

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA

MARCUS VINÍCIUS MAGNO GONÇALVES

**PERFIL PLASMÁTICO DOS POTENCIAIS BIOMARCADORES IMUNES NOS
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA REMITENTE RECORRENTE EM
UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO**

Niterói
2019

MARCUS VINÍCIUS MAGNO GONÇALVES

**PERFIL PLASMÁTICO DOS POTENCIAIS BIOMARCADORES IMUNES NOS
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA REMITENTE RECORRENTE EM
UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Neurologia

Linha de Pesquisa: Neuroimunologia
Clínica

Orientador:

Prof. Dr. Jefferson Becker

Co-orientador:

Prof. Dr. Osvaldo J.M. do Nascimento

Niterói
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

G635p Gonçalves, Marcus Vinícius Magno
Perfil plasmático dos biomarcadores imunes nos
pacientes com esclerose múltipla remitente recorrente
em um ensaio clínico controlado / Marcus Vinícius Magno
Gonçalves; Jefferson Becker, orientador; Osvaldo José
Moreira do Nascimento, coorientador. Niterói, 2019.
116 f.

Tese (Doutorado em Neurologia)- Universidade Federal
Fluminense, Niterói, 2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMN.2019.d.00386520992>

1. Esclerose Múltipla. 2. Cloridrato de Fingolimode.
3. Citocina. 4. Biomarcadores. 5. Produção intelectual.
I. Becker, Jefferson, orientador. II. Nascimento, Osvaldo
José Moreira do, coorientador. III. Universidade Federal
Fluminense. Faculdade de Medicina. IV. Título

CDD 616.834

MARCUS VINÍCIUS MAGNO GONÇALVES

**PERFIL PLASMÁTICO DOS POTENCIAIS BIOMARCADORES IMUNES NOS
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA REMITENTE RECORRENTE EM
UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Neurologia

Linha de Pesquisa: Neuroimunologia
Clínica

Aprovada em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Moreira Filho

Prof(a). Dr(a). Isabella D`Andrea Meira

Prof(a). Dr(a). Soniza Vieira Alves Leon

Prof(a). Dr(a). Maria Lucia Vellutini Pimentel

Prof(a). Dr(a). Fabricia Lima Fontes-Dantas

Niterói
2019

A Deus, Senhor de todas as coisas.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, exemplo e dedicação.

À minha esposa pela compreensão e apoio.

Às minhas amadas filhas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Jefferson Becker, pela amizade, aprendizado, paciência, ensinamentos e convivência, fundamentais para minha formação profissional e pessoal

Ao professor Osvaldo José Moreira do Nascimento, pela amizade, oportunidades e ensinamentos proporcionados na neurologia.

À professora Yara Dadalti Fragoso, responsável pela minha grande paixão pela neuroimunologia, ainda na residência, pelos ensinamentos e eternos incentivos.

Aos amigos do ICB USP, em especial aos colegas Wesley Nogueira Brandão e Jean Pierre Schatzmann, por todo apoio no doutorado, pelos anos de convivência, aprendizado e cumplicidade.

Aos colegas do INSCER Giordani Passos, Gabriela Löw Pagliarini, Daniel Marinowic e à professora Denise Cantarelli Machado, pelo apoio no doutorado, aprendizado e cumplicidade.

Aos pacientes portadores de esclerose múltipla, minha gratidão.

Aos meus pais, Gilmar e Eneida, aos meus irmãos Igor e Thiago, à minha esposa Camila e às minhas filhas Luísa e Liz pelo amor, carinho, paciência e compreensão.

A verdadeira viagem das nossas vidas se faz unicamente nas nossas
memórias.
Marcel Proust (1871-1922)

RESUMO

Introdução: Biomarcadores imunes que possam auxiliar no tratamento de pacientes com esclerose múltipla (EM) em uso de fingolimode ainda não estão definidos. Sendo assim, decidiu-se avaliar esses parâmetros em pacientes com esclerose múltipla remitente recorrente (EMRR) virgens de tratamento e que iniciaram fingolimode, comparados a pacientes com EMRR tratados com imunomoduladores e que, posteriormente, migraram para o fingolimode.

Objetivo: Identificar possíveis biomarcadores imunes nos pacientes com EMRR em tratamento com fingolimode. **Material e Métodos:** Ensaio clínico controlado não randomizado. Avaliaram-se as concentrações plasmáticas de onze biomarcadores imunes dos 11 biomarcadores imunes : sCD40L, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-31, IL-33, TNF- α e IFN- γ , em dois grupos de pacientes, quais sejam: o Grupo 1 (n=12), formado por pacientes com EMRR em tratamento com acetato de glatirâmer (AG) ou betainterferona (IFN- β) e que, após 6 meses, modificaram a terapia para fingolimode; e o Grupo 2 (n=12), formado por pacientes com EMRR previamente virgens de tratamento que iniciaram fingolimode na primeira visita. Foi utilizado ANOVA *two-way* para avaliar os biomarcadores e o coeficiente de *Spearman rho* para estudo de correlação. **Resultados:** Dois biomarcadores plasmáticos foram identificados, a IL-31 e o receptor solúvel sCD40L, os quais reduziram de forma correlata seus níveis plasmáticos nos pacientes com EMRR tratados com fingolimode ($r=0,834$ $p<0,001$). Foi possível verificar que o Grupo 1 apresentou uma redução significativa da IL-31 e do receptor sCD40L após 12 meses de tratamento ($p<0,001$), sendo mais acentuada após 6 meses de tratamento com fingolimode apenas para a IL-31 ($p<0,05$). No Grupo 1, a redução da IL-31 se correlacionou com a redução da IL-33 ($r=0,762$; $p<0,05$) e a redução do receptor sCD40L se correlacionou com a redução da IL-1 β ($r=0,800$; $p<0,05$) e IL-17A ($r=0,782$ $p<0,05$). No Grupo 2, houve uma redução no número de surtos por tempo de doença-ano ($p<0,001$) e no escore do EDSS ($p<0,05$) após 12 meses de tratamento, acompanhado de uma redução dos níveis da IL-31 ($p<0,001$) e do receptor sCD40L ($p<0,05$), que se acentuaram após 6 meses de tratamento ($p<0,05$). No Grupo 2, o receptor sCD40L se correlacionou com a redução dos níveis do TNF- α ($r=0,882$; $p<0,001$), IL-17A ($r=0,443$; $p<0,001$), IL-17-F ($r=0,881$; $p<0,05$), IL-21 ($r=0,688$; $p<0,05$) e IFN- γ ($r=0,605$; $p<0,05$) e a IL-31 se correlacionou inversamente com o número de lesões nas sequências ponderadas em T2/*FLAIR* ($r=-0,591$; $p<0,05$). **Conclusões:** O estudo forneceu dados convincentes sobre a existência de dois promissores biomarcadores imunes, IL-31 e o receptor sCD40L, que reduziram seus níveis plasmáticos nos pacientes com EMRR tratados com fingolimode.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. IL-31. sCD40L. Fingolimode.

ABSTRACT

Introduction: Immune biomarkers that might be used in the treatment of patients with multiple sclerosis (MS) using fingolimod are not yet defined. Therefore, the need to evaluate such parameters in treatment-naïve relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients who started fingolimod was set, as well as its comparison to RRMS patients treated with immunomodulators and who subsequently migrated to fingolimod. **Objective:** To identify possible immune biomarkers in RRMS patients under fingolimod treatment. **Material and Methods:** Non-randomized controlled clinical trial Eleven plasma immune biomarkers: sCD40L, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-31, IL-33, TNF- α e IFN- γ were evaluated in two patient groups. Group 1 (n = 12) was made of RRMS patients on treatment with glatiramer acetate (GA) or interferon-beta (IFN- β) who switched to fingolimod after six months. Group 2 (n = 12), in turn, was made of previously untreated RRMS patients who started fingolimod therapy. ANOVA two-way was used for biomarkers' analysis and *Spearman rho* coefficient was used for correlation study. **Results:** Two plasma biomarkers were identified, IL-31 and sCD40L receptor, which correlated their plasma levels ($p < 0.001$) in patients with RRMS treated with fingolimod ($r=0.834$; $p < 0,001$). Group 1 showed significant reduction in IL-31 and the sCD40L after 12 months of treatment ($p < 0,001$). However, IL-31 had a sharper reduction after 6 months of fingolimod treatment ($p < 0,05$). In group 1, IL31 reduction correlated to IL33 ($r=0.762$; $p < 0,05$) and the receptor sCD40L reduction correlated to IL1- β ($r=0.800$; $p < 0,05$) and IL-17A ($r=0.782$; $p < 0,05$) decrease. In group 2, there was a reduction in the number of relapses ($p < 0,001$) and in EDSS score ($p < 0,05$) after the 12-month treatment. Moreover, there was a reduction in IL31 ($p < 0,001$) and sCD40L ($p < 0,05$) levels, which became sharper after six months of treatment ($p < 0,05$). In group 2, sCD40L correlated to the reduction of TNF- α ($r=0.882$; $p < 0,001$), IL-17A ($r=0.443$; $p < 0.001$), IL-17F ($r=0.881$; $p < 0,05$), IL-21 ($r=0.688$; $p < 0,05$) and IFN- γ ($r=0.605$; $p < 0,05$) levels and and IL-31 correlated inversely with the number of lesions in the T2 / FLAIR-weighted sequences. **Conclusions:** This study provided compelling data on the existence of two promising biomarkers, IL-31 and sCD40L receptor, which reduced their plasma levels in RRMS patients under fingolimod treatment.

Keywords: Multiple Sclerosis. IL-31. sCD40L. Fingolimod.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adaptada do manual de instruções do kit Bio-plex Pro Human Th17 Cytokine Assay da Bio-Rad.....	56
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios Diagnósticos de McDonald (2010) no Diagnóstico de Esclerose Múltipla	29
Quadro 2 – Principais citocinas indutoras e seus linfócitos correspondentes ..	42
Quadro 3 – Desenho do estudo.....	51
Quadro 4 – Avaliações realizadas em cada visita.....	51
Quadro 5 – Evolução plasmática dos biomarcadores no grupo 1	63
Quadro 6 – Evolução plasmática dos biomarcadores no grupo 2.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Associação das variáveis do estudo entre os dois grupos.....	59
Tabela 2 – Subtipo de imunomodulador em uso na 1ª visita.....	60
Tabela 3 – Comparação do número de surtos por tempo de doença-ano para cada grupo.....	61
Tabela 4 – Comparação da Média do EDSS entre a 1ª visita e aos 12 meses para cada grupo	62
Tabela 5 – Concentração dos biomarcadores nos dois grupos nas três visitas em pg/ml	63
Tabela 6 – Correlação dos biomarcadores IL-31 e sCD40L avaliando os grupos conjuntamente	66
Tabela 7 – Correlação dos biomarcadores IL-31 e sCD40L no grupo 1 avaliando os 12 meses do estudo	67
Tabela 8 – Correlação dos biomarcadores IL-31 e sCD40L no grupo 2 avaliando os 12 meses do estudo	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de surtos por tempo de doença-ano nos grupos 1 e 2	61
Gráfico 2 – Média do escore EDSS na primeira visita e aos 12 meses nos Grupos 1 e 2	62
Gráfico 3 – Nível plasmático da IL-31 por grupos	65
Gráfico 4 – Nível plasmático do receptor sCD40L por grupos	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Acetato de Glatirâmer
ALZ	Alentuzumabe
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
AR	Artrite Reumatoide
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
BAFF	<i>B-cell Activating Factor of the TNF Family</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BG12	Dimetil Fumarato
BOC	Bandas Oligoclonais
CD163	Proteína de membrana de macrófago
CD40	Proteína de membrana da superfamília do receptor TNF α
CD40L	Receptor não solúvel ligante à proteína de membrana CD40
CMV	Citomegalovírus
CTLs	Controles
CXCL13	<i>C-X-C motif chemokine 13</i>
DIS	<i>Dissemination in Space</i>
DIT	<i>Dissemination in Time</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DN	Doenças neuroinflamatórias
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
EBNAs	Antígenos Nucleares do EBV
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDSS	<i>Kurtzke Expanded Disability Status Scale</i>
EM	Esclerose Múltipla
EMCD	Esclerose Múltipla Clinicamente Definida
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i>
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>

HH-4	Herpes Vírus 4
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICB	Instituto De Ciências Biológicas
IFN- β	Interferon Beta
IFN- γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina IgG
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IMC	Índice De Massa Corporal
INSCER	Instituto Do Cérebro Do Rio Grande do Sul
FLAIR	<i>T2 weighted fluid attenuated inversion recovery</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MCs	Mastócitos
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	MicroRNA (Partículas não codificáveis de RNA)
MMP	Metaloproteinases
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
NAbs	Anticorpos Neutralizantes
NEDA	<i>No Evidence of Disease Activity</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NMO	Neuromielite Óptica
NTZ	Natalizumabe
OMS	Organização Mundial De Saúde
PLP	<i>Proteolipid Protein</i>
PLEx	<i>Plasma Exchange</i>
RJ	Rio de Janeiro
RM	Ressonância Nuclear Magnética
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RNA _t	Ácido Ribonucleico Transportado
ROR- γ gt	<i>RAR-Related Orphan Receptor</i>

RS	Rio Grande do Sul
RUNX	<i>Runt-Related Transcription Factor</i>
S1PRs	<i>Sphingosine-1-phosphate receptors</i>
sCD163	Forma solúvel do receptor CD163
sCD40l	Receptor solúvel da proteína de membrana CD40l
SCI	Síndrome Clínica Isolada
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SP	São Paulo
SRI	Síndrome Radiológica Isolada
T	Tesla
TAS	Taxa Anualizada De Surto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLT	Tecido Linfoide Terciário
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
Th1	Linfócito T <i>Helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>Helper</i> 2
Th17	Linfócito T <i>Helper</i> 17
TLT	<i>Tertiary Lymphoid Tissue</i>
TMD	Terapia Modificadora de Doença
TMDs	Terapias Modificadoras de Doença
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
Treg	Linfócito T Regulador
TREM	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells</i>
UFF	Universidade Federal Fluminense
USP	Universidade De São Paulo
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule- 1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen - 4</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Epidemiologia, fatores genéticos e ambientais	18
1.2	Imunopatologia na esclerose múltipla	23
1.3	Diagnóstico e formas clínicas	28
1.4	Terapias modificadoras de doença	32
1.4.1	Interferon beta (IFN- β)	33
1.4.2	Acetato de Glatirâmer (AG)	34
1.4.3	Fingolimode	35
1.5	Os linfócitos, as quimiocinas e as interleucinas na esclerose múltipla	38
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	46
3	OBJETIVO PRINCIPAL	49
3.1	Objetivos Específicos	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Delineamento	50
4.2	População em estudo	50
4.2.1	Critérios de inclusão	51
4.2.2	Critérios de exclusão	51
4.2.3	Análise de subgrupos	52
4.3	Coleta de dados clínicos	54
4.4	Ressonância Magnética de crânio	54
4.5	Coleta de sangue periférico	55
4.6	Quantificação dos biomarcadores imunes	55
4.7	Análise Estatística	57
4.8	Aspectos éticos	57
4.9	Conflitos de interesse	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Avaliação clínica dos grupos	59
5.2	Avaliação de número de surtos por tempo de doença-ano e escore EDSS entre os grupos	60
5.3	Avaliação do número de surtos por tempo de doença-ano e escore EDSS por grupos separadamente	60
5.4	Resultados dos biomarcadores plasmáticos	62
5.5	Estudos de correlação entre os biomarcadores plasmáticos e as variáveis clínicas e de imagem	65
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	84
8	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	110

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia, fatores genéticos e ambientais

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória crônica autoimune mais prevalente do sistema nervoso central (SNC), afetando mais de 2 milhões de pessoas mundialmente (Ascherio e Munger, 2016; Blozik *et al*, 2017). Atualmente incurável, a EM está possivelmente associada a múltiplos fatores de risco (Fragoso, 2014), incluindo tabagismo (Handel *et al*, 2011), deficiência de vitamina D (Simpson *et al*, 2018), obesidade (Kvistad *et al*, 2015) e contato prévio com o vírus Epstein-Barr (Maghzi *et al*, 2011; Goodin, 2016).

A EM apresenta um gradiente latitudinal, sendo mais prevalente em latitudes mais distantes da linha do Equador. A doença é mais comum no norte dos Estados Unidos da América e na Europa, com prevalência de 100 a 250/100.000 habitantes e incidência de 5 a 6/100.000 habitantes por ano nestas localizações (Wynn *et al*, 1990; Hernan *et al*, 1999); (Koch-Henriksen *et al*, 1992).

Nos estudos epidemiológicos de prevalência realizados no Brasil em diferentes cidades, há variação de 1,36 a 27,2 doentes por 100.000 habitantes, justificada em parte pela extensão do país altitudinalmente e pela colonização territorial heterogênea (Callegaro *et al*, 2001; Ferreira *et al*, 2004; Becker *et al*, 2013; Finkelsztein *et al*, 2014; Becker *et al*, 2016).

Vários fatores de risco genéticos e ambientais foram encontrados associados à fisiopatogenese da EM (Ascherio *et al*, 2016). A concordância em gêmeos monozigóticos portadores de EM é de 30 a 50% (Cree *et al*, 2014). Estudos de associação genômica (Baranzini *et al*, 2017) baseados em amostras de pacientes com EM e controles pareados identificaram mais de 200 variantes genéticas (Axisa *et al*, 2016) que aumentam consideravelmente o risco da doença. A variante gênica mais significativa continua sendo o haplótipo do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigens*) DRB1*1501, no gene 21 do braço curto do cromossomo 6, com um *odds ratio* (OR) estimado de 3 (Cree *et al*, 2014). A variante de classe I HLA-A*02 está associada à proteção gênica contra a doença com um OR de 0,6. A ausência

de HLA-A*02 e a presença de DRB1*1501 tem um OR combinado de risco para a doença próximo de 5 (Kalman *et al*, 2014; Canto *et al*, 2018).

