187-91.
79. Kim JY, Shen S, Dietz K, He Y, Howell O, Reynolds R, et al. HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat Neurosci*. 2010 Feb;13(2):180-9.
80. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 1994 Mar 3;330(9):613-22.
81. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Sanchez-Gomez MV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci*. 2001 Apr;24(4):224-30.
82. Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*. 2003 May 1;23(9):3588-96.
83. Parpura V, Scemes E, Spray DC. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int*. 2004 Jul-Aug;45(2-3):259-64.
84. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):478-89.
85. Reddy H, Narayanan S, Arnoutelis R, Jenkinson M, Antel J, Matthews PM, et al. Evidence for adaptive functional changes in the cerebral cortex with axonal injury from multiple sclerosis. *Brain*. 2000 Nov;123 (Pt 11):2314-20.
86. Pantano P, Iannetti GD, Caramia F, Mainero C, Di Legge S, Bozzao L, et al. Cortical motor reorganization after a single clinical attack of multiple sclerosis. *Brain*. 2002 Jul;125(Pt 7):1607-15.
87. Parry AM, Scott RB, Palace J, Smith S, Matthews PM. Potentially adaptive functional changes in cognitive processing for patients with multiple sclerosis and their acute modulation by rivastigmine. *Brain*. 2003 Dec;126(Pt 12):2750-60.
88. Rocca MA, Mezzapesa DM, Falini A, Ghezzi A, Martinelli V, Scotti G, et al. Evidence for axonal pathology and adaptive cortical reorganization in patients at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neuroimage*. 2003 Apr;18(4):847-55.
89. Morgen K, Sammer G, Courtney SM, Wolters T, Melchior H, Blecker CR, et al. Distinct mechanisms of altered brain activation in patients with multiple sclerosis. *Neuroimage*. 2007 Sep 1;37(3):937-46.

90. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 2002 Oct;125(Pt 10):2202-12.
91. Hampton DW, Anderson J, Pryce G, Irvine KA, Giovannoni G, Fawcett JW, et al. An experimental model of secondary progressive multiple sclerosis that shows regional variation in gliosis, remyelination, axonal and neuronal loss. *J Neuroimmunol*. 2008 Sep 15;201-202:200-11.
92. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI. A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 1994 Aug;117 (Pt 4):759-65.
93. Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, et al. Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature*. 1994 Jun 30;369(6483):747-50.
94. Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, et al. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci*. 1998 Mar 15;18(6):1953-62.
95. Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, et al. Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):366-74.
96. Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, et al. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*. 1997 Jan;18(1):59-70.
97. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, et al. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*. 1998 Jun 5;280(5369):1610-3.
98. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci*. 1992 Feb;12(2):430-9.
99. Li S, Jiang Q, Stys PK. Important role of reverse Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchange in spinal cord white matter injury at physiological temperature. *J Neurophysiol*. 2000 Aug;84(2):1116-9.
100. Shields DC, Schaefer KE, Saido TC, Banik NL. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11486-91.
101. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *J Neurol*. 2006 Jan;253(1):98-108.
102. Fassas A, Passweg JR, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kozak T, Havrdova E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol*. 2002 Aug;249(8):1088-97.
103. Mancardi GL, Saccardi R, Filippi M, Gualandi F, Murialdo A, Inglese M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology*. 2001 Jul 10;57(1):62-8.

104. Inglese M, Mancardi GL, Pagani E, Rocca MA, Murialdo A, Saccardi R, et al. Brain tissue loss occurs after suppression of enhancement in patients with multiple sclerosis treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Apr;75(4):643-4.
105. Bo L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mork SJ. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler*. 2003 Aug;9(4):323-31.
106. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 2001 Sep;50(3):389-400.
107. Filippi M, Rocca MA, Martino G, Horsfield MA, Comi G. Magnetization transfer changes in the normal appearing white matter precede the appearance of enhancing lesions in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1998 Jun;43(6):809-14.
108. Tortorella P, Rocca MA, Mezzapesa DM, Ghezzi A, Lamantia L, Comi G, et al. MRI quantification of gray and white matter damage in patients with early-onset multiple sclerosis. *J Neurol*. 2006 Jul;253(7):903-7.
109. De Groot CJ, Bergers E, Kamphorst W, Ravid R, Polman CH, Barkhof F, et al. Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain*. 2001 Aug;124(Pt 8):1635-45.
110. Noronha AB, Richman DP, Arnason BG. Detection of in vivo stimulated cerebrospinal-fluid lymphocytes by flow cytometry in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1980 Sep 25;303(13):713-7.
111. Reunanen MI. Spontaneous proliferation of cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis. A longitudinal study. *J Neuroimmunol*. 1982 Dec;3(4):275-83.
112. Bitsch A, Wegener C, da Costa C, Bunkowski S, Reimers CD, Prange HW, et al. Lesion development in Marburg's type of acute multiple sclerosis: from inflammation to demyelination. *Mult Scler*. 1999 Jun;5(3):138-46.
113. Jurewicz A, Matysiak M, Tybor K, Kilianek L, Raine CS, Selmaj K. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain*. 2005 Nov;128(Pt 11):2675-88.
114. Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol*. 1999 Aug;46(2):144-60.
115. Barnett M, Prosser J, Sutton I, Halmagyi GM, Davies L, Harper C, et al. Paraneoplastic brain stem encephalitis in a woman with anti-Ma2 antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Feb;70(2):222-5.
116. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, et al. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol*. 2007 Jan;88(Pt 1):264-74.
117. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolome M, Picazo JJ, Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol*. 2004 Oct;61(10):1523-7.