Mais de 200 *loci* associados à EM foram identificados ao longo dos anos (Tizaoui, 2018), sendo que os genes que impulsionam essas associações são predominantemente imunológicos (De Jager *et al*, 2009, Patsopoulos *et al*, 2018). Os genes do HLA são, como descrito anteriormente, os mais importantes determinantes genéticos na EM (Ockinger *et al*, 2016), enfatizando a relevância das interações entre as *Antigen Presenting Cell* (APC) com os linfócitos T *helper* CD4 + e T *helper* CD8 + na fisiopatogênese da EM (Cree *et al*, 2014) em pacientes expostos a gatilhos ambientais (Ockinger *et al*, 2016). Além de ser um fator de risco, o HLA é, possivelmente, um determinante no prognóstico da doença. Zivadinov *et al* (2017) estudaram pacientes com EM que eram HLA - DRB1*1501 positivo e identificaram uma pior evolução no volume de carga lesional e atrofia cortical. Em outro estudo, os pacientes HLA - DRB1*1501 positivo apresentaram um maior volume de lesões na substância branca, maior grau de atrofia e piores escores na função cognitiva (Okuda *et al*, 2009). Também é notável que os alelos HLA-DRB1*00401, 0408 e 1601 se correlacionam com um risco maior de desenvolver autoanticorpos neutralizantes nos pacientes em uso de IFN- β , resultando em um pior prognóstico de resposta terapêutica (Kalluri *et al*, 2018)

Estudos genômicos de associação (GWAS, do inglês *genome-wide association studies*) detectaram cerca de 110 nucleotídeos polimórficos únicos (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) não-HLA, cada um dos quais confere uma possível influência no risco de desenvolver a EM (Patsopoulos *et al*, 2018). Apesar de múltiplos alelos de risco para a doença não estarem associados a genes das vias autoimunes (Fewings *et al*, 2017; Lill *et al*, 2014; Bergkvist *et al*, 1996; Didonna *et al*, 2017); espera-se que vários estudos com GWAS em andamento identifiquem de forma mais detalhada os SNPs implicados nas vias pró-inflamatórias de sinalização do fator nuclear-Nf κ B, das superfamílias dos interferons e dos fatores de necrose tumoral, entre muitas outras (Munoz-Culla *et al*, 2013).

Atualmente, são pouco conhecidos os fatores de risco genético validados que influenciem fortemente o curso clínico da EM, incluindo estudos recentes em pacientes latino-americanos (Rivas Alonso *et al*, 2017). Tal

limitação reflete a dificuldade de aferir o prognóstico de uma doença de risco poligênico e de longa evolução (Dadalti Fragoso, 2015). Ainda assim, de modo geral, os mecanismos pelos quais os polimorfismos genéticos e as exposições ambientais em associação elevam o risco de desenvolver EM continuam sendo objeto de intensa investigação (Engdahl *et al*, 2014; Fragoso, 2014; Hedstrom *et al*, 2014; Baranzini e Oksenberg, 2017). Muitos mecanismos genéticos na EM ainda não estão elucidados (Lill, 2014). A possibilidade de que fenômenos epigenéticos (Segal *et al*, 2018), tais como a metilação de DNA, a compactação de histonas e a ação dos microRNAs (miRNA), possam ser o elo entre os fatores de risco genéticos e a exposição ambiental precisa ser melhor esclarecida (Hawkes, 2013).

Os principais fatores de risco ambientais incluem: altas latitudes, com maior incidência em climas mais temperados (Ramagopalan *et al*, 2011), possivelmente pela influência nos níveis de vitamina D (Fitzgerald *et al*, 2015) ou pela associação com patógenos prevalentes nessas regiões (Fatima *et al*, 2011); a exposição ao tabagismo passivo ou ativo; a obesidade e a mononucleose infecciosa (De Jager *et al*, 2009; Ascherio *et al*, 2016).

Com relação à mononucleose, esta resulta da infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), geralmente ocorrida na população pós-puberal (Marrone *et al*, 2014). O EBV é um herpes vírus humano de DNA de cadeia dupla, também conhecido como HHV-4, que infecta mais de 90% dos adultos e persiste como uma infecção latente ao longo da vida (Maghzi *et al*, 2011). A infecção pelo EBV tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Marrone *et al*, 2014), como a EM, o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatoide (AR). Na EM esses achados sugerem uma possível relação entre o EBV como gatilho ambiental e a evolução da doença (Disanto *et al*, 2011).

Em se tratando da influência nos níveis de vitamina D, Simpson *et al* (2018) sugerem a existência de múltiplas evidências epidemiológicas diretas e indiretas que substanciam de forma plausível a relação da vitamina D com a EM. Um estudo recente avaliando 176 pacientes com EM em tratamento com fingolimode demonstrou uma relação entre o valor sérico de vitamina D na forma 25-hidroxi (25-OH) > 100nmol/l com a redução na prevalência de lesões ativas na RM em pacientes que receberam suplementação após 2 anos de seguimento em relação a pacientes com níveis menores de vitamina D ($p < 0,05$) (Ferre *et al*,

2018). De forma controversa, estudos clínicos recentes não demonstraram correlação entre níveis séricos de vitamina D com a atividade da doença, mesmo quando ajustados pela latitude (Fragoso, Adoni, *et al*, 2017). A relação entre hipovitaminose D e EM ainda permanece controversa (Fragoso, Adoni, *et al*, 2014) e futuros estudos são necessários para o esclarecimento desta possível correlação fisiopatogênica (Ontaneda *et al*, 2012).

Considerando o tabagismo, este é sugerido como um fator de risco isolado para EM em uma análise conjunta de múltiplos estudos (Correale *et al*, 2015). O tabagismo e o risco de desenvolver EM possivelmente tem relação direta com o tempo acumulado de exposição ao tabaco (Handel *et al*, 2011). Níveis elevados de nicotina no soro ou no plasma (≥ 10 ng/ml) em indivíduos antes de desenvolverem EM foram associados a um aumento do risco para a doença (Sharafutdinova *et al*, 2013). A exposição passiva ao tabagismo também tem sido associada ao risco aumentado de desenvolver EM (Weston *et al*, 2015) e ao risco de desenvolver anticorpos neutralizantes contra as terapias na EM, incluindo o natalizumabe e o IFN- β (Sharafutdinova *et al*, 2013).

Evidências crescentes nos últimos anos associam fortemente um papel crucial na obesidade como risco ambiental para a EM (Khurana *et al*, 2009; Novo *et al*, 2017). Grandes estudos de coorte associaram a obesidade na adolescência como fator de risco para desenvolvimento da EM (Huitema e Schenk, 2018). A associação é mais forte para um índice de massa corporal (IMC) acima de 27, embora pacientes com sobrepeso também estão associados ao risco de desenvolver EM.

Referente à obesidade, lhe é associado o aumento do risco de desenvolver EM inclusive na faixa etária pediátrica (Chitnis *et al*, 2016). A adolescência parece ser o período mais crítico em que o peso afeta o risco de desenvolver EM, sugerindo a existência de uma janela crítica de tempo ontológico durante a qual um fator de risco tem o efeito mais marcante (Gianfrancesco *et al*, 2014). Os dados sobre obesidade e EM podem ter um impacto direto na prevenção da doença, especialmente para indivíduos com alto risco de desenvolver EM, como filhos obesos de indivíduos com EM (Davis *et al*, 2014). Tais dados são de igual interesse aos estudiosos da epidemia global de obesidade, que pode ser um fator importante no aumento da incidência de EM.

Além dos fatores de risco ambientais mencionados, recentemente tem se correlacionado a disfunção na microbiota intestinal (disbiose) como um possível gatilho ambiental na deflagração e evolução da EM (Mielcarz *et al*, 2015; Power *et al*, 2010; Bhargava *et al*, 2014). O eixo “cérebro-intestino” serve como conexão bidirecional entre o microbioma intestinal, a barreira intestinal e o sistema imunológico na fisiopatologia das doenças desmielinizantes inflamatórias (Camara-Lemarroy *et al*, 2018), incluindo a EM (Power *et al*, 2010).

Múltiplos subgrupos bacterianos intestinais têm sido implicados na patogênese da EM com achados variáveis, dependendo de algumas variáveis como técnicas de investigação e fenótipos clínicos da doença (Bhargava *et al*, 2014). Jangi *et al* (2016) avaliaram o microbioma intestinal de 60 pacientes com EM e 43 controles saudáveis, e as alterações encontradas no microbioma nos pacientes com EM incluíram: aumento das bactérias dos gêneros *Methanobrevibacter* e *Akkermansia* e redução do gênero *Butyricimonas*, sugerindo uma correlação entre a disbiose intestinal na EM e a evolução da doença.

Camara-Lemarroy *et al*, 2018 e Kirby e Ochoa-Reparaz, 2018 perceberam que essas alterações de disbiose do microbioma intestinal correlacionam-se com variações na expressão de genes envolvidos na maturação de células dendríticas, sinalização de IFN e vias de sinalização do fator nuclear NF-kappaB em linfócitos T circulantes e em monócitos. Sugere-se que a disfunção da microbiota intestinal estimule a ação pró-inflamatória Th17 que por sua vez estimula a cronificação da disbiose intestinal nos pacientes portadores de EM (de Souza *et al*, 2019).

Considerando o tratamento de EM, pacientes em tratamento com IFN- β e AG apresentaram uma maior prevalência dos gêneros *Prevotella* e *Sutterella*, e diminuição do gênero *Sarcina*, em comparação com pacientes com EM não tratados (Power *et al*, 2010).

Sugere-se que a modificação terapêutica do microbioma intestinal, o uso de probióticos (Tankou *et al*, 2018), o transplante de microbiota fecal e a suplementação com ácidos biliares e otimizadores da barreira intestinal (Haghikia e Linker, 2018) são possíveis candidatos terapêuticos na EM. Mais estudos são necessários para avaliar se as alterações observadas no

microbioma intestinal desempenham um papel na fisiopatogênese da EM ou são apenas uma consequência da EM (Haghikia e Linker, 2018).

Observa-se que o estilo de vida e os fatores de risco ambientais que possivelmente deflagrem a EM têm sido progressivamente definidos. Estudos de interação que combinem fatores genéticos e ambientais contribuíram para o entendimento da fisiopatologia da EM (De Jager *et al*, 2009; Ascherio e Munger, 2016). Os gatilhos ambientais e suas interações com genes de risco para o desenvolvimento da EM, principalmente os genes do HLA, reforçam a hipótese de disfunção primária do sistema imune na EM. Isso se aplica à infecção por EBV, tabagismo e obesidade. O melhor entendimento dos fatores desencadeantes da EM deverão ser progressivamente incorporados à assistência médica prática e talvez à prevenção da doença. Isso, muito provavelmente, será importante no tratamento de pacientes com EM, em particular, para indivíduos tabagistas passivos e ativos, com sobrepeso e obesos, com disbiose e com histórico familiar de EM.

1.2 Imunopatologia na esclerose múltipla

O sistema imunológico desempenha um papel crucial na lesão do SNC na EM, como pode-se perceber através da presença de bandas oligoclonais comumente observadas no líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes com EM. No entanto, os alvos desses anticorpos ainda não foram elucidados (Lassmann *et al*, 2012).

Acredita-se que a imunidade mediada por células envolvendo principalmente linfócitos T *helper* desempenhe um papel importante no desencadeamento da doença. Estudos imuno-histoquímicos comprovaram a presença de linfócitos T ativados na EM. A reatividade para vários antígenos de mielina, incluindo a proteína básica de mielina (MBP, do inglês *myelin basic protein*), proteína proteolipídica (PLP, do inglês *proteolipid protein*) e da glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG, do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) tem sido investigada. Linfócitos T reativos à MBP estão presentes em indivíduos normais. No entanto, os pacientes com EM têm uma prevalência maior de de linfócitos T reativos à MBP no sangue periférico e no LCR (Lassmann *et al*, 2012).

A imunopatogênese da EM envolve a ativação de subpopulações de linfócitos T contra a bainha da mielina via mimetismo molecular por ativação e “espalhamento de epítomos”, presumivelmente na periferia. Tais achados foram demonstrados em modelos de encefalite alérgica experimental (EAE, do inglês *experimental autoimmune encephalomyelitis*) (Tuohy *et al*, 1998; McMahon *et al*, 2005), em pacientes com EM pediátrica (Quintana *et al*, 2014) e em pacientes adultos com EM (Yu *et al*, 1998). Os linfócitos T atravessam a BHE e são reativados no SNC após serem rerepresentadas por “antígenos cognatos” (Quintana *et al*, 2014).

A invasão linfocitária no SNC possivelmente é específica neuroanatomicamente para cada subgrupo de linfócito T ativado perifericamente. Conforme modelos de EAE, a invasão dos linfócitos Th17 ocorre via receptor CCR6 das células ependimárias no plexo coroide e os linfócitos Th1 via os receptores da alfa integrina 4 (VLA-4, do inglês *very late antigen - 4*) presentes na subaracnoide (Rothhammer *et al*, 2011). Após a invasão dos linfócitos T ativados no SNC, inicia-se uma cascata de produção das citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos Th1 e Th17 (Korn *et al*, 2009), entre outras, o interferon-gama (IFN- γ), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*). Essas citocinas ativam macrófagos que ingressaram no SNC que, por sua vez, secretam óxido nítrico e o TNF- α . A ativação dos linfócitos B por coestimulação dos linfócitos T promove por fim a produção de autoanticorpos que danificam ainda mais a bainha de mielina e o axônio (Prajeeth *et al*, 2017).

Há evidências crescentes indicando que os linfócitos T ativados desempenhem um papel fundamental na fase inicial da EM. No entanto, é cada vez mais evidente que a progressão da doença ocorra através de mecanismos distintos envolvendo principalmente ativação e ação microglial (Weiner *et al*, 2009). Pode-se citar, por exemplo, o espalhamento de epítomos que ocorre dentro do SNC na evolução da doença facilitado pela ação microglial em um modelo de EAE (McMahon *et al*, 2005).

A micróglia representa aproximadamente 10% da população total de células no SNC. São responsáveis pela modulação da atividade sináptica neuronal e neuroglial, pelo controle da sinaptogênese e pela apoptose neuronal durante o desenvolvimento do SNC (O'loughlin *et al*, 2018). Apesar da micróglia

ser considerada um dos tipos celulares mais comuns do SNC, sua origem ocorre a partir de células progenitoras mielóides, possuindo, dessa forma, múltiplos marcadores comuns em outras células presentes no sangue periférico, como as proteínas de membrana CD11b e CD45 (Town *et al*, 2005). As primeiras células microgliais residentes no SNC são originadas a partir dos macrófagos imaturos, os quais são egressos do saco vitelínico nos estágios iniciais do desenvolvimento fetal. Nos seres humanos, estas células precursoras da micróglia alcançam o SNC em dois momentos intraútero, durante o primeiro e o segundo trimestres de gestação, diferentemente de outras espécies de mamíferos, como os roedores (O'loughlin *et al*, 2018).

Em condições fisiológicas normais no SNC, as células microgliais se mantêm na forma quiescente, caracterizada pela expressão da proteína CD 45 e com baixa expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) tipo II. Apesar de serem chamadas quiescentes, as células microgliais mantêm atividade de vigilância no SNC. Em condições de estresse, como isquemia cerebral, infecção e trauma, a micróglia sofre mudanças morfológicas, desenvolve habilidades fagocíticas e assume uma morfologia “amebóide”, tornando-se altamente ativa. A micróglia ativa é um elemento celular essencial na resposta neurodegenerativa do SNC e seus fatores liberados, como o TNF- α , estão associados à progressão da EM (Zrzavy *et al*, 2017).

Este processo fisiopatológico de ativação microglial na EM é conhecido por induzir várias modificações fenotípicas, transformando, morfológicamente, a micróglia em uma célula indistinguível de um macrófago periférico. Desta forma, similar aos macrófagos periféricos ativados, dependendo do estímulo específico recebido pela micróglia, esta pode originar diferentes fenótipos com marcadores moleculares distintos e funções variadas no SNC (O'loughlin *et al*, 2018). Os subtipos de fenótipos microgliais são múltiplos, mas há dois fenótipos principais: o fenótipo M1, associado a uma ativação celular conhecida como via clássica; e o M2, associado a uma ativação celular conhecida como via alternativa (Morandi *et al*, 2015).

O fenótipo M1 (ativação clássica) consiste em um fenótipo fagocitário associado à ativação transcricional de NF κ B, levando à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-23 e TNF- α , e substâncias

citotóxicas, como radicais livres e ácido quinolínico (Town *et al*, 2005). Em resposta ao IFN- γ liberado pelos linfócitos Th1, o fenótipo M1 aumenta a expressão do MHC II, torna-se célula apresentadora de antígeno e libera citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, IL-23 e o TNF- α (Kyran *et al*, 2018). O fenótipo M1 é encontrado principalmente nas formas agressivas e progressivas da EM (Zetterberg, 2017; Masvekar *et al*, 2018) e tem sido associado histopatologicamente a dano axonal e atrofia cortical nestes pacientes (Kutzelnigg *et al*, 2005; Lassmann *et al*, 2012). O fenótipo M2 (ativação alternativa) também tem um fenótipo fagocitário, mas desencadeia respostas anti-inflamatórias através da liberação de IL-10 e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*) ou, alternativamente, promove a reparação tecidual liberando, por exemplo, proteínas da matriz extracelular (Pranzatelli *et al*, 2017) na EM (Lassmann *et al*, 2012). Detalhes microfuncionais destes fenótipos continuam ainda em investigação.

O processo de neurodegeneração axonal na EM envolve lesão mitocondrial irreversível (Lucchinetti *et al*, 2000), originalmente identificada a partir de análises bioquímicas de redução da atividade enzimática da succinil desidrogenase (SDH) no complexo IV da cadeia respiratória em biópsia cerebral, aliada à avaliação do perfil de expressão gênica tecidual (Frischer *et al*, 2015). Investigações imuno-histoquímicas das proteínas da cadeia respiratória revelaram lesão mitocondrial, possivelmente refletindo aumento do dano oxidativo, sugerindo que o dano tecidual ativo na EM esteja associado à lesão mitocondrial e ao acúmulo de ferro (Lassmann, 2018).

O ferro se acumula no cérebro humano progressivamente, sendo predominantemente armazenado nos oligodendrócitos, células gliais formadoras da bainha de mielina do SNC. O acúmulo intracitoplasmático de ferro em oligodendrócitos explica, em parte, a alta suscetibilidade dessas células à neurodegeneração sob condições de estresse oxidativo induzido por disfunção mitocondrial (Lucchinetti *et al*, 2000). É importante ressaltar que a destruição de oligodendrócitos leva ao acúmulo de ferro no espaço extracelular, ampliando o dano oxidativo em axônios e outras células no SNC. Nas lesões da crônicas da EM, o ferro extracelular é absorvido por macrófagos ativados e pela micróglia. No entanto, micróglia contendo ferro torna-se, em parte, distrófica e

eventualmente sofre fragmentação e degeneração celular, levando a uma segunda onda de liberação de ferro, cronificando assim o processo degenerativo (Lassmann *et al*, 2018).

Recentemente foi descrita a presença de tecido linfóide terciário no SNC em pacientes com EM. Os folículos linfóides foram demonstrados na autópsia de pacientes com EM (Serani *et al*, 2004) e podem desempenhar um papel na facilitação de uma resposta inflamatória crônica durante a evolução da doença (Lassmann *et al*, 2012). Estes agregados linfocitários meníngeos têm sido referidos como os tecidos linfóides terciários (TLT, do inglês *tertiary lymphoid tissue*), embora existam dúvidas se as estruturas semelhantes a folículos meníngeos evidenciam todas as características do TLT (Kuhlmann *et al*, 2017). Postula-se que fatores solúveis provenientes dos agregados linfocitários meníngeos degradam a neurógliia, promovendo um gradiente de desmielinização e de lesão neuronal que é, por sua vez, secretado por linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+, monócitos e macrófagos no espaço subaracnoideo. Sabe-se que o acúmulo desses tipos celulares específicos está associado à desmielinização cortical e medular nos pacientes com EM progressiva (Kuhlmann *et al*, 2017).

Uma justificativa para a compreensão parcial da patogênese da EM é que os mecanismos moleculares e celulares que conduzem a doença na evolução da progressão são dificilmente reproduzidos em modelos experimentais. Um modelo experimental ideal precisaria reproduzir as seguintes características da EM: compartimentalização da reação inflamatória no SNC, extensão da lesão oxidativa e mitocondrial e acúmulo de ferro no SNC. A falta de modelos animais com essas características também é um grande obstáculo para testar novas terapias. Novos modelos experimentais serão necessários para reproduzir com fidedignidade a neurodegeneração encontrada na EM (Lassmann, 2016).

1.3 Diagnóstico e formas clínicas

A EM é caracterizada por episódios clínicos recorrentes denominados de surtos, os quais podem estar associados à incapacidade neurológica total ou parcialmente reversível (Polman *et al*, 2011). Apresentações clínicas típicas dos surtos incluem perda visual, alterações sensitivas, déficit motor, diplopia

(Francois *et al*, 1963), disfunção vesical e ataxia sensitiva ou cerebelar (Doshi *et al*, 2017). Sintomas clínicos comuns e crônicos associados à EM incluem disfunção cognitiva (Brooks *et al*, 2011; Mendes *et al*, 2012); (Cardoso *et al*, 2015), depressão maior, ansiedade (Tauil *et al*, 2018), alexitmia (Eboni *et al*, 2018), fadiga, síndrome das pernas inquietas (Fragoso *et al*, 2011), disfunção erétil, disfunção vesical e sintomas neurológicos paroxísticos incluindo sinal de irritação meníngea conhecido como sintoma de *Lhermite* e o fenômeno visual paroxístico conhecido como fenômeno de *Uhthoff* (Francois *et al*, 1963).

O método mais utilizado para avaliar a evolução clínica e incapacidade dos pacientes é a escala expandida do estado de incapacidade (EDSS, do inglês *Kurtzke expanded disability status scale*). Essa escala avalia os sistemas funcionais motor, cerebelar, sensitivo, visual e esfinteriano, a marcha e o tronco encefálico em uma escala graduada de 0 a 10 (Kurtzke *et al*, 1983).

A imagem por ressonância magnética (RM) é o exame complementar mais importante para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes portadores de EM. Permite aferir a atividade da doença através da avaliação de novas lesões ponderadas na sequência T2/FLAIR, do inglês *fluid attenuated inversion recovery* ou lesões com realce ao contraste paramagnético (Igra *et al*, 2017). Além disso, a RM possibilita visualizar lesões sequelares, avaliando lesões cumulativas ponderadas na sequência T1. A RM, mais recentemente, têm sido uma ferramenta na avaliação da progressão da atrofia cerebral nos pacientes portadores de EM (Thompson *et al*, 2018) .

A RM é um método complementar de diagnóstico com sensibilidade de 97% em detectar lesões típicas de EM (Miller *et al*, 2004; Rio *et al*, 2017). Um conceito fundamental avaliado na RM é a necessidade de demonstração de disseminação no espaço (DIS, do inglês *dissemination in space*) e disseminação no tempo (DIT, do inglês *dissemination in time*), assim como a exclusão de outros diagnósticos diferenciais (Polman *et al*, 2011; Thompson *et al*, 2018). A disseminação no espaço ocorre clinicamente quando há evidência de novos sinais ou sintomas neurológicos em diferentes topografias no SNC ou radiologicamente pela disseminação de novas lesões ponderadas na sequência T2/FLAIR ou pelo alargamento de lesões prévias típicas da EM (Igra *et al*, 2017). A disseminação no tempo é caracterizada clinicamente por um novo surto em

intervalo superior a 30 dias do último surto (Poser *et al*, 1983; Poser *et al*, 2004) ou radiologicamente pelo aparecimento de novas lesões nas sequências ponderadas em T2/FLAIR ou a presença simultânea de lesões típicas da EM com e sem realce ao contraste paramagnético (Polman *et al*, 2011; Thompson *et al*, 2018).

A revisão dos critérios de *McDonald* revisados por Polman *et al* (2011) melhorou a acuracidade na avaliação da disseminação no espaço e no tempo, utilizando a RM para complementar ou mesmo substituir os critérios clínicos, como está disposto no Quadro 1:

Quadro 1 – Critérios Diagnósticos de McDonald (2010) no Diagnóstico de Esclerose Múltipla

Apresentação clínica	Dados adicionais para diagnosticar a EM
≥2 surtos Evidência clínica objetiva de ≥2 lesões ou evidência clínica de 1 lesão, com histórico de surto progressivo.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nenhum
≥2 surtos Evidência clínica objetiva de 1 lesão.	<p>Disseminação no espaço</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ≥1 lesão em pelo menos 2 de 4 regiões típicas de EM no SNC*, ou aguardar novo surto acometendo local diferente no SNC.
1 Surto Evidência clínica objetiva de ≥2 lesões.	<p>Disseminação no tempo</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Presença simultânea de lesões assintomáticas captantes e não captantes de contraste; ou uma lesão em T2 e/ou captante de contraste no seguimento da RM, independentemente do tempo decorrido do primeiro exame; ou aguardar um segundo surto clínico.
1 Surto Evidência clínica objetiva de uma lesão – Síndrome clínica isolada (SCI).	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Para disseminação no espaço: ≥1 lesão em pelo menos 2 de 4 regiões típicas de EM no SNC*, ou aguardar novo surto acometendo local diferente no SNC. ▪ Para disseminação no tempo: Presença simultânea de lesões assintomáticas captantes e não captantes de contraste; ou uma lesão em T2/FLAIR e/ou captante de contraste no seguimento da RM, independentemente do tempo decorrido do primeiro exame; ou aguardar um segundo surto clínico.

<p>Progressão neurológica insidiosa sugestiva de EMPP</p>	<p>Um ano de progressão (determinada retrospectiva ou prospectivamente), e dois dos seguintes:</p> <p>Evidência de disseminação espacial no encéfalo baseado em ≥ 1 lesão em T2 regiões típicas de EM no SNC*.</p> <p>Evidência de disseminação espacial na medula espinhal baseado em ≥ 2 lesões em T2 na medula espinhal</p> <p>LCR positivo**.</p>
--	---

Se a sintomatologia tem sua origem no tronco encefálico, cerebelo ou medula espinhal, não se contabilizam as lesões sintomáticas. *Periventricular, justacortical, infratentorial, medula espinhal
 ** Focalização isoelétrica demonstrando presença de bandas oligoclonais e/ou índice de IgG elevado. EM=esclerose múltipla; RM=ressonância magnética; SNC=sistema nervoso central; LCR=líquido cefalorraquidiano; IgG=imunoglobulina G.

Fonte: Adaptado de Polman *et al*, 2011

A síndrome clínica isolada (SCI) é definida como o primeiro episódio desmielinizante do SNC com sintomatologia clínica e possível evolução para esclerose múltipla clinicamente definida (EMCD) (Gafson *et al*, 2012). A síndrome radiológica isolada (SRI), por outro lado, é um achado incidental de alteração na RM típica de EM na ausência de sinais e sintomas clínicos típicos de desmielinização (Okuda *et al*, 2009).

Com o avanço no conhecimento científico, o painel internacional de diagnóstico da EM publicou uma nova recomendação revisada em 2017 (Thompson *et al*, 2018). As principais mudanças em relação a 2010 foram: a utilização das Bandas Oligoclonais (BOC) como critério de DIT; a inclusão das lesões sintomáticas e assintomáticas detectadas na RM para avaliar DIS e DIT e a utilização das lesões corticais nos critérios de DIS pela RM. O critério diagnóstico para EMPP permaneceu conforme os critérios de 2010, porém lesões corticais assintomáticas e sintomáticas detectadas na RM foram incluídas para avaliar DIS e DIT.

O diagnóstico diferencial da EM é extenso, incluindo doenças desmielinizantes, infecciosas, inflamatórias, neoplásicas e vasculares, entre outras. Em alguns casos, mesmo com extensa investigação com exames laboratoriais, LCR e RM não é possível estabelecer o diagnóstico definitivo da EM, havendo então necessidade de acompanhamento do paciente a longo prazo (Fragoso *et al*, 2017).

O maior subgrupo de pacientes portadores de EM apresenta uma forma recorrente remitente (EMRR) em 75% dos casos. As outras formas menos comuns são a esclerose múltipla primariamente progressiva (EMPP) acometendo cerca de 15% dos pacientes (Bezzini *et al*, 2017) e a forma secundariamente progressiva (EMSP) (Rojas *et al*, 2018). Tipicamente, após 10 a 20 anos de evolução da doença, um curso clínico progressivo secundário (EMSP) se desenvolve em aproximadamente 50% dos pacientes com EMRR, levando a uma redução progressiva da mobilidade e das funções cognitivas (Ascherio *et al*, 2016).

Uma das complexidades na compreensão da patogênese da EM está relacionada à progressão da doença de EMRR para EMSP. Ao contrário da EMRR, que está associada a uma resposta imune cada vez mais bem caracterizada e com parâmetros padronizados na RM progressivamente mais definidos, a EMSP exhibe as características de uma fase neurodegenerativa pouco compreendida e não facilmente quantificável (Lassmann *et al*, 2012). O envolvimento da substância cinzenta, a degeneração axonal, a ativação microglial, a lesão mitocondrial e o estresse oxidativo estão provavelmente associados à progressão da EM (Lassmann *et al*, 2012).

O prognóstico da EM é um desafio, devido ao curso imprevisível da doença em cada paciente. Alguns fatores prognósticos têm impacto na história natural da EM. A idade de início mais tardio, pacientes de etnia negra, sexo masculino, presença de bandas oligoclonais no LCR (Arrambide *et al*, 2018), número aumentado de lesões ponderadas na sequência ponderada em T2/FLAIR na RM (Montalban *et al*, 2010), o intervalo reduzido entre o primeiro e o segundo surtos e um número aumentado de surtos nos dois primeiros anos da doença aumentam o risco de incapacidade a longo prazo e de progressão para EMSP (Dobson *et al*, 2013).

1.4 Terapias modificadoras de doença

O tratamento da EM pode ser dividido em terapias de fase aguda e tratamento de manutenção na fase crônica. Na fase aguda, caracterizada por surtos, utiliza-se pulsoterapia com metilprednisolona intravenosa (IV) por um período de três a sete dias. Em casos em que não há resposta adequada à pulsoterapia e o surto tenha sido grave, ocasionando grande incapacidade

neurológica, pode-se realizar plasmaférese (PLEX, do Inglês *plasma exchange*) (Weinshenker *et al*, 1999; Noseworthy *et al*, 2001). A imunoglobulina humana IV também pode ser usada na falha do corticóide, porém é menos eficaz que a PLEX (Marques *et al*, 2018).

As terapias modificadoras de doença (TMDs), utilizadas na fase crônica da doença, estão disponíveis há quase 30 anos no tratamento da EM (Clanet *et al*, 1993). Elas têm por objetivo diminuir a frequência dos surtos, reduzir a progressão da doença, limitar o acúmulo de lesões focais nas substâncias branca e cinzenta na RM e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com EM (Bertado-Cortes *et al*, 2016; Bargiela *et al*, 2017). Apesar disso, nenhuma TMD consegue impedir ou reverter completamente a deterioração neurológica, caracterizada mais comumente por piora na disfunção vesical, cognitiva e fadiga (Benesova *et al*, 2017). A discussão se as TMDs podem retardar a progressão clínica e subclínica da doença ainda são aspectos controversos (Rae-Grant *et al*, 2018; Zahng *et al*, 2015; Bozkaya *et al*, 2017; Phillipis *et al*, 2015; Signori *et al*, 2016).

Para o tratamento da EMRR existe um arsenal crescente de terapias imunomodulatórias e imunossupressoras entre as possibilidades terapêuticas (Buc, 2018). A crescente lista de TMDs disponíveis para reduzir a inflamação na EM inclui os interferons (IFN- β), Acetato de Glatirâmer (AG), anticorpos monoclonais como o natalizumabe (NTZ), alentuzumabe, ocrelizumabe e os medicamentos orais, incluindo fingolimode, teriflunomida e fumarato de dimetila. As decisões de tratamento baseadas nos riscos e benefícios de cada terapia são ainda mais complexas, devido à inerente heterogeneidade da doença exemplificada por diferentes subtipos fenotípicos de EM, à heterogeneidade nas taxas de progressão e nas apresentações clínicas e às diferenças nos subtipos histopatológicos, implicando diferentes mecanismos fisiopatológicos ao longo da progressão da doença (Ontaneda *et al*, 2012; Goodin *et al*, 2016).

O primeiro medicamento específico para o tratamento da EM aprovado foi o IFN- β 1 b. Entre 1996 e 2001, foram aprovados outros dois: o IFN- β 1 a e o AG (Paty e Li, 1993; Johnson *et al*, 1995; Jacobs *et al*, 1996; Li e Paty, 1999; Comi *et al*, 2001; Giovannoni *et al*, 2017).

1.4.1 Interferon beta (IFN- β)

O IFN- β é o fármaco imunomodulador mais utilizado no tratamento da EMRR. O interferon beta, uma citocina produzida por células do sistema imune inato, pela micróglia e pelos astrócitos, é essencial no controle de infecções virais (Liu *et al*, 2001). Detalhes na farmacodinâmica do IFN- β ainda são pouco compreendidos, contudo parece existir um possível efeito na modulação da migração de células imunes e na expressão dos genes associados ao mixoma vírus (Di Filippo *et al*, 2014).

Os estudos pivotais com IFN- β evidenciaram uma redução significativa na taxa anualizada de surtos (TAS), ou seja, o número de surtos dividido por um determinado período de tempo, de 32% nos pacientes em tratamento com IFN- β 1a intramuscular (IM), 34% nos pacientes após 2 anos de tratamento com IFN- β 1b ($p=0,0001$) (Richards *et al*, 1996) e 33,2% nos pacientes após 2 anos de tratamento com IFN- β 1a subcutâneo (SC) ($p<0,005$) (De Haan *et al*, 1996).

O IFN- β reduziu a piora da incapacidade em 37% nos pacientes após 6 meses de uso do IFN- β 1a IM ($p=0,04$), 30% nos pacientes tratados com IFN- β 1a SC ($P<0,05$) (De Haan *et al*, 1996) e em 38% após 12 semanas de tratamento nos pacientes em uso de IFN- β 1a peguilado ($p=0,038$) (Calabresi *et al*, 2014).

Em relação à RM, ocorre uma redução no número de novas lesões com realce de gadolínio e de novas lesões ponderadas na sequência T2/FLAIR nos pacientes em tratamento com IFN- β (Koopmans *et al*, 1993). Os indivíduos em uso de IFN- β 1a SC 44mg apresentaram uma média de aparecimento de novas lesões ponderadas na sequência T1 de 0,5 enquanto a média no grupo placebo foi de 2,25 ($p<0,0001$), e um aumento de novas lesões ponderadas na sequência T2/FLAIR após 2 anos de 3,8%, enquanto no grupo placebo este aumento foi de 11% ($p<0,0001$) (Clanet *et al*, 1993). Em relação ao IFN- β 1a IM, o número de novas lesões com realce de gadolínio nos pacientes após 2 anos de tratamento foi de 0,8, comparativamente a 1,65 no grupo placebo ($p=0,05$) e quando avaliado a carga lesional pela sequência ponderada em T2/FLAIR, não houve diferença significativa entre os grupos (Koopmans *et al*, 1993).

Embora os IFN- β reduzam as TAS e possivelmente, retarde a progressão da doença, detalhes na farmacodinâmica ainda são pouco compreendidos. Além disso, terapias recentes, que ingressaram posteriormente no mercado, possuem um perfil de eficácia clínica e de aderência geralmente superior aos IFN- β , agregadas a uma taxa menor de efeitos colaterais (Di Filippo *et al*, 2014).

1.4.2 Acetato de Glatirâmer (AG)

O mecanismo de ação do AG, assim como o dos IFN- β , não é totalmente compreendido. Essa terapia, cuja apresentação de antígeno é semelhante à proteína básica da mielina, envolve ação preferencial dos linfócitos Th2 ativados, aumentando a resposta anti-inflamatória (Neuhaus *et al*, 2000). Esses dados farmacodinâmicos são reforçados por sua ação modulatória nos linfócitos Treg, aumentando a liberação de fator imune neurotrófico (Levite, 2017). O AG possui ação imunomodulatória também nos linfócitos Th17, inibindo a autorreatividade específica contra a bainha de mielina (Neuhaus *et al*, 2000; Duda *et al*, 2000) e nos linfócitos B inibindo a produção de anticorpos pelos plasmócitos (Ireland *et al*, 2014).

O estudo pivotal “*The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group*” evidenciou uma redução significativa de 29% na TAS ($p=0,007$) após 24 meses de uso de AG 20 mg subcutâneo (SC) em comparação ao grupo controle (Johnson *et al*, 1995). Neste estudo, não se evidenciou uma redução na piora da incapacidade após 2 anos de uso do AG, quando comparado ao grupo placebo (Weilbach *et al*, 1995). Em relação à atividade na RM (número de novas lesões com realce no gadolínio ou de novas lesões ponderadas em T2/FLAIR), o AG evidenciou uma redução de 29% no número de lesões com realce no gadolínio ($p=0,003$) e uma redução de 13,7 para 9,4 no número de novas lesões ponderadas em T2 após 9 meses de tratamento quando comparado ao placebo ($p<0,003$) (Johnson *et al*, 1995).

Os imunomoduladores AG e IFN- β reduzem, de forma pouco efetiva, a TAS nos pacientes com EM em valores similares (29% a 34%), quando comparados aos grupos placebo. Ademais, apresentam uma significativa redução na aderência a longo prazo, pelo fato de as vias de administração serem

SC ou IM e não via oral (VO), justificando o crescente ingresso das novas TMDs com formas de administração e taxa de eficácia clínicas superiores ao AG e ao IFN- β (Alonso *et al*, 2018).

1.4.3 Fingolimode

O Fingolimode é um imunossupressor sintético, derivado de um metabólito, a miriocina (Skerjanec *et al*, 2005), um extrato do fungo *Isaria sinclairi*. Sintetizado pela primeira vez em 1994 por uma modificação química desse extrato, o fingolimode foi originalmente desenvolvido para prevenir a rejeição de órgãos após transplante renal, embora tenha falhado nessa indicação (Skerjanec *et al*, 2005).