118. Opsahl ML, Kennedy PG. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain*. 2005 Mar;128(Pt 3):516-27.
119. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007 Apr;61(4):288-99.
120. Munch M, Hvas J, Christensen T, Moller-Larsen A, Haahr S. The implications of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis--a review. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1997;169:59-64.
121. Hollsberg P, Hansen HJ, Haahr S. Altered CD8+ T cell responses to selected Epstein-Barr virus immunodominant epitopes in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2003 Apr;132(1):137-43.
122. Wagner HJ, Munger KL, Ascherio A. Plasma viral load of Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2004 Dec;11(12):833-4.
123. Holmoy T, Kvale EO, Vartdal F. Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol*. 2004 Oct;10(5):278-83.
124. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA*. 2004 Apr 21;291(15):1875-9.
125. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. 2006 Jun;63(6):839-44.
126. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1352-60.
127. Lunemann JD, Frey O, Eidner T, Baier M, Roberts S, Sashihara J, et al. Increased frequency of EBV-specific effector memory CD8+ T cells correlates with higher viral load in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2008 Jul 15;181(2):991-1000.
128. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 2007 Nov 26;204(12):2899-912.
129. Verbeek R, van Dongen H, Wawrousek EF, Amor S, van Noort JM. Induction of EAE by T cells specific for alpha B-crystallin depends on prior viral infection in the CNS. *Int Immunol*. 2007 Mar;19(3):277-85.
130. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, et al. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):474-9.
131. Ramagopalan SV, Morris AP, Dyment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet*. 2007 Sep;3(9):1607-13.
132. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, et al. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet*. 2004 Jan;74(1):160-7.

133. Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, Thomsen AR, et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature*. 2006 Oct 5;443(7111):574-7.
134. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1083-91.
135. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30;357(9):851-62.
136. Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1108-13.
137. Forte GI, Ragonese P, Salemi G, Scola L, Candore G, D'Amelio M, et al. Search for genetic factors associated with susceptibility to multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 May;1067:264-9.
138. Rasmussen HB, Clausen J. Genetic risk factors in multiple sclerosis and approaches to their identification. *J Neurovirol*. 2000 May;6 Suppl 2:S23-7.
139. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007 Jun;61(6):504-13.
140. Sundstrom P, Nystrom L, Hallmans G. Smoke exposure increases the risk for multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2008 Jun;15(6):579-83.
141. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol*. 1999 Jan;9(1):69-92.
142. George J, Levy Y, Shoenfeld Y. Smoking and immunity: an additional player in the mosaic of autoimmunity. *Scand J Immunol*. 1997 Jan;45(1):1-6.
143. Green RM, Gally F, Keeney JG, Alper S, Gao B, Han M, et al. Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: a *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS One*. 2009;4(8):e6860.
144. Fusby JS, Kassmeier MD, Palmer VL, Perry GA, Anderson DK, Hackfort BT, et al. Cigarette smoke-induced effects on bone marrow B-cell subsets and CD4+:CD8+ T-cell ratios are reversed by smoking cessation: influence of bone mass on immune cell response to and recovery from smoke exposure. *Inhal Toxicol*. 2010 Aug;22(9):785-96.
145. Motz GT, Eppert BL, Wortham BW, Amos-Kroohs RM, Flury JL, Wesselkamper SC, et al. Chronic cigarette smoke exposure primes NK cell activation in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2010 Apr 15;184(8):4460-9.
146. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, Hayes CE. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *J Neurosci Res*. 2007 Aug 15;85(11):2480-90.
147. Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem*. 1999 Aug;73(2):859-66.

148. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000 Jun;47(6):707-17.
149. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brugger B, Mildner A, Werner HB, et al. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet*. 2007 Aug;39(8):969-76.
150. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 2004 Apr;55(4):458-68.
151. Barnett MH, Henderson AP, Prineas JW. The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler*. 2006 Apr;12(2):121-32.
152. Fischer HG, Reichmann G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2717-26.
153. van der Valk P, De Groot CJ. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2000 Feb;26(1):2-10.
154. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000 Oct 27;103(3):511-24.
155. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*. 2002 May 3;296(5569):927-31.
156. Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer F, Heppner F, et al. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain*. 2000 Nov;123 (Pt 11):2321-37.
157. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009 Dec;66(6):739-53.
158. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):37-53.

AGRADECIMENTOS

À minha família que, sempre à sua maneira, me ajuda em caminhos difíceis.

Aos meus amigos, os mais próximos e mais afastados, por me permitirem bons momentos, me darem apoio e por me auxiliarem no desenvolver deste trabalho, mesmo sem saber.

À minha orientadora, Dr.^a Lúvia Sousa, e co-orientadora, Dr.^a Sónia Batista, pela disponibilidade, partilha de conhecimentos e capacidade de me manter no caminho certo para elaborar este artigo.

Por fim, a todas as outras pessoas que contribuíram para que este trabalho tivesse sempre lugar para melhorar.

"No meio de toda dificuldade, existe sempre uma oportunidade"

Albert Einstein