Essa molécula é um agonista de alta afinidade para 4 dos 5 receptores conhecidos por receptores esfingosina 1-fosfato (S1PRs, do inglês *Sphingosine-1-phosphate receptors*) (Eken *et al*, 2017). Após o processo de fosforilação, a droga se liga aos diferentes receptores S1PRs (Tchorsh-Yutsis *et al*, 2009), envolvidos na mobilização de cálcio, sobrevivência celular, rearranjos do citoesqueleto, motilidade celular e migração celular. Após esse processo, ocorre a internalização dos receptores S1P tipo 1 (Noguchi e Chun, 2011) nos órgãos linfoides, impedindo que os linfócitos egressem dos linfonodos. Conseqüentemente, ocorre uma inibição do tráfego de linfócitos para a circulação sistêmica pelo sequestro dos linfócitos circulantes (Lee *et al*, 2010; Henault *et al*, 2013). O fingolimode reduz, dessa forma, várias subpopulações de linfócitos T circulantes (Sato *et al*, 2014; Eken *et al*, 2017), linfócitos Th17 (Sato *et al*, 2014), linfócitos Treg (Eken *et al*, 2017) e linfócitos B (Grutzke *et al*, 2015; Nakamura *et al*, 2014; Muls *et al*, 2014) diminuindo a infiltração linfocitária no SNC (Cohen *et al*, 2011). A relação da redução linfocitária sérica com a resposta clínica na EM ainda é muito controversa (Suzumura *et al*, 2015; Fragoso *et al*, 2018). Sendo lipofílico, o fingolimode também penetra no SNC e há indícios de possíveis efeitos diretos nas células neuronais, astrocitárias e microgliais (Choi *et al*, 2011), com possíveis, mas não totalmente elucidados, efeitos neuroprotetores (Chun *et al*, 2010).

O estudo de fase III multicêntrico, randomizado, duplo-cego FREEDOMS (*Fingolimod Research Evaluating Effects of Daily Oral therapy in Multiple Sclerosis*) (Kappos *et al*, 2010) comparou doses diárias de fingolimode

1,25 mg e fingolimode 0,5 mg em relação ao grupo placebo por 24 meses em 1.272 pacientes portadores de EMRR. No desfecho primário, utilizando regressão binomial negativa, a TAS foi reduzida para 60% e 54% respectivamente, nos grupos em uso de 1,25 mg e 0,5 mg de fingolimode, em comparação com o grupo placebo, sendo que a TAS foi de 0,40 no grupo placebo, 0,16 no grupo em uso de fingolimode 1,25 mg e 0,18 no grupo em uso de fingolimode 0,5 mg. O risco de piora no escore do EDSS, desfecho secundário fundamental neste ensaio clínico, evidenciou uma redução de 16,6% e 17,7% nos pacientes em uso de fingolimode nas doses 1,25 e 0,5 mg respectivamente, em comparação aos 24,1% nos pacientes do grupo placebo (Kappos *et al*, 2010). Esses dados foram confirmados em estudo posterior de subgrupo do FREEDOMS (Devonshire *et al*, 2012).

Noutro estudo fase III, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, duplo-paralelo denominado TRANSFORMS (*Trial Assessment Injectable Interferon versus fingolimod Oral in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis*), comparou-se a eficácia e segurança do fingolimode em relação ao IFN- β beta-1a IM. Participaram 1.292 pacientes com EMRR em 3 grupos por 12 meses. Um grupo em tratamento com fingolimode 1,25 mg, outro com fingolimode 0,5 mg e um terceiro em uso de IFN- β 1a IM. No desfecho primário, a TAS foi significativamente menor em ambos os grupos tratados com fingolimode, 0,20 no grupo em uso de fingolimode 1,25 mg, 0,16 no de fingolimode 0,5 mg, quando comparado ao grupo em uso de IFN- β 1a (0,33) (Cohen *et al*, 2010). Esses dados foram replicados na extensão do estudo (Khatri *et al*, 2011). No estudo TRANSFORMS, os dados de RM demonstraram redução na atividade da doença nos grupos em tratamento com fingolimode em comparação ao grupo em uso de IFN- β 1a, contudo não houve diferença significativa na piora do escore do EDSS entre os grupos avaliados (Cohen *et al*, 2010).

Em um ensaio clínico de extensão de 12 meses do estudo TRANSFORMS, pacientes que estavam em tratamento inicial com IFN β -1a IM e migraram para os grupos em uso de fingolimode 0,5 ou 1,25 mg diário apresentaram uma maior redução na TAS em comparação com os 12 meses anteriores da fase inicial do estudo. Esses dados sugerem que a mudança para o tratamento com fingolimode pode proporcionar benefícios clínicos adicionais nos pacientes em uso prévio de IFN β -1a (Meng *et al*, 2015). As análises no

estudo de extensão utilizaram dados dos pacientes que estavam previamente no grupo em uso de IFN β -1a IM no estudo inicial do TRANSFORMS (Meng *et al*, 2015). O objetivo do estudo de extensão era prever o tempo do primeiro surto. No estudo, compararam-se esses achados com o tempo real observado até o primeiro surto, utilizando um modelo de regressão linear. Os autores demonstraram que pacientes que estavam previamente no grupo em uso de IFN β -1a IM e migraram para fingolimode 0,5 ou 1,25 mg prolongaram o tempo do primeiro surto, com um tempo médio estimado para o primeiro surto de 5,07 anos ($p=0,0026$) *versus* 2,26 anos ($p=0,0113$) no grupo em uso de IFN β -1a IM previamente. A razão estimada de tempo observado para o primeiro surto no grupo que permaneceu em uso de IFN β -1a IM foi de 2,09 (95% IC, 1,45-3,04), caso tivesse migrado para fingolimode 0,5 mg e de 1,84 (95% IC, 1,30-2,65) para fingolimode 1,25 mg. O tempo para o primeiro surto foi, portanto, próximo do dobro para os pacientes que migraram de IFN β -1a IM para fingolimode em relação ao grupo que permaneceu em uso de IFN β -1a IM.

No estudo de fase III FREEDOMS II, 1.083 pacientes com EMRR foram divididos em três grupos, fingolimode 1,25 mg, fingolimode 0,5mg e placebo (Calabresi *et al*, 2014). A TAS foi de 0,21 no grupo que estava em uso de fingolimode 0,5mg e 0,40 no grupo placebo, correspondendo a uma redução relativa da TAS de 48%. O tratamento com fingolimode 1,25 mg foi interrompido durante o estudo por uma recomendação do comitê de segurança clínica. Mudanças no escore do EDSS não foram significativamente diferentes entre os grupos avaliados.

Conforme descrito anteriormente, o fingolimode é uma opção terapêutica oral segura (Fragoso *et al*, 2014; Kappos *et al*, 2014; Mazibrada *et al*, 2018; Williams *et al*, 2018) para pacientes com EMRR virgens de tratamento, pacientes com EMRR de alta atividade (Derfuss *et al*, 2015) e pacientes com falência às terapias de primeira linha (Marques *et al*, 2018) . O fingolimode está indicado também, em pacientes pediátricos entre 10 e 18 anos (Chitnis *et al*, 2018). Outros estudos comprovaram a superioridade do fingolimode em comparação aos IFN- β (Cascione *et al*, 2018; Cree *et al*, 2018) ao AG (Claes *et al*, 2014; Kremenutzky *et al*, 2014; Williams *et al*, 2018) além dos múltiplos dados convincentes em relação à RM (De Stefano *et al*, 2016); (Kappos *et al*, 2016).

Com base nas observações experimentais descritas, o fingolimode também foi testado na EMPP. Todavia, o estudo fase III INFORMS não revelou um efeito clínico significativo do fingolimode *versus* o grupo placebo quando avaliado em uma combinação de medidas de incapacidades clínicas (Lublin *et al*, 2016).

1.5 Os linfócitos, as quimiocinas e as interleucinas na esclerose múltipla

Os linfócitos T são linfócitos que sofrem uma diferenciação no timo (por este motivo denominados linfócitos T) e cada linfócito T egresso é caracterizado por uma especificidade antigênica. Os linfócitos T que reconhecem auto-antígenos são geralmente destruídos ou inativos dentro do timo, um processo chamado tolerância central a qual pode ser modificada fisiopatologicamente nas doenças neuroinflamatórias incluindo a EM (Levite *et al*, 2017).

Os linfócitos T podem ser subdivididos em dois grandes grupos com base na expressão dos marcadores de membrana CD4+ ou CD8+. Funcionalmente, os linfócitos T CD4+ estão envolvidas em respostas de hipersensibilidade tardia e também estimulam a diferenciação dos linfócitos B (portanto, são denominadas linfócitos T auxiliares). Em contraste, os linfócitos T CD8+ estão envolvidas na lise de alvos antígeno-específico e portanto são denominados linfócitos T citotóxicos (Bahbouhi *et al.*, 2010). Os linfócitos T também expressam uma variedade de antígenos não polimórficos em suas superfícies. O antígeno de membrana mais abundantemente expresso é o CD45, compreendendo 10% das proteínas da membrana linfocitária (Bahbouhi *et al* 2010).

Ambos linfócitos T CD4+ e CD8+ estão presentes em lesões na EM e acredita-se que desempenhem um papel central no desenvolvimento da doença. A identificação de um único antígeno que desencadeie a ativação dos linfócitos T reativos à mielina pode não ser possível, uma vez que os antígenos originais específicos de ativação da doença possam ser únicos para cada indivíduo e ao longo da evolução da EM ocorre uma exposição de múltiplos antígenos por mecanismos de espalhamento dos epítomos conforme proposto em vários modelos de EAE (Lundberg *et al*, 2008; McMahon *et al*, 2005).

Esses linfócitos T reativos à mielina estão aumentados no sangue periférico em pacientes com EM e possivelmente são possíveis biomarcadores de atividade e progressão de doença (Axisa *et al*, 2016). Estudos recentes indentificaram um perfil fenotípico e transcricional específico de linfócitos T reativos à mielina exclusivos especificamente contra o antígeno MOG em pacientes com EM em comparação a controles saudáveis sugerindo a possibilidade de que perfis únicos específicos de linfócitos T possam identificar indivíduos que se converterão de SCI para EM (Raddassi *et al*, 2011). Desta forma os biomarcadores imunes vinculados à ativação de linfócitos T possivelmente são os mais factíveis de reproduzir a fisiopatogênese da EM baseado nas subpopulações desses linfócitos (Segal *et al*, 2014).

Os linfócitos T helper são subclassificados em três principais populações: T-helper 1 (Th1), T-helper 2 (Th2) e T-helper 17 (Th17); sendo o T-helper 22 (Th22) uma subpopulação diferenciada do Th17 (Sie *et al*, 2014).

O subconjunto Th1 é responsável pela resposta pró-inflamatória, produzindo imunidade celular especificamente dirigida contra patógenos, tais como IFN- γ e o TNF- α através da regulação do gene *T-bet* (do inglês, *T-box transcription factor*) (Hofmeister *et al*, 1999). A subpopulação Th2 secreta citocinas anti-inflamatórias que agem contra a destruição de patógenos e medeiam a imunidade humoral sendo regulada por um fator de transcrição conhecido como GATA-3 (do inglês, *GATA binding Protein 3*). Th2 também produz Interleucina IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que são citocinas com propriedades anti-inflamatórias (Imitola *et al*, 2005).

Os linfócitos T não estimulados ou *naives* (Th0) podem ser diferenciados sob a ação da IL-6 na subpopulação T-helper 17 (Th17), com intensa atividade pró-inflamatória e regulada pelo fator de transcrição conhecido como ROR- γ t (do inglês, *RAR-related orphan receptor*). As citocinas derivadas de Th17 mais estudadas são IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-25 e IL-26 (Sie *et al*, 2014) associadas à intensa atividade pró inflamatória.

Os linfócitos Th22 formam um recente subgrupo descrito de linfócitos T helper CD4+ e são encontradas principalmente nos tecidos. O Th22 sofre diferenciação dos linfócitos Th17 por uma redução na expressão da proteína de membrana CD161 (Shabgah *et al*, 2017).

Arbelaez *et al* (2015) relataram que os linfócitos Th22 possuem expressão reduzida ou indetectável dos fatores de transcrição dos linfócitos Th17, Th2 e Th1 distinguindo os linfócitos Th22 destes subtipos. A expansão dos linfócitos Th22 parece ser regulada por um fator de transcrição conhecido como receptor de hidrocarboneto de arila (AHR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) (Jaligama *et al*, 2018). Suas principais interleucinas secretadas, IL-22, IL-13 e TNF- α , estão aumentados em doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, psoríase, *guillain barret* e a EM e acredita-se que os principais alvos dos linfócitos Th22 sejam os antígenos MBP, PLP e MOG (Li *et al*, 2014; Shabgah *et al*, 2017).

Xu *et al* (2013) demonstraram que a proporção de linfócitos Th22 e Th17 em pacientes com EM e Neuromielite óptica foi superior aos controles saudáveis. Os níveis séricos da IL-22, interleucina secretada pelo linfócito Th22, também estava aumentada nos pacientes com mais de cinco anos de doença, sugerindo que uma maior duração da doença se correlaciona positivamente com a expressão aumentada de linfócitos Th22 na EM.

Os linfócitos T reguladores (Treg) são linfócitos T CD4+ reguladores da resposta imune responsáveis pela manutenção da imunotolerância. São formados após reconhecimento de antígenos próprios no timo e nos órgãos linfóides periféricos (Chen *et al*, 2011). Os Treg derivados do timo são denominados de Treg naturais e os derivados dos órgãos linfóides periféricos são denominados de Treg adaptativos ou induzíveis. Os Treg Naturais são caracterizados por expressarem concomitantemente os co-receptores CD4 e CD25. Treg naturais são desta forma CD4+ CD25+ (Haribhai *et al*, 2011). O fator de transcrição nuclear Foxp3 (do inglês, forkhead box P3) é determinante no desenvolvimento e na função de imunotolerância do linfócito Treg natural. Os Tregs suprimem a ativação, proliferação e produção de citocinas pelos linfócitos T CD4+ e T CD8+ e supostamente suprimem os linfócitos B e células dendríticas através da produção de citocinas incluindo o TGF- β , IL-10 e a adenosina (Marson *et al*, 2007).

Os linfócitos B são os precursores dos plasmócitos, células secretoras de anticorpos. Desenvolvem-se na medula óssea e, durante sua ontogênese, adquirem receptores de imunoglobulina (Ig) que os capacitam a reconhecer antígenos específicos por toda sua permanência. Os linfócitos B normalmente expressam imunoglobulina IgM em suas superfícies celulares, mas modificam para outros isotipos pela comodulação com os linfócitos T helper e produzem imunoglobulinas na fase plasmocitária após ativação por esses linfócitos (Kothur, *et al*, 2016).

As imunoglobulinas são glicoproteínas secretadas pelos plasmócitos. Todas as moléculas de Ig compartilham uma série de características comuns. Cada molécula consiste de duas cadeias leves de polipeptídeo idênticas (kapa [κ] ou lambda [λ]) ligadas a duas cadeias pesadas idênticas. As cadeias leves e pesadas são estabilizadas por ligações intra-cadeias e inter-cadeias. De acordo com a natureza bioquímica da cadeia pesada, as Igs são divididas em cinco classes principais: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Estas podem ser subdivididos em subclasses, dependendo das diferenças na cadeia pesada (Lassman *et al*, 1979).

As cadeias pesadas e leves são formadas por regiões variáveis e constantes. O terminal amino é caracterizado pela variabilidade da sequência na cadeia leve e na cadeia pesada, e cada unidade variável de cadeia pesada e leve atua como um local de ligação ao antígeno (a porção Fab). O terminal carboxi da cadeia pesada (também conhecido como porção Fc) está envolvido na ligação ao tecido do hospedeiro (Hofmeister *et al*, 1999). Esta parte da molécula é importante para a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos e para a lise celular mediada por complemento agindo na fisiopatologia das doenças neuroinflamatórias inclusive na EM (Comabella *et al*, 2010).

Os linfócitos T e B na circulação periférica são fontes primárias de interleucinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão na EM (Christensen *et al*, 2012). As interleucinas são necessárias para a ativação dos linfócitos T e para a amplificação e modulação da resposta imune (Sie *et al*, 2014).

As interleucinas são divididas nas seguintes categorias, que não são mutuamente exclusivas: os fatores de crescimento como IL-1, IL-2, IL-3 e IL-4 e fatores estimuladores de colônias; os fatores de ativação, como interferons (α , β

e γ , que também são antivirais); os fatores reguladores ou citotóxicos, incluindo IL-10, IL-12, TNF- α e TGF- β ; e as quimiocinas que são quimiotáticas para fatores inflamatórios, como a IL-8 (Rothhammer *et al*, 2011). As principais interleucinas e seus linfócitos correspondentes estão citados no Quadro 2:

Quadro 2 – Principais citocinas indutoras e seus linfócitos correspondentes

Linfócitos	Gene	Citocinas indutoras	Citocinas secretadas
Th1	<i>T-bet</i> (<i>T-box transcription factor</i>)	IFN- γ IL-1 β IL-12	IFN- γ TNF- α IL-2
Th2	GATA-3 (<i>GATA binding Protein 3</i>)	IL-2 IL-4	IL-4 IL-5 IL-13
Th17	ROR- γ gt (<i>RAR-related orphan receptor</i>)	IL-6 IL-23 TGF- β	IL-17A IL-17F IL-21 IL-22 IL-23 IL-25 IL-26 TGF- β GM-CSF
Th22	AHR (<i>aryl hydrocarbon receptor</i>)	TNF- α IL-6	TNF- α IL-13 IL-22
Treg	Foxp3 (<i>forkhead box P3</i>) Runx (<i>runt-related transcription factor</i>)	IL-2 TGF- β	IL-10 TGF- β

Fonte: Adaptado de Hofmeister, 2009

Entre as interleucinas pró-inflamatórias mais implicadas na fisiopatologia da EM estão os fatores de necrose tumoral TNF- α e TNF- β e os IFN- α e IFN- β (Kallaur *et al*, 2017). Os interferons IFN- α e o IFN- β são ambos interferons do tipo I. O IFN- α é produzido pelos macrófagos, enquanto o IFN- β é produzido pelos fibroblastos. Ambos inibem a replicação viral, fazendo com que as células sintetizem enzimas que interfiram na replicação viral e modulem a resposta de imunológica periférica em virtude de suas propriedades antiproliferativas (Lassman *et al*, 1979). Da mesma forma, o TGF- β (uma citocina produzida por linfócitos T e macrófagos) pode inibir a proliferação celular e a IL-

10 por sua vez, um fator de crescimento de linfócito B, inibir a produção de IFN- γ (Negrotto *et al*, 2015).

A IL-2 está associada à ativação de linfócitos T através da ativação do seu receptor correspondente (IL-2R). O IL-2Ra solúvel (sIL-2Ra) é uma forma circulante do receptor celular. Considerado um marcador de ativação imune no sangue periférico, o sIL-2Ra induz a ativação e a expansão dos linfócitos T ativados (Bedri *et al*, 2018). Witkowska *et al* (2016) avaliando 92 pacientes com EMRR demonstrou que os níveis de sIL-2Ra estavam aumentados em relação ao controle, sugerindo uma possível correlação entre este biomarcador imune e atividade de doença na EM.

As interleucinas IL-17, IL-12 e IL-23 também foram amplamente estudadas na patogênese da EM uma vez que foram detectadas em níveis elevados no LCR e no sangue periférico em pacientes portadores de EM (Del Boccio *et al*, 2016). A função pró-inflamatória do sistema imune depende em grande parte destas interleucinas mas a implicação destas interleucinas na EM ainda não está totalmente elucidada (Del Boccio *et al*, 2016). A IL-17 é a mais estudada destas interleucinas pois o aumento da sua expressão correlaciona-se com uma evolução mais grave da doença em modelos EAE (Almolda *et al*, 2011). O secuinumabe (um anticorpo monoclonal anti-IL17A) está sendo investigado em um ensaio clínico na EM, mas os resultados deste estudo ainda são desconhecidos (NCT00882999).

A IL-22 foi originalmente considerada uma interleucina secretada pelo linfócito Th1; recentemente é reconhecida como uma interleucina secretada pelos linfócitos Th17 e Th22. A IL-22 faz parte da família das interleucinas IL-10 mas diferentemente dessa, não inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos em resposta ao lipopolissacarídeos apesar de apresentar efeitos inibitórios modestos sobre a IL-4 (Li *et al*, 2014).

Há evidências de que o aumento dos níveis séricos da IL-22 reflita uma maior atividade da doença em modelos de EAE e sua redução se associe à fase de recuperação (Almolda *et al*, 2011), bem como os níveis de IL-22 encontram-se aumentados no LCR em pacientes com EM em atividade (Magliozzi *et al*, 2018).

Recentemente, demonstrou-se que os níveis séricos de IL-22 são significativamente maiores em pacientes com EMRR quando comparados a

controles saudáveis (Perriard *et al*, 2015) e os níveis séricos são mais elevados na fase de surto em pacientes com EM (Rolla *et al*, 2014) portanto, a IL-22 pode desempenhar um papel importante na imunopatogênese e evolução da EM. Estudos adicionais sobre a importância da IL-22 na progressão da doença são necessários e podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Zhou *et al*, 2013).

As quimiocinas são um grupo de moléculas que auxiliam na mobilidade leucocitária dirigida por quimioatração e são produzidas por uma variedade de células imunes e não imunes. Os monócitos, linfócitos T, basófilos e eosinófilos expressam receptores de quimiocinas e essas interações receptor-ligante são cruciais no recrutamento de leucócitos em tecidos específicos (Lassmann, 2008).

A quimiocina CXCL13 (do inglês, *C-X-C motif chemokine 13*) é uma potente molécula quimioatrativa de linfócitos B na fisiopatologia da EM e da neuromielite óptica (Wang *et al*, 2017), emergindo como um promissor biomarcador imune no LCR na resposta imune humoral do SNC.

A quimiocina BAFF (do inglês, *B cell activating factor of the TNF family*) é outro potente biomarcador imune ativador dos linfócitos B na fisiopatogênese da EM (Puthenparampil *et al*, 2017). Vários estudos já descreveram níveis elevados de CXCL13 e BAFF no LCR de pacientes portadores EM, bem como no LCR de pacientes com outras doenças neuroinflamatórias (Puthenparampil *et al*, 2017; Pietikainen *et al*, 2016).

CXCL13 e BAFF elevados no LCR foram observados na SCI onde foi associado a um risco aumentado de conversão para EMCD (Puthenparampil *et al*, 2017). Os níveis de CXCL13 e de BAFF também foram superiores nos pacientes com EMRR, se correlacionando com maior atividade da doença e sugerindo estes biomarcadores imunes como possíveis biomarcadores de prognóstico da EM (Wang *et al*, 2017; Kothur *et al*, 2016).

A utilização dos biomarcadores CXCL13 e do BAFF como indicadores de respostas de linfócito B na EM é apoiado por suas correlações com o Índice de IgG, com a presença das bandas oligoclonais no LCR, grau de atrofia cortical (Puthenparampil *et al*, 2017) e com a redução líquórica nos pacientes com EM em tratamento com Rituximab (Topping *et al*, 2016). A reprodutibilidade desses dados sugere que CXCL13 e BAFF sejam biomarcadores elegíveis na avaliação

de resposta humoral do SNC nos pacientes portadores de EM (Kothur *et al*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A identificação de um biomarcador imune reproduzível e factível na EM poderá fornecer vantagens na escolha de opções terapêuticas precoces para pacientes recém-diagnosticados, reproduzir um desenho de tratamento personalizado e reduzir substancialmente o custo dos estudos clínicos. A heterogeneidade da doença na EM torna a identificação de biomarcadores imunes mais desafiadora. No entanto, uma população de pacientes com EM suficientemente bem caracterizada, uma plataforma de aferição confiável e validação em múltiplos centros poderão superar alguns dos desafios na identificação de biomarcadores imunes factíveis na EM (Ciccarelli *et al*, 2019). É possível que, para uma doença complexa e heterogênea como a EM, um único biomarcador não seja eficaz e, portanto, esforços devem ser feitos para a análise combinatória de biomarcadores para criar "assinaturas de diagnóstico, prognóstico e de resposta terapêutica" (Thouvenot *et al*, 2018).

Algumas das características desejadas em um biomarcador incluem explicação biológica, relevância clínica, praticidade, correlação com a atividade da doença, prognóstico e relação com o efeito do tratamento (Axisa e Hafler, 2016). Para que os biomarcadores na EM sejam úteis no manejo clínico, eles devem detectar, de maneira sensível e específica, um processo normal ou patológico. Além disso, os biomarcadores precisam ser fáceis de coletar em fluidos corporais (Ciccarelli *et al*, 2019).

A vantagem distinta dos biomarcadores plasmáticos é que o sangue pode ser coletado de maneira minimamente invasiva. É mais provável que os biomarcadores sanguíneos reflitam os mecanismos imunológicos periféricos e possam indiretamente refletir os mecanismos do SNC na EM. O LCR, no entanto, é a fonte mais direta dos biomarcadores, dada sua proximidade com a patologia da doença. A relutância de alguns neurologistas e pacientes em submeter-se a repetidos procedimentos de punção lombar (PL) é compreensível, uma vez que é relativamente invasiva, requer um neurologista para realizar o procedimento e pode levar a efeitos como a cefaleia pós-punção (Thouvenot *et al*, 2018).

Os biomarcadores imunes plasmáticos que ajudam a monitorar a resposta terapêutica, como o título de autoanticorpos contra IFN- β , são estabelecidos na prática clínica em vários países há décadas (Paty *et al*, 1993). A pesquisa de novos biomarcadores imunológicos plasmáticos facilmente

detectáveis e pouco invasivos, capazes de prever a atividade e a progressão da doença, seria de grande valia na tomada de decisão durante o tratamento com drogas modificadoras de doença. Assim, o desenvolvimento de biomarcadores que auxiliem a prever resposta a medicamentos disponíveis e bem estabelecidos é muito esperado.

Atualmente, os parâmetros clínicos utilizados para avaliar a atividade de doença e a eficácia terapêutica dependem de marcadores clínicos e de imagem principalmente como a avaliação da TAS, o escore EDSS, a RM e os escores de incapacidade dos critérios híbridos clínico-radiológicos, como os escores (NEDA , do inglês *no evidence of disease activity*) 3 e 4 e o escore clínico-radiológico-laboratorial NEDA 5 (Giovannoni *et al*, 2018) .

Essas avaliações clínicas e clínico-radiológica, apesar de melhor aferirem a atividade e progressão da doença, têm sensibilidade limitada em relação ao diagnóstico da doença, à atividade da doença subclínica (Igra *et al*, 2017), especialmente na topografia da substância cinzenta e medula espinhal (Barkhof *et al*, 2002; Bonnan *et al*, 2017) e à escolha precoce da melhor opção terapêutica (Paul *et al*, 2018). A estratificação efetiva no tratamento dos pacientes com EM individualmente dependerá de uma nova geração de ferramentas de avaliação com melhor precisão e previsibilidade. Assim, há uma necessidade de biomarcadores sensíveis, específicos e relativamente de baixo custo que possam servir como marcadores substitutos para avaliar diferentes situações em uma doença de alta complexidade (Harris *et al*, 2009).

A disponibilidade de biomarcadores plasmáticos confiáveis e reproduzíveis poderá melhorar radicalmente o manejo terapêutico na EM. O estabelecimento de planos de tratamento personalizados continua sendo um dos maiores desafios na tomada de decisão terapêutica na EM, pois o prognóstico da doença e os resultados terapêuticos individuais são extremamente difíceis de prever (Tintore *et al*, 2018). Outro problema é que os algoritmos atuais de tratamento não abordam adequadamente a heterogeneidade patogênica subjacente desta complexa doença (Marques *et al*, 2018).

A pesquisa atual tem como objetivo identificar possíveis biomarcadores imunes plasmáticos nos pacientes com EMRR em tratamento com fingolimode. Para melhor compreender o efeito imunometabólico do tratamento do fingolimode na EMRR, este estudo supôs que nos pacientes

tratados com fingolimode como medicamento de primeira escolha ocorreria uma maior redução plasmática dos biomarcadores pró-inflamatórios em relação aos pacientes em uso de IFN- β ou AG, uma vez que, fingolimode é uma medicação mais eficaz que essas terapias citadas, quando comparados a alguns parâmetros clínicos e imagem (Allen *et al*, 2005; Bergvall *et al*, 2013; Singer *et al*, 2013).

Avaliamos também o perfil imunometabólico plasmáticos dos pacientes com EMRR que migraram do tratamento com IFN- β para fingolimode pois o estudo de extensão de 1 ano do TRANSFORMS demonstrou que pacientes inicialmente tratados com IFN- β e que migraram para o fingolimode apresentaram uma maior redução no número de surtos e menor incremento de carga lesional na RM em comparação com os 12 meses anteriores do estudo sugerindo que a mudança para o tratamento com fingolimode possivelmente proporcionou benefícios clínicos adicionais nos pacientes em uso prévio de de IFN- β (Meng *et al*, 2015) .

Para testar estas hipóteses, o estudo comparou as concentrações plasmáticas de 11 biomarcadores em pacientes com EMRR virgens de tratamento e que iniciaram fingolimode, comparados a pacientes com EMRR tratados com IFN- β ou AG e que posteriormente migraram para o fingolimode. Por fim, correlacionamos os resultados laboratoriais obtidos com os dados clínicos e de imagem nos dois grupos avaliados.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar se os possíveis biomarcadores imunes sCD40L, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-31, IL-33, TNF- α e IFN- γ apresentam alteração na concentração plasmática nos pacientes com EMRR em tratamento com fingolimode.

3.1 Objetivos específicos

a) Avaliar a concentração plasmática dos biomarcadores imunes plasmáticos sCD40L, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-31, IL-33, TNF- α e IFN- γ nos pacientes com EMRR tratados com IFN- β ou AG por pelo menos 6 meses comparativamente ao grupo de pacientes com EMRR virgens de tratamento;

b) Avaliar a concentração plasmática dos biomarcadores supracitados após 6 meses de estudo nos pacientes com EMRR tratados com fingolimode por 6 meses comparativamente ao grupo de pacientes em uso de IFN- β ou AG;

c) Avaliar a concentração plasmática dos biomarcadores supracitados após 12 meses de estudo nos pacientes com EMRR tratados com fingolimode por 12 meses comparativamente ao grupo de pacientes em tratamento com fingolimode por 6 meses após uso prévio de IFN- β ou AG;

d) Correlacionar a concentração plasmática dos biomarcadores supracitados após 12 meses de estudo com os dados laboratoriais, clínicos e de imagem avaliando os grupos conjuntamente;

e) Avaliar a concentração plasmática dos biomarcadores supracitados durante os 12 meses de estudo, em cada grupo separadamente e correlacionar com os dados laboratoriais, clínicos e de imagem.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Ensaio clínico controlado não randomizado.

4.2 População em estudo

Foram analisados 24 pacientes subdivididos em dois grupos de 12 indivíduos cada: o grupo 1, formado por pacientes com EMRR em uso prévio de IFN- β ou AG por pelo menos 6 meses e o grupo 2, formado por indivíduos com EMRR previamente virgens de tratamento. Todos os participantes do estudo em tratamento foram avaliados inicialmente na visita 1 e posteriormente 6 e 12 meses após o primeiro encontro, nas visitas 2 e 3, respectivamente.

Na primeira visita, o grupo 1 participou do protocolo de avaliação clínica e de imagem e coleta de sangue periférico. O grupo 1 manteve o tratamento com IFN- β ou AG. Já o grupo 2, após a primeira visita iniciou tratamento com fingolimode na dose diária de 0,5 mg. Todos os pacientes que iniciaram fingolimode realizaram protocolo de primeira dose com realização de eletrocardiograma inicial e após 6 horas, além de terem sido submetidos à observação médica neste período. Os pacientes do grupo 1, que estavam em uso de IFN- β ou AG, na primeira visita mantiveram o tratamento por 6 meses, até a segunda visita. Na segunda visita, após a realização do protocolo clínico, de imagem e coleta de sangue, os pacientes do grupo 1 iniciaram tratamento com fingolimode na dose diária de 0,5 mg. Os pacientes do grupo 2, que já estavam em uso de fingolimode desde a primeira visita, mantiveram o tratamento na segunda visita. Na terceira e última visita, todos os pacientes do estudo estavam em uso de fingolimode. No grupo 1, os pacientes estavam em tratamento com fingolimode há 6 meses e no grupo 2, há 12.

No presente estudo não houve período de *washout* (do inglês, *retirada*) do tratamento entre a suspensão dos imunomoduladores e o início do uso do fingolimode. Abaixo o resumo do desenho do estudo (Quadro 3) e o resumo dos procedimentos realizados nas visitas (Quadro 4).

Quadro 3 - Desenho do estudo

Visitas	Visita 1 = 0 m	Visita 2 = 6 m	Visita 3 =12 m
Grupo 1 EMRR* em uso de IFN-β** ou AG*** por pelo menos 6 meses	IFN-β** ou AG***	Suspenderam IFN-β** ou AG*** Início do fingolimode (protocolo de primeira dose)	Fingolimode há 6 meses
Grupo 2 EMRR virgens de tratamento	Início do fingolimode (protocolo de primeira dose)	Fingolimode há 6 meses	Fingolimode há 12 meses

*esclerose múltipla remitente-recorrente **interferon beta ***acetato de glatirâmer

Em todas as visitas foram realizados procedimentos de avaliação clínica, RM de 3 Tesla e coleta de sangue periférico.

Quadro 4 - Avaliações realizadas em cada visita

Visita 1 = 0 m	Visita 2 = 6 m	Visita 3 =12 m
Anamnese Exame físico	Anamnese Exame físico	Anamnese Exame físico
RM* de crânio de 3 Tesla	RM* de crânio de 3 Tesla	RM* de crânio de 3 Tesla
Coleta matutina de sangue-EDTA**	Coleta matutina de sangue-EDTA**	Coleta matutina de sangue-EDTA**

*Ressonância magnética, ** ácido etilenodiamino tetra-acético

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram recrutados pacientes alfabetizados, com idade entre 18 e 60 anos, com diagnóstico de EMRR confirmado, segundo os critérios clínicos propostos por McDonald revisados em 2010 (Polman *et al*, 2011); virgens de tratamento ou que estivessem em uso de IFN-β ou AG por pelo menos 6 meses antes da inclusão no estudo; com um escore do EDSS entre 0 e 5,5; conforme estudos pivotais (*Interferon beta-1B for multiple sclerosis*, 1993; Jacobs *et al*, 1996); e com último surto definido há mais de 3 meses do início do estudo.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com diagnóstico de EMPP ou EMSP; uso de corticoide em menos de 3 meses antes do início do estudo; história clínica de doenças psiquiátricas diagnosticadas, exceto depressão maior, e outras doenças neurológicas que acometam o SNC; pacientes com déficit visual, auditivo ou de linguagem que impedissem a realização dos testes, de acordo com a avaliação do examinador; presença de comorbidades que pudessem

interferir no desempenho cognitivo, tais como: hipotireoidismo, hipovitaminose B12, deficiência de ácido fólico, histórico de traumatismo cranioencefálico grave e outras a critério do investigador; diagnóstico clinicamente definido ou provável de demência degenerativa, vascular ou mista; pacientes analfabetos; e pacientes com histórico de uso abusivo de álcool e/ou drogas ilícitas. Após inclusão no estudo na visita 1, foram excluídos pacientes que se ausentaram em uma das visitas, que não realizaram RM de crânio ou coleta de sangue periférico.

4.2.3 Análise de subgrupos

Os subgrupos analisados foram selecionados com base em vários estudos clínicos prévios, que demonstraram que determinados fatores são potenciais preditores de resultados clínicos em pacientes com EMRR (Agius *et al*, 2014; Meng *et al*, 2015; Cree *et al*, 2018; Hamidi *et al*, 2018). Os estudos clínicos fase III com fingolimode, TRANSFORMS (Cohen *et al*, 2010), FREEDOMS (Devonshire *et al*, 2012) e FREEDOMS II (Calabresi, Radue, *et al*, 2014) e os estudos posteriores de reanálise, incluindo estudos *pos hoc* (Cohen *et al*, 2013; Agius *et al*, 2014; Kremenchutzky *et al*, 2014; Vermersch *et al*, 2017) e de extensão (Meng *et al*, 2015; Cohen *et al*, 2016), agruparam os pacientes nos seguintes critérios: idade, sexo; histórico de tratamento prévio, número de surtos antes do início do estudo e incapacidade baseada no escore do EDSS.

Modificações foram realizadas em algumas definições de subgrupo após avaliação dos ensaios clínicos fase III com fingolimode (Devonshire *et al*, 2012; Cohen *et al*, 2014; Cohen *et al*, 2016). Resumidamente, conforme (Derfuss *et al*, 2016), as definições foram modificadas para harmonizar os dados do presente estudo com um número de pacientes menor em um menor tempo de acompanhamento, assegurando uma representação adequada de cada grupo para permitir comparações clinicamente significativas.

A TAS utilizada em vários ensaios clínicos na EM ao longo dos anos (Paty e Li, 1993; Johnson *et al*, 1995; Jacobs *et al*, 1996; Li e Paty, 1999; Comi *et al*, 2001; Giovannoni *et al*, 2017), incluindo ensaios clínicos com fingolimode (Agius *et al*, 2014; Meng *et al*, 2015; Cree *et al*, 2018; Hamidi *et al*, 2018) justificada pelo grande número amostral nesses estudos, diferentemente do presente estudo, foi substituída pelo seguinte índice: número de surtos dividido pelo número de pacientes de cada grupo e este quociente por sua vez dividido

pelo tempo total de doença em anos (doença-ano). Esse índice foi utilizado recentemente em ensaios clínicos que realizaram estudos de correlação na EM com biomarcadores imunes (Lanzillo *et al*, 2017; Balasa *et al*, 2018; Barcutean *et al*, 2018).

A divisão de faixa etária nos pacientes com EMRR utilizando o limite de idade de 37 anos, descrito nos estudos FREEDOMS (Devonshire *et al*, 2012) e FREEDOMS II (Calabresi, *et al*, 2014) não foi utilizado neste estudo devido ao número limitado de pacientes com idade superior a 37 anos (apenas 3 pacientes). Fundamentado nos ensaios clínicos com análise *pos hoc* (Derfuss *et al*, 2015; De Stefano *et al*, 2016; Khatri, 2016) na avaliação de critérios de imagem, utilizou-se o critério de número de lesões novas ponderadas na sequência T2/FLAIR. Da mesma forma, com base nos estudos de correlação de biomarcadores imunes com dados clínicos (Balasa *et al*, 2017; Barcutean *et al*, 2018), adicionou-se o critério à RM de carga lesional acumulada baseada no volume de lesões ponderadas na sequência T2/FLAIR. O número de novas lesões e volume de carga lesional foram comparados especificamente na visita 3 em relação ao basal, pela baixa sensibilidade dos métodos se comparados um período menor de 12 meses (Zivadinov *et al*, 2018). Não foi considerado o critério de aumento das lesões previamente existentes na sequência ponderada em T2/FLAIR, uma vez que estudos anteriores demonstraram uma baixa concordância entre avaliadores para esta metodologia em condições clínicas de rotina (Zivadinov *et al*, 2018). A avaliação do realce de gadolínio na RM não foi utilizada nos estudos de correlação por tratar-se de uma variável categórica.

Conforme critérios utilizados nos ensaios clínicos prévios com fingolimode (Cohen *et al*, 2013), o surto foi definido como a presença ou o reaparecimento de um novo sintoma atribuível à EM acompanhado de deterioração objetiva no exame neurológico com duração de pelo menos 24 horas, na ausência de febre e precedida de estabilidade neurológica por pelo menos 30 dias (Cohen *et al*, 2010). A piora da incapacidade aferida pelo escore do EDSS, conforme ensaios clínicos anteriores (Agius *et al*, 2014; Cree *et al*, 2018; Hamidi *et al*, 2018), foi definida como o aumento de $\geq 1,5$ pontos, se o escore basal de EDSS foi 0, ou aumento de $\geq 1,0$ ponto, se o escore EDSS basal foi > 0 e $< 5,5$ e confirmado com 6 meses de intervalo entre as aferições. O critério de aumento $\geq 0,5$ ponto (se o escore basal de EDSS for $\geq 5,5$) não foi utilizado

neste estudo, pois não houve pacientes com este escore basal, tanto na primeira visita como no seguimento do estudo.

Para os estudos de correlação, em relação ao escore do EDSS, diferentemente de ensaios clínicos prévios (Cohen *et al*, 2010; Devonshire *et al*, 2012), não houve divisão de subgrupos, devido ao reduzido número de pacientes alocados e pelo fato de o escore de EDSS basal ter sido menor que 5,0 em todos os pacientes avaliados. Ainda para os estudos de correlação foi utilizado o número de surtos totais por grupo nos 12 meses do estudo e não o quociente resultante da taxa de número de surtos pelo tempo de doença/ano por ser uma variável quantitativa resultante de um quociente (taxa) e o coeficiente de correlação de *Spearman*, utilizado no presente estudo, é um método não proposto para este tipo de correlação (Spearman *et al*, 1904).

4.3 Coleta de dados clínicos

Todos os pacientes foram atendidos pela equipe de neuroimunologia do Hospital São Lucas da PUCRS, no período de março de 2016 a setembro de 2017. Cada paciente realizou três visitas clínicas, com intervalo de 6 meses entre as visitas. Foram feitos os procedimentos de anamnese e exame físico para aferição do padrão de gravidade da doença, incluindo realização do escore do EDSS, avaliação da presença ou não de surto confirmado no período prévio à visita, realização de RM de crânio com protocolo específico para EM definido no item 4.4 e coleta de sangue periférico.

4.4 Ressonância Magnética de crânio

A aquisição de imagem foi realizada em um aparelho GE signa HDxT scanner com 8 canais de 3,0 Tesla. As imagens de encéfalo foram anatomicamente adquiridas conforme os seguintes parâmetros: para adquirir sequências ponderadas em T1 tridimensionalmente nos planos axial, sagital e coronal utilizaram-se os parâmetros TE/Tr=2,18/6,12 ms, *flip angle*=11, *matrix size*=256x256, FOV=256 mm, cortes de tamanho de 1mm, *gap* entre cortes de 0mm, com um protocolo de 196 cortes para esta sequência, utilizando sequências pré e pós utilização de contraste gadolínio (15 ml por paciente); e para adquirir as sequências T2 tridimensionalmente nos planos axial, sagital e coronal utilizou-se sequência *FLAIR* e os parâmetros TE/TR=135,4/7.000 ms,

flip angle=90, *matrix size=256x256*, FOV=240 mm, cortes de tamanho de 1 mm e *gap* entre cortes de 0mm, com um protocolo de 180 cortes para esta sequência. Para avaliação de volume de carga lesional nas sequências ponderadas em T2/FLAIR utilizou-se o software LST (*Lesion Segmentation Tool*) e o algoritmo utilizado foi o LGA (*Lesion Growth Algorithm*) (Rio *et al*, 2017).

4.5 Coleta de amostras do sangue periférico

A coleta de sangue periférico foi realizada em todos os pacientes elegíveis no estudo nas três visitas após exame físico e anamnese e antes da realização da RM. As amostras de sangue foram colhidas após avaliação clínica no período matutino entre 8h00 e 12h00 para diminuir o viés de aferição associado a mudanças no ciclo circadiano dos biomarcadores colhidos (De *et al*, 2018). Esta coleta foi realizada através de punção em vaso periférico, colhido 20 a 30 ml em tubos de EDTA com anticoagulante. Todas as amostras foram centrifugadas por pelo menos 15 minutos a 1.000 xg prioritariamente após 30 minutos da coleta de sangue para eliminar células e outros materiais insolúveis, conforme a técnica utilizada por Zhong *et al* (2016). As alíquotas foram imediatamente armazenadas em *ultra-freezer* a - 80°C para posterior transporte e processamento.

As amostras de plasma dos pacientes foram transportadas para o Instituto de Ciências Biológicas da USP (ICB-USP) em gelo seco a temperatura variando entre -80 a -100°C até entrega do material, conforme normativa da ANVISA para transporte de material biológico por agência oficial. Uma vez confirmada a viabilidade do material entregue ao ICB-USP, o Instituto posteriormente procedeu com o processamento das alíquotas encaminhadas.

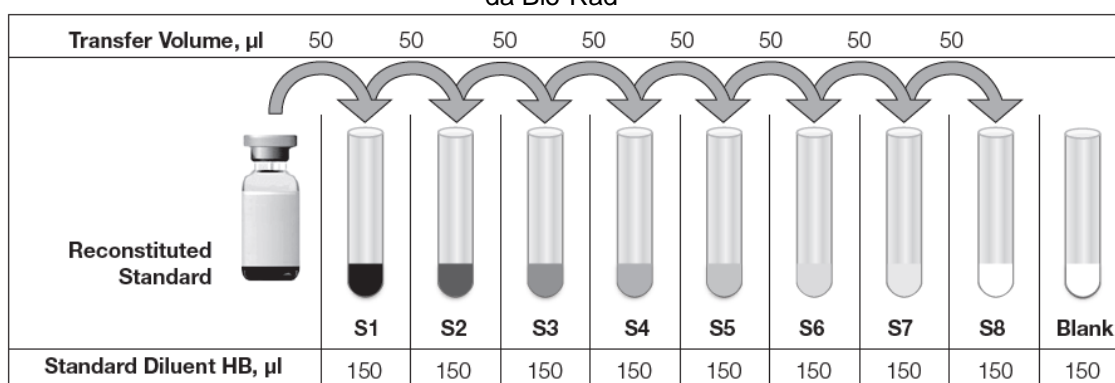
4.6 Quantificação dos biomarcadores imunes

Os níveis plasmáticos dos 11 biomarcadores imunes sCD40L, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-31, IL-33, TNF- α e IFN- γ , foram avaliados pelo *kit Bio-plex Pro Human Th17 Cytokine Assay* da *Bio-Rad*, Cat. #171AA001M, seguindo as instruções do fabricante, conforme técnica utilizada por Zhong *et al* (2016) , Balasa *et al* (2017) e Barcutean *et al* (2018).

Para a realização do experimento, inicialmente foram preparadas as soluções necessárias através da adição dos seus respectivos diluentes. Para as

beads de captura, foram adicionados 5,472 µl de *Assay Buffer*, para o anticorpo de detecção adicionaram-se 2,755 µl do "*Detection Ab diluent*"; no caso da "*Streptavidin -PE*", foram adicionados 5,940 µl de "*assay buffer*" e, por fim, foram adicionados 781 µl do *standard diluent* na "*Standard Solution*" para a realização da curva de diluição seriada, seguida de *vortex* por 5 segundos e incubação no gelo por 30 minutos. Posteriormente à incubação, a solução *standard* foi seguida de diluição seriada de 1:4, dividida em 8 pontos diferentes (S1-S8), representados pela figura abaixo.

Figura 1 - Adaptada do manual de instruções do kit Bio-plex Pro Human Th17 Cytokine Assay da Bio-Rad



Fonte: kit Bio-plex, 2017

Após as preparações iniciais, deu-se início ao procedimento. Primeiramente, foram adicionados 50 µl *beads* de captura em cada amostra, incluindo os poços da curva de diluição, seguidas de duas lavagens com 100 µl do *Bio-plex wash buffer*. Em seguida, foram adicionados 50 µl das amostras, incluindo os padrões da curva e amostras em branco, e incubados por uma noite a 4 °C no escuro a 850 rpm. Posteriormente à incubação foram realizadas mais duas lavagens, seguidas da adição de 25 µl do anticorpo de detecção em cada amostra e incubação de 30 minutos no escuro em temperatura ambiente a 850 rpm. Após este período de incubação, foram realizadas três lavagens, seguidas da adição de 50 µl da "*Streptavidin-PE*" em cada amostra, sucedida de incubação de dez minutos no escuro a 850rpm seguida de mais três lavagens. Por fim, as amostras foram ressuspendidas em 125 µl do "*Assay Buffer*", a leitura foi realizada no Luminex200 e os dados foram analisados utilizando *Bioplex software Manager 6.0*.

4.7 Análise Estatística

A hipótese de normalidade da distribuição das variáveis numéricas contínuas foi verificada pelo teste *Shapiro Wilk*. As variáveis numéricas que apresentaram distribuição normal gaussiana foram expressas em termos de média \pm desvio padrão. As variáveis numéricas que não apresentaram distribuição normal gaussiana foram expressas em termos de mediana, 1º e 3º quartis. As variáveis categóricas foram expressas em termos de frequências e porcentagens. Na comparação de médias de variáveis com distribuição normal gaussiana em 2 grupos independentes, aplicou-se o teste paramétrico *t student*. Quando os grupos eram dependentes, aplicou-se o teste *t student* pareado. Na comparação de medianas de variáveis sem distribuição normal gaussiana em 2 grupos independentes, aplicou-se o teste não paramétrico de *Mann Whitney U test*.

Com o objetivo de mensurar os biomarcadores plasmáticos comparando o comportamento das variáveis quantitativas ao longo de três momentos entre os dois grupos, ajustaram-se estas variáveis utilizando a análise de variâncias para medidas repetidas de duas vias (*ANOVA two-way*). Nos estudos de correlação dos resultados laboratoriais com os dados clínicos e de imagem, quando aplicável, utilizou-se o teste de medidas repetidas com o *post hoc* de Bonferroni. Para avaliar a magnitude de correlação entre as variáveis quantitativas discretas e contínuas, optou-se por utilizar o coeficiente de correlação de *Spearman*. As variáveis categóricas e as variáveis quantitativas resultantes de um quociente não foram avaliadas por este coeficiente de correlação pela limitação do método em avaliar estas variáveis (*Spearman et al, 1904*). As análises foram realizadas no *software* SPSS18 e Minitab17. Um nível de significância de 0,05 foi considerado.

4.8 Aspectos éticos

Este ensaio clínico seguiu os *guidelines* de ética da Declaração de Helsinki de 2013 e as normas estabelecidas para realização de pesquisa com seres humanos pelo Conselho Federal de Psicologia – Resolução nº 016/2000 e pelo Conselho Regional de Saúde (1996) – Resolução nº 196/96. Além destes quesitos, o presente estudo se adequou ao regulamento para a realização de

Pesquisa Clínica estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – RDC nº 36/2012.

Este projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa na PUC do RS e aprovado em 06 de junho de 2015 sob o parecer 1.094.228 com o registro pelo CAAE número **23949813.7.0000.5336**. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual informou os objetivos da pesquisa, o caráter voluntário da participação, todos os procedimentos e os riscos e benefícios em que os pacientes estavam envolvidos.

4.9 Conflitos de interesse

Este estudo acadêmico foi financiado pela Novartis. Os autores não receberam reembolso ou benefícios financeiros. Novartis não desempenhou nenhum papel no desenho do estudo, métodos, gerenciamento de dados ou análise ou na decisão de publicar.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica dos grupos

Na Tabela 1 é possível avaliar as variáveis clínicas dos dois grupos. Em relação ao gênero, registrado conforme cada paciente se autointituiu, participaram no estudo 6 homens e 6 mulheres no grupo 1 e 4 homens e 8 mulheres no grupo 2, com idade média de 28,29 ($\pm 7,80$) no grupo 1 e 30,46 ($\pm 8,15$) no grupo 2. As variáveis gênero ($p=0,680$) e raça ($p=1,000$) não apresentaram associação estatisticamente significativa entre os grupos, o que implica dizer que as frequências dos gêneros e das raças foi similar entre os dois grupos avaliados. Não houve também diferença estatística entre o tempo de doença do grupo 1 em relação ao grupo 2 ($p=0,060$).

Tabela 1 - Associação das variáveis do estudo entre os dois grupos

Variáveis clínicas	Grupo 1	Grupo 2	p-valor
Gênero¹	12	12	0,680
Masculino	6(50,0)	4(33,3)	
Feminino	6(50,0)	8(66,7)	
Tempo de doença antes² (meses) (n₁=12; n₂=12)	55,50 (13,0–86,25)	13,0 (7,25–27,75)	0,060
Idade (anos)³ (n₁=12; n₂=12)	28,29($\pm 7,80$)	30,46($\pm 8,15$)	0,512
EDSS na 1ª visita³(n₁=12; n₂=12)	2,25($\pm 1,47$)	2,88($\pm 1,69$)	0,345
EDSS na 2ª visita³(n₁=12; n₂=12)	2,13($\pm 1,32$)	2,58($\pm 1,40$)	0,417
EDSS na 3ª visita³(n₁=11; n₂=12)	1,96($\pm 1,31$)	2,04($\pm 0,94$)	0,856
Nº surtos/tempo de doença-ano¹ 1ª visita⁴	0,667	1,500	<0,001*
Nº surtos/tempo de doença-ano¹ 2ª visita⁴	0,833	0,500	0,19
Nº surtos/tempo de doença-ano¹ 3ª visita⁴	0,182	0,167	1,00

Média (\pm desvio padrão); Mediana (1^o-3^o quartis); Frequência (%); ¹Teste exato de Fisher; ²Teste de Mann Whitney; ³Teste *t-student*; ⁴Teste Z de comparação de proporções.

A Tabela 2 demonstra todos os imunomoduladores utilizados no grupo 1 na 1ª visita, sendo que a maioria estava em uso de IFN- β (11 pacientes) e por um tempo médio de uso antes do início do estudo de 22,00 meses.

Tabela 2 - Subtipo de imunomodulador em uso na 1ª visita

Imunomodulador em uso na 1ª visita ¹	Número (%)
Número total de imunomodulador na 1ª visita ¹	12
IFN-β** 1a IM	2(16,7)
IFN-β** 1b SC	2(16,7)
AG***	1(8,3)
IFN-β** 1b SC 44 mcg	7(58,3)
Tempo médio de uso do imunomodulador (n=12) ²	22,00 (8,25–61,50)

Média (\pm desvio padrão); Mediana (1^o-3^o Quartis); Frequência (%); ¹Teste Exato de Fisher; ²Teste Wilcoxon; $p < 0,05$ **beta-interferon***Acetato de Glatirâmer

Apenas dois pacientes do grupo 2 na primeira visita permaneceram em observação estendida de 6 para 9 horas no protocolo de primeira dose para fingolimode por bradicardia assintomática. Dois pacientes, um do grupo 1 na primeira visita e um do grupo 2 na segunda visita, realizaram coleta de sangue entre 12h e 15h por atraso na realização do protocolo de RM.

Um paciente do grupo 1 foi excluído do estudo após a segunda visita por desistência. Nenhum paciente apresentou critério de falência terapêutica durante o período de 12 meses.

5.2 Avaliação do número de surtos por tempo de doença-ano e escore do EDSS entre os dois grupos

Em relação à atividade clínica da doença, pode-se concluir que houve diferença entre os grupos no número de surtos por tempo total de doença-ano apenas na visita 1, sendo significativamente maior no grupo 2 ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os dois grupos, quando comparada a EDSS na primeira visita 1 ($p = 0,345$) e após 6 ($p = 0,417$) e 12 meses ($p = 0,856$) conforme descritos anteriormente na Tabela 1.

5.3 Avaliação do número de surtos por tempo de doença-ano e escore do EDSS por grupos separadamente

Na Tabela 3 encontram-se os números de surtos por tempo de doença-ano para a 1ª visita, aos 6 e 12 meses, bem como o p -valor para as comparações das taxas em cada grupo separadamente para os períodos de 12 meses em relação aos 6 meses e ao basal. É possível verificar que apenas para

o grupo 2 houve uma queda significativa no número de surtos por tempo de doença-ano em 12 meses quando comparado com o basal ($p < 0,001$).

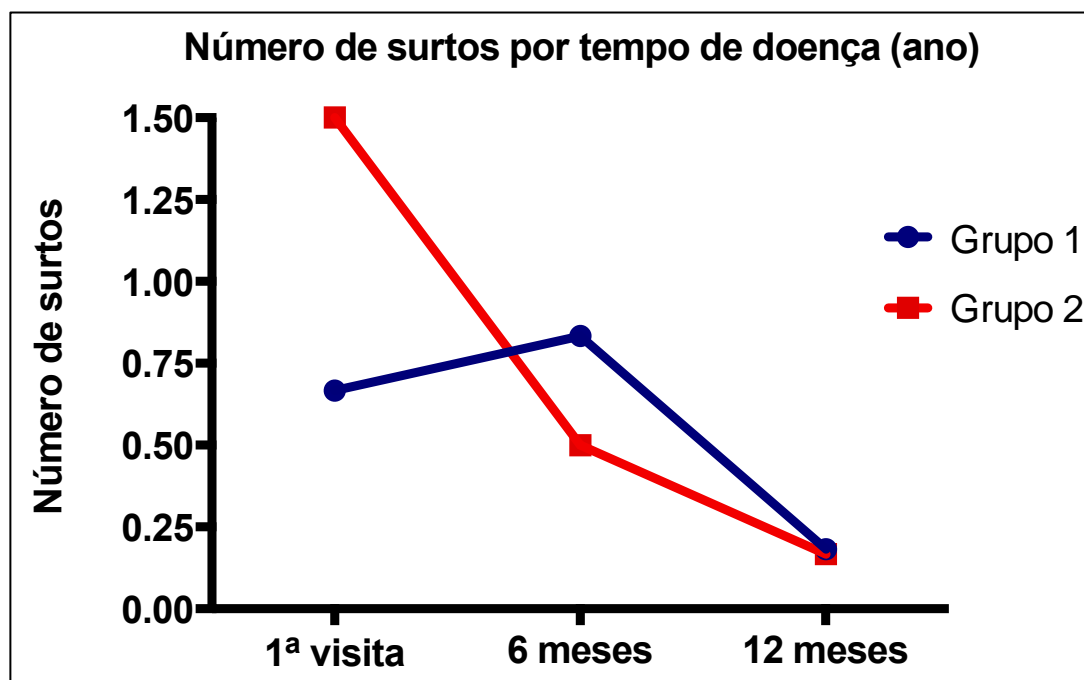
Tabela 3 - Número de surtos por tempo de doença-ano nos grupos 1 e 2

Variáveis	Nº surtos / tempo de doença-ano		
	1ª visita (n=12)	6 meses (n=12)	12 meses (n=12) ^c
Grupo 1	0,667	0,833	0,182
p-valor ²			0,171 ^a 0,106 ^b
Grupo 2	1,500	0,500	0,167
p-valor			<0,001 ^{*a} 0,540 ^b

Teste Z; ^a comparação tempo 12 meses e 1ª visita; ^b comparação tempo 12 meses e 6 meses; ^c n=11 para Grupo 1 e n=12 para Grupo 2; *p<0,05.

É possível verificar pelo Gráfico 1 que a queda no número de surtos por tempo de doença-ano para o grupo 2 é mais acentuada do que para o grupo 1, o que ilustra o resultado da Tabela 3.

Gráfico 1- Número de surtos por tempo de doença-ano nos grupos 1 e 2



Na Tabela 4 e Gráfico 2 encontram-se os valores médios do escore EDSS aos 12 meses e na 1ª visita, bem como o p -valor para as comparações das médias em cada grupo. É possível verificar que no grupo 2 houve uma

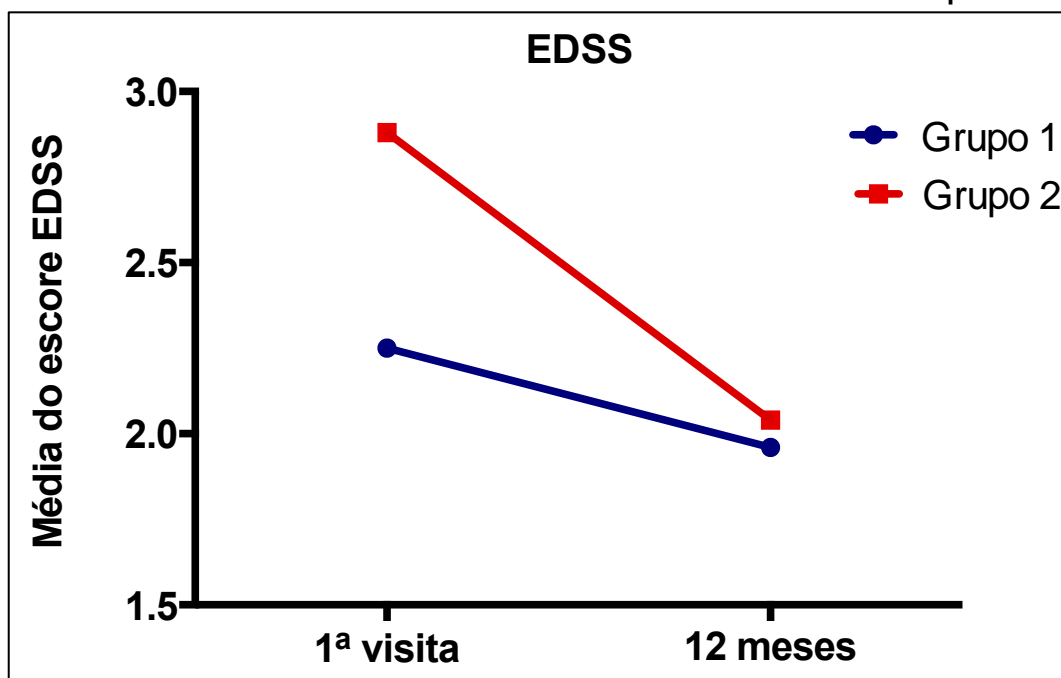
diferença significativa no escore de EDSS de 12 meses comparado aos valores da 1ª visita ($p=0,050$). Não houve uma diferença significativa na EDSS de 12 meses comparado aos valores da 1ª visita no Grupo 1 ($p=0,192$).

Tabela 4 – Avaliação do EDSS entre a 1ª visita e aos 12 meses nos grupos 1 e 2

Variáveis	EDSS	
	1ª visita (n=12) ^c	12 meses (n=12) ^c
Grupo 1	2,25 ($\pm 1,47$)	1,96 ($\pm 1,31$)
p-valor ²	0,192 ^a	
Grupo 2	2,88 ($\pm 1,69$)	2,04 ($\pm 0,94$)
p-valor	0,050 ^a	

Teste t-pareado; ^acomparação tempo 12 meses e 1ª visita; ^cn=11 para Grupo 1 e n=12 para Grupo 2.

Gráfico 2 - Média do escore do EDSS na 1ª visita e aos 12 meses nos Grupos 1 e 2



5.4 Resultados dos biomarcadores plasmáticos

Foram avaliadas 71 amostras dos pacientes de cada grupo nas três visitas, mensurando 11 biomarcadores imunes. Os resultados de todos os biomarcadores mensurados (em pg/ml) estão descritos na Tabela 5:

Tabela 5 - Concentração dos biomarcadores nos dois grupos nas três visitas em pg/ml

Marcadores pg/ml	Grupo 1 Visita 1	Grupo 2 Visita 1	Grupo 1 Visita 2	Grupo 2 Visita 2	Grupo 1 Visita 3	Grupo 2 Visita 3
sCD40L	117,14±30,16	84,70±13,03	62,88±14,14	76,85±15,89	9,10±3,48	4,29±0,83
IL-31	188,47±29,55	144,84±20,77	123,22±22,95	124,62±16,19	38,98±9,95	31,45±4,23
IL-22	2,54±0,75	1,40±0,19	1,09±0,30	1,91±0,18	1,54±0,70	0,42±0,10
IL-1β	0,32±0,87	0,40±0,14	0,17±0,52	0,30±0,08	0,09±0,03	0,18±0,06
IL-6	2,49±0,62	2,31±0,60	2,56±0,65	1,63±0,38	2,12±0,61	1,63±0,27
IL-17A	0,52±0,12	0,68±0,25	0,48±0,19	0,50±0,16	0,27±0,10	0,56±0,19
IL-17F	4,79±0,97	5,78±1,65	3,79±1,26	4,06±1,07	4,56±0,95	4,61±1,35
IL-21	19,08±5,86	23,09±9,98	16,85±11,41	13,37±4,85	7,69±4,04	9,38±3,54
IL-33	5,81±1,51	5,19±1,58	6,43±1,90	3,81±0,93	6,34±1,51	2,66±0,75
TNF-α	5,65±0,71	3,99±0,40	5,37±0,94	3,52±0,27	3,62±0,67	2,63±0,26
IFN-γ	3,33±0,51	2,98±0,22	1,84±0,90	2,47±0,93	1,07±0,51	1,39±0,75

Os quadros seguintes 5 e 6 evidenciam a evolução dos níveis plasmáticos dos biomarcadores ao longo do tratamento.

Quadro 5 - Evolução plasmática dos biomarcadores no grupo 1

Marcadores pg/ml Grupo 1	Visita 2 em relação à visita 1	Visita 3 em relação à visita 2	Visita 3 em relação à visita 1
sCD40L	Reduziu	Reduziu	Reduziu **
IL-31	Reduziu	Reduziu*	Reduziu **
IL-22	Reduziu	Aumentou	Reduziu
IL-1β	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IL-6	Aumentou	Reduziu	Reduziu
IL-17A	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IL-17F	Reduziu	Aumentou	Reduziu
IL-21	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IL-33	Reduziu	Reduziu	Reduziu
TNF-α	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IFN-γ	Reduziu	Reduziu	Reduziu

*p<0,05; p<0,001**

Quadro 6 - Evolução plasmática dos biomarcadores no grupo 2

Marcadores pg/ml Grupo 2	Visita 2 em relação à visita 1	Visita 3 em relação à visita 2	Visita 3 em relação à visita 1
sCD40L	Reduziu	Reduziu*	Reduziu*
IL-31	Reduziu	Reduziu**	Reduziu**
IL-22	Aumentou	Reduziu	Reduziu
IL-1 β	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IL-6	Reduziu	Inalterado	Reduziu
IL-17A	Reduziu	Aumentou	Reduziu
IL-17F	Reduziu	Aumentou	Reduziu
IL-21	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IL-33	Reduziu	Reduziu	Reduziu
TNF- α	Reduziu	Reduziu	Reduziu
IFN- γ	Reduziu	Reduziu	Reduziu

*p<0.05; **p<0.01

Não houve diferença estatística quando comparados os dois grupos nas três visitas. Avaliando-se os grupos separadamente, percebe-se que o grupo 1 apresentou níveis reduzidos da IL-31 e do receptor solúvel sCD40L após 12 meses de tratamento ($p<0,001$). É interessante observar que a mudança no tratamento de GA e IFN- β para fingolimode deste grupo levou à redução nos níveis plasmáticos da IL-31 após 6 meses do tratamento ($p<0,05$). No grupo 2, a IL-31 e o receptor solúvel sCD40L apresentaram uma redução significativa após 12 meses de tratamento com fingolimode ($p<0,001$ e $p<0,05$ respectivamente). A redução para estes dois biomarcadores foi mais acentuada após 6 meses de terapia com fingolimode, ($p<0,05$), como pode-se observar nos Gráficos 3 e 4. Os demais biomarcadores não apresentaram diferença estatística apesar da redução plasmática em relação ao basal conforme demonstrado nos Quadros 5 e 6.

No Gráfico 3 pode-se ver a concentração plasmática da IL-31 e no Gráfico 4, a concentração plasmática do receptor solúvel sCD40L.

Gráfico 3 - Nível plasmático da IL-31 por grupos

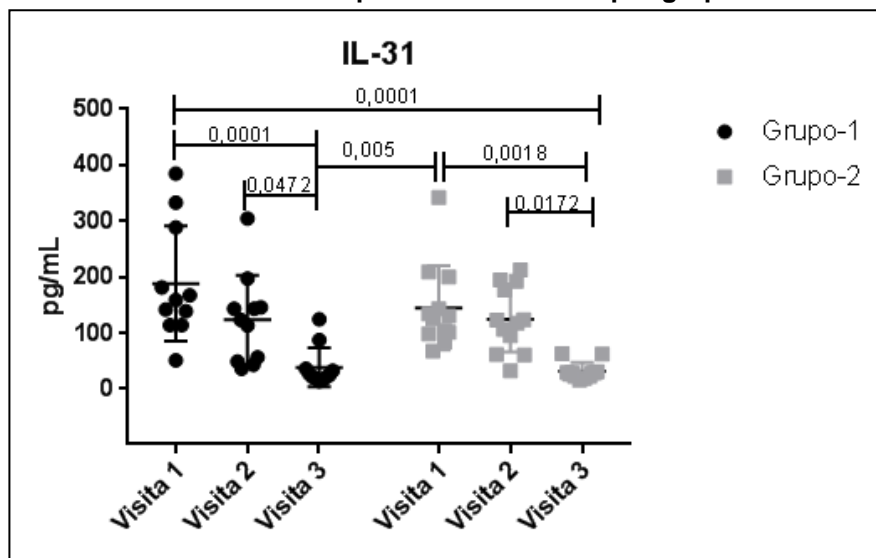
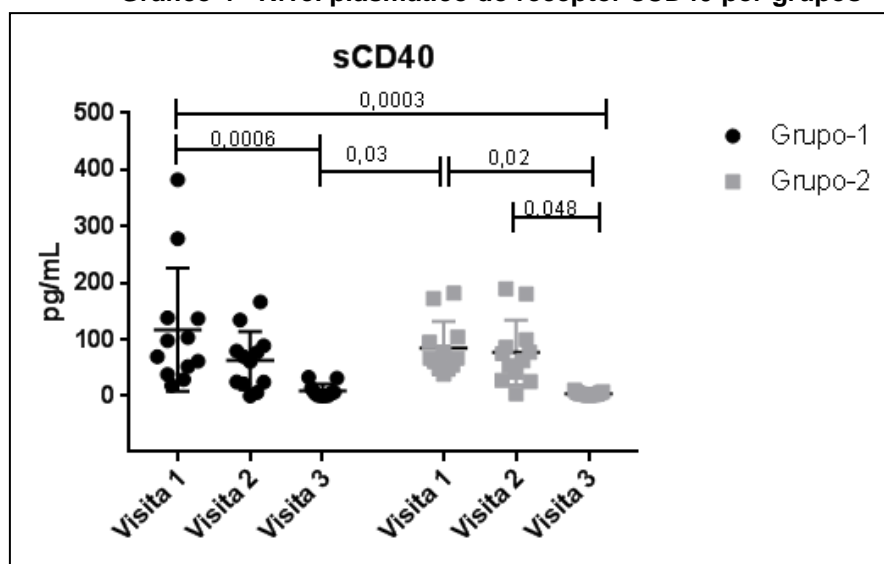


Gráfico 4 - Nível plasmático do receptor sCD40 por grupos



5.5 Estudos de correlação entre os biomarcadores plasmáticos, as variáveis clínicas e de imagem

Para observar a magnitude de correlação entre os níveis plasmáticos do receptor sCD40L e da IL-31 ao longo do estudo, bem como destes dois biomarcadores com as variáveis clínicas e de imagem foi realizado o estudo de *Sperman*. Se demonstrou uma correlação positiva entre a redução dos níveis plasmáticos destes biomarcadores ($r=0,834$, $p<0.001$). Todas as variáveis estão na Tabela 6.

Tabela 6 - Correlação dos biomarcadores IL-31 e sCD40L avaliando os grupos conjuntamente

Variáveis dos dois grupos	Correlação (<i>Sperman's rho</i>)	IL-31	sCD40L
IL-31	Coeficiente de correlação	-	,834*
	Valor p	-	,000
	Número de pacientes	23	23
sCD40L	Coeficiente de correlação	,834*	-
	Valor p	,000	-
	Número de pacientes	23	23
Volume de lesões nas sequências ponderadas em T2/FLAIR** entre as visitas 3 e 1	Coeficiente de correlação	-,299	-,282
	Valor p	,155	,181
	Número de pacientes	23	23
Número de lesões nas sequências ponderadas em T2/FLAIR** entre as visitas 3 e 1	Coeficiente de correlação	-,051	-,090
	Valor p	,816	,685
	Número de pacientes	23	23
Número de surtos	Coeficiente de correlação	-,174	,371
	Valor p	,426	,090
	Número de pacientes	23	23
Escore do EDSS	Coeficiente de correlação	,063	-,541
	Valor p	,768	,080
	Número de pacientes	23	23

*($p < 0,001$)**FLAIR: T2 weighted fluid attenuated inversion recovery

Para observar a magnitude de correlação do receptor sCD40L e da IL-31 no grupo 1 com múltiplas variáveis clínicas, de imagem e de outros biomarcadores ordenados, demonstrou-se uma correlação positiva significativamente entre a IL-31 e a IL-33 ($r=0,762$; $p=0,028$) e entre o receptor sCD40L e as interleucinas IL1- β ($r=0,800$; $p=0,003$) e IL-17A ($r=0,782$; $p=0,04$). Todas as variáveis estão na Tabela 7.

Para observar a magnitude de correlação do receptor sCD40L e da IL-31 no grupo 2 com múltiplas variáveis clínicas, de imagem e de outros biomarcadores ordenados, demonstrou-se uma correlação positiva significativa entre o receptor sCD40L e os biomarcadores TNF- α ($r=0,882$; $p=0,001$), IL-17A ($r=0,443$; $p=0,00$), IL-17F ($r=0,881$; $p=0,004$), IL-21 ($r=0,688$; $p=0,019$) e IFN- γ ($r=0,605$; $p=0,032$) e a redução plasmática dos níveis de IL-31 se correlacionou negativamente com o número de lesões nas sequências ponderadas em T2/FLAIR ($r=-0,591$; $p=0,043$). Todas as variáveis estão na Tabela 8.

Tabela 7 - Correlação dos biomarcadores IL-31 e sCD40L no grupo 1 avaliando os 12 meses do estudo

Variáveis no grupo 1	Correlação (Sperman's rho)	sCD40L	IL-31
sCD40L	Coeficiente de correlação	-	,445
	Valor p	-	,170
IL-31	Coeficiente de correlação	,445	-
	Valor p	,170	-
Número de lesões nas sequências ponderadas em T2/FLAIR**	Coeficiente de correlação	,-151	,073
	Valor p	,658	,831
Volume de lesões nas sequências ponderadas em T2/FLAIR**	Coeficiente de correlação	,096	,106
	Valor p	,778	,757
TNF- α	Coeficiente de correlação	,509	-,100
	Valor p	,110	,770
IFN- γ	Coeficiente de correlação	,600	,491
	Valor p	,055	,125
IL-22	Coeficiente de correlação	,500	,500
	Valor p	,253	,253
IL1- β	Coeficiente de correlação	,800*	,055
	Valor p	,003	,873
IL-6	Coeficiente de correlação	,-600	-,409
	Valor p	,055	,212
IL-17A	Coeficiente de correlação	,782*	,173
	Valor p	,004	,612
IL-17F	Coeficiente de correlação	,500	,464
	Valor p	,253	,294
IL-21	Coeficiente de correlação	,612	-,067
	Valor p	,060	,855
IL-33	Coeficiente de correlação	,429	,762*
	Valor p	,289	,028
Número de surtos	Coeficiente de correlação	,509	,155
	Valor p	,110	,650
Escore do EDSS	Coeficiente de correlação	,005	-,333
	Valor p	,988	,317

* ($p < 0.05$)** FLAIR: T2 weighted fluid attenuated inversion recovery

Tabela 8 - Correlação dos biomarcadores IL-31 e sCD40L no grupo 2 avaliando os 12 meses do estudo

Variáveis no grupo 2	Correlação (<i>Sperman's rho</i>)	sCD40L	IL-31
sCD40L	Coeficiente de correlação	-	,191
	Valor p	-	,574
IL-31	Coeficiente de correlação	-,191	-
	Valor p	,574	-
Número de lesões nas sequências ponderada em T2/FLAIR***	Coeficiente de correlação	,481	-,591*
	Valor p	,135	,043
Volume de lesões nas sequências ponderada em T2/FLAIR***	Coeficiente de correlação	,468	,304
	Valor p	,146	,338
TNF- α	Coeficiente de correlação	,882**	-,098
	Valor p	,000	,762
IFN- γ	Coeficiente de correlação	,645*	-,413
	Valor p	,032	-,183
IL-22	Coeficiente de correlação	,300	,322
	Valor p	,433	,364
IL1- β	Coeficiente de correlação	,527	-,545
	Valor p	,096	,067
IL-6	Coeficiente de correlação	-,264	-,161
	Valor p	,433	,618
IL-17A	Coeficiente de correlação	,433**	-,500
	Valor p	,000	,667
IL-17F	Coeficiente de correlação	,881*	,083
	Valor p	,004	,831
IL-21	Coeficiente de correlação	,688*	-,137
	Valor p	,019	,672
IL-33	Coeficiente de correlação	,430	-,118
	Valor p	,214	-,729
Número de surtos	Coeficiente de correlação	,318	-,427
	Valor p	,340	,167
Escore do EDSS	Coeficiente de correlação	,274	-,575
	Valor p	,415	,065

* p<0,05 ** p<0,001 *** FLAIR: T2 weighted fluid attenuated inversion recovery

6. DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar se o tratamento com fingolimode como medicamento de primeira escolha representaria uma melhora clínica em relação aos pacientes tratados previamente com AG ou IFN- β , quantificou-se o índice de número de surtos por tempo de doença-ano. Os resultados apontam que, ao fim do período de um ano, não há diferenças neste índice, quando comparadas as duas estratégias. Contudo, vale ressaltar que os pacientes do grupo 2, virgem de tratamento, iniciaram o tratamento com um índice de surtos significativamente maior ($p < 0,001$) e apresentaram uma queda significativa ao longo do estudo após 12 meses de tratamento com fingolimode ($p < 0,001$). Tal achado sugere uma melhor resposta terapêutica no grupo 2 após 12 meses de terapia com fingolimode.

No grupo 1, no mesmo período de 12 meses não se evidenciou diferença significativa na redução no índice de surtos ($p = 0,171$) sugerindo uma melhor resposta clínica no grupo 2 provavelmente pelo tempo de tratamento superior a 6 meses por uma terapia sabidamente mais eficaz que o IFN- β (Bergvall *et al*, 2013; Singer *et al*, 2013). O estudo TRANSFORMS evidenciou uma redução relativa na TAS de 52% no grupo em tratamento com fingolimode em comparação à 38% no grupo em tratamento com IFN- β (Cohen *et al*, 2010). O estudo de fase III FREEDOMS demonstrou uma redução na TAS de 54% no grupo em uso de fingolimode em comparação ao grupo placebo ($p < 0,001$) (Kappos *et al*, 2010).

Associado à redução significativa do índice de número de surtos por tempo de doença-ano, os pacientes do grupo 2 também apresentaram uma queda significativa no escore do EDSS durante o mesmo período de tratamento ($p = 0,05$). Este resultado se justifica pela redução significativa no número de surtos e sugere que o fingolimode, além de ser uma terapia mais eficaz que o IFN- β e o AG (Braune *et al*, 2016) possivelmente apresenta uma ação neuroprotetora na doença (Cohen *et al*, 2011).

A redução no escore do EDSS no presente estudo não foi significativa entre grupos provavelmente pela comparação ter sido realizada com um grupo controle em tratamento com IFN- β . O estudo TRANSFORMS de forma similar não evidenciou redução significativa entre os grupos tratados (2,21 no escore do EDSS no grupo tratado com fingolimode versus 2,19 no grupo em uso de IFN- β)

(Cohen *et al*, 2010). O estudo FREEDOMS diferentemente demonstrou uma redução significativa nos pacientes em tratamento com fingolimode de 17,7% versus 24,1% nos pacientes do grupo placebo ($p < 0,001$) provavelmente pela comparação ter sido realizada com grupo placebo (Kappos *et al*, 2010). Esta diferença significativa apresentada no estudo FREEDOMS não se manteve no estudo de extensão FREEDOMS II (Calabresi *et al*, 2014).

Em relação aos resultados dos biomarcadores imunes plasmáticos avaliados, dois potenciais biomarcadores foram identificados no presente estudo, o receptor sCD40L e a interleucina 31 (IL-31). Esses potenciais biomarcadores imunes reduziram de forma correlata ($p < 0,001$) seus níveis plasmáticos nos pacientes com EMRR após 12 meses de tratamento com fingolimode.

A molécula CD40 é uma proteína de membrana da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral TNF- α (Rep *et al*, 1996) expressa por células imunes e não-imunes. O seu ligante, o receptor não solúvel CD40L, é uma proteína expressa de forma transitória, principalmente na superfície de membrana dos linfócitos T *helper* CD4+ ativados. A proteína CD40 induz a atividade pró-inflamatória linfocitária por estimular a ativação e maturação dos linfócitos B (Katsiari *et al*, 2002; Gramatica *et al*, 2003) e por aumentar a afinidade dos linfócitos B ativos (Elgueta *et al*, 2009). O receptor CD40L pode ser expresso também em outras células, como as plaquetas (Nurden, 2011), células endoteliais e células musculares lisas (Kornbluth *et al*, 1998).

A interação CD40-CD40L desempenha um papel fundamental na indução e regulação da atividade pró-inflamatória da resposta imune inata (Stasiolek *et al*, 2006); (Aarts, Seijkens, Van Dorst, *et al*, 2017) e adaptativa por ativação dos Linfócitos T e B (Kornbluth *et al*, 1998; Laman, De Boer, *et al*, 1998; Howard *et al*, 1999; Drescher *et al*, 2000; Bilinska, 2003). Esta ativação pró-inflamatória pela interação CD40-CD40L ocorre na EM (Gerritse *et al*, 1996) por possível ativação intracelular do complexo pró-inflamatório *NF-Kappa B* (Chen *et al*, 2016).

A ativação do complexo CD40-CD40L também está associada ao processo de diferenciação do linfócito Th17 (Iezzi *et al*, 2009) e à ativação astrocitária (Xiao *et al*, 2000) e microglial nas doenças neuroimunológicas, sendo

que a ativação microglial provavelmente ocorra por regulação negativa do complexo MAPKSrc/p44/42 MAPK (Tan *et al*, 2000).

Gerritse *et al* (1996) demonstraram em um estudo de autópsia a presença de linfócitos T CD4+ expressando o receptor CD40L nos infiltrados perivasculares em pacientes com EM, bem como em um modelo experimental de EAE. Laman, Van Meurs, *et al* (1998) demonstraram, posteriormente, em um modelo de EAE em macacos (*Callithrix jacchus*), uma correlação da interação CD40-CD40L na estimulação da atividade pró-inflamatória na EM. Bilinska *et al* (2006) avaliaram a expressão do receptor CD40L nos linfócitos T no sangue periférico e no LCR por citometria de fluxo em pacientes com EM e observaram expressão de CD40L nos linfócitos T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico. Estes achados sugerem que o aumento da expressão do receptor CD40L na EM não se limita aos linfócitos no infiltrado perivascular do SNC, mas também ocorre nos linfócitos periféricos em diferentes estágios clínicos da EM (Bilinska *et al*, 2006).

A interação CD40-CD40L, além de desempenhar papel fundamental nas doenças neurológicas autoimunes (Pelfrey *et al*, 2005), está associada à patogênese de doenças infecciosas (D'aversa *et al*, 2002), vasculares (Mach *et al*, 1998), ateroscleróticas (Laman, De Boer, *et al*, 1998), disfunção plaquetárias (Aloui *et al*, 2014) e nas doenças neurodegenerativas (Chabot *et al*, 2001).

Recentemente se demonstrou que a redução plasmática do receptor CD40L se correlacionou a uma melhor tolerância imunológica (Challa *et al*, 2016), redução do estado pró-aterosclerótico (Mach *et al*, 1998) e da permeabilidade da BHE (Aarts *et al*, 2017). A relação entre o aumento da expressão do receptor CD40L e a piora da permeabilidade da BHE foi demonstrado também em um estudo clínico em pacientes portadores de HIV (Davidson *et al*, 2012).

Entretanto observa-se a existência de dados conflitantes em relação à interação do complexo CD40-CD40L na atividade pró-inflamatória (Wagner *et al*, 2014), uma vez que um estudo clínico em pacientes portadores EM não demonstrou correlação entre a atividade do complexo CD40-CD40L com surto ou piora clínica da doença (Smagina *et al*, 2015). Um modelo de EAE, por sua vez, evidenciou uma possível correlação do receptor CD40L no processo de remielinização (Drescher *et al*, 2000).

Apesar destes dados conflitantes, um estudo clínico com pacientes portadores de EM evidenciou uma relação entre a presença de SNPs = rs1883832C>T e uma redução da inibição do complexo CD40-CD40L como um fator de risco isolado na patogênese da EM (Wagner *et al*, 2015). Além disso, o aumento na expressão do receptor CD40L em pacientes com neuromielite óptica, em pacientes com EM virgens de tratamento (Kong *et al*, 2017; Zhong *et al*, 2016), em pacientes com EMRR em atividade (Sofa *et al*, 2005) e em pacientes com EMSP (Zabaleta *et al*, 2002; Fillion *et al*, 2003; Herman *et al*, 2018) sugere com robustez que o receptor CD40L atue como um indutor pró-inflamatório nas doenças neuroimunológicas. Corroborando esta hipótese, dados recentes demonstram que a redução do complexo CD40-CD40L está associada a resposta terapêutica na EM (Carrieri *et al*, 2015).

A despeito de dados iniciais com IFN- β e AG não evidenciarem uma redução do receptor CD40L (Rep *et al*, 1996; Liu *et al*, 2001), estudos recentes demonstraram que IFN- β (De *et al*, 2018) e AG (Chen *et al*, 2016) reduzem a expressão do receptor CD40L em pacientes com EMRR (Teleshova *et al*, 2000). Isso decorre, provavelmente, de uma redução na expressão de IFN- γ (Nagai *et al*, 2007; Habets *et al*, 2013) e da produção de IL-6 (Balasa *et al*, 2017). Ademais, essa redução se correlacionou com a diminuição do número de surtos e de novas lesões ponderadas na sequência T2/FLAIR (De *et al*, 2018).

Um estudo experimental em cobaia transplantada evidenciou a redução nos níveis do receptor CD40L após uso de fingolimode (Yan *et al*, 2005). Em pacientes com EMRR, fingolimode inibiu a produção da citocina IL-12p70, induzida pelo receptor CD40L, provavelmente por reduzir a ativação de células dendríticas derivadas de monócito e de macrófago (Durafour *et al*, 2011). Recentemente, outro estudo experimental com fingolimode associado a um anticorpo monoclonal anti-CD40L demonstrou um bloqueio nas vias do complexo CD40-CD40L (Yan *et al*, 2005) e consequente redução da atividade pró-inflamatória. Por fim, um estudo clínico fase IIa com fingolimode evidenciou uma redução na expressão de CD40L em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (Berry *et al*, 2017).

A forma solúvel do receptor CD40L (sCD40L), também conhecida como CD154 (Kornbluth *et al*, 1998; Vakkalanka *et al*, 1999), possui propriedades semelhantes ao receptor não solúvel CD40L (Kornbluth *et al*,

1998), e seu nível circulante reflete a ativação do complexo CD40-CD40L (Vakkalanka *et al*, 1999; Smagina *et al*, 2015). O receptor solúvel sCD40L liga-se à proteína de membrana CD40, formando o complexo CD40-CD40L e modificando a expressão de RNA mensageiro (RNAm) na atividade pró-inflamatória de pacientes com EMRR (Huang *et al*, 2000). No sangue periférico, sabe-se que o receptor solúvel sCD40L é produzido principalmente pela eliminação na superfície das plaquetas e dos linfócitos T ativados, existindo normalmente no sangue periférico na forma de trímeros (Aloui *et al*, 2014).

Este receptor solúvel desempenha um papel importante na neuroinflamação, principalmente pelo aumento da expressão de moléculas de adesão celular, citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases da matrix extracelular (Chen *et al*, 2016). Um modelo experimental de EAE demonstrou que a redução do fator sCD40L pelo anticorpo monoclonal anti-CD145 se correlacionou com a redução da atividade inflamatória (Howard *et al*, 1999). Masuda *et al* (2017) demonstraram que o aumento do fator solúvel sCD40L no LCR em 29 pacientes com EM se correlacionou com aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 no LCR. Posteriormente, o mesmo autor correlacionou o aumento plasmático de sCD40L com aumento da permeabilidade da BHE em um modelo experimental de célula endotelial microvascular de cérebro humano (Masuda *et al*, 2018).

Zhong *et al* (2016) em um estudo transversal, avaliaram os níveis séricos do receptor não solúvel CD40L em 27 pacientes com NMO, 19 pacientes com EMRR e 14 controles saudáveis (CTLs). As concentrações séricas do receptor CD40L nos pacientes com NMO, EMRR e CTLs foram $3087,30 \pm 790,27$, $2878,10 \pm 606,56$ e $2200,60 \pm 938,53$ pg/ml, respectivamente. A concentração sérica do receptor CD40L foi significativamente maior em pacientes com doença desmielinizante inflamatória do que nos CTLs ($p < 0,05$). Uma comparação nas concentrações do receptor CD40L nos dois subgrupos de doenças desmielinizantes inflamatórias demonstrou que a concentração do receptor CD40L foi maior nos pacientes com NMO que nos pacientes com EMRR, mas essa tendência não foi estatisticamente significativa ($p = 0,255$) sugerindo uma possível correlação entre CD40L e atividade inflamatória humoral na fisiopatogênese da doença. Apesar de um número reduzido de pacientes, os autores sugerem que o receptor CD40L esteja não apenas associado à

imunidade celular mas também à ativação pró-inflamatória humoral na EM e na NMO.

Masuda *et al* (2017) avaliaram 29 pacientes com EMRR, 29 pacientes com NMO e 27 pacientes com outras doenças neuroinflamatórias (DN). Analisaram a concentração do receptor sCD40L no LCR e no sangue periférico em todos os pacientes durante um surto. Os níveis séricos e no LCR do receptor sCD40L foram significativamente superiores nos pacientes com EMRR em comparação aos pacientes com DN ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos níveis séricos ou no LCR do receptor sCD40L entre os pacientes com EMRR em comparação aos pacientes com NMO ($p = 0,071$). Nos pacientes com EMRR tanto os níveis séricos quanto os níveis no LCR do receptor sCD40L foram significativamente elevados, mas apenas os níveis séricos do receptor sCD40L demonstraram uma correlação positiva com o coeficiente de albumina ($p < 0,05$), sugerindo o envolvimento desse receptor com o aumento da permeabilidade da BHE nos pacientes com EMRR. Pelo baixo peso molecular do receptor sCD40L (18 kDa), muito menor que a albumina (66 kDa), acredita-se que possa ocorrer um acesso mais fácil no SNC desse receptor pois uma molécula de peso menor se equilibra mais rapidamente entre o sangue e o LCR quando comparado à uma molécula maior (Smagina *et al*, 2015). Possivelmente o receptor solúvel sCD40L, seja um biomarcador líquido de quebra de BHE, posteriores estudos com desenhos mais robustos poderão ratificar esta hipótese.

Recentemente Lanzillo *et al* (2017) avaliaram prospectivamente o perfil de biomarcadores imunes séricos em 45 pacientes com EMRR, sendo 22 EMRR *naïves* e 23 EMRR em tratamento com IFN- β 1a IM. Os autores correlacionaram os níveis séricos com atividade e progressão da doença. Níveis aumentados de IL-6, receptor sCD40L e leptina no início do estudo associaram-se a um número maior de surtos e maior risco de um novo surto no ano seguinte ($p < 0,001$). Em particular, um aumento de um (01) ng/ml do valor basal do receptor sCD40L no início do estudo foi associado a um aumento de 2,45 vezes no número de surtos durante um ano de seguimento ($p < 0,001$) sugerindo que níveis mais elevados do receptor sCD40L no início do estudo foram associados a um maior número de surtos no ano seguinte. Apesar dos autores não encontrarem correlação entre os níveis do receptor sCD40L e realce ao gadolínio na RM ($p = 0,674$) ou com o escore do EDSS ($p = 0,287$), sugeriram que o receptor sCD40L possa ser um

possível biomarcador de atividade de doença e capaz de prever uma resposta reduzida ao tratamento com IFN- β .

Herman *et al* (2018) avaliaram o perfil de seis biomarcadores imunes no LCR e correlacionaram com cinco variáveis na RM em 16 pacientes EMSP, 30 pacientes com EMRR e 10 CTLs em um estudo prospectivo com o objetivo de distinguir imunobiologicamente o fenótipo EMSP do EMRR. Entre outras variáveis, os níveis do receptor sCD40L apresentou-se elevado no LCR nos pacientes com EMSP em relação aos pacientes com EMRR ($p < 0,05$) sugerindo que o receptor sCD40L seja um biomarcador de progressão da doença e possivelmente associado as formas clinicamente mais graves.

A IL-31 foi recentemente descrita como a principal citocina pró-inflamatória envolvida nas reações alérgicas cutâneas (Choi *et al*, 2017; Kim *et al*, 2018; Takamori *et al*, 2018), na piora clínica da asma (Ferretti *et al*, 2017); (Chen *et al*, 2018) e nas doenças dermatológicas autoimunes, como a psoríase (Mehul *et al*, 2017). Acredita-se que esta atividade pró-inflamatória esteja possivelmente associada à liberação de mastócitos (MCs) e à ativação da cascata inflamatória por ativação linfocitária (Park *et al*, 2012).

Os MCs são originários das células mielóide pluripotentes CD34+ e CD117+ (Gillfillan *et al*, 2011) e apresentam múltiplas funções, incluindo a tolerância imunológica (Frenzel *et al*, 2013). Estão distribuídos na maioria dos tecidos, principalmente nos vasos sanguíneos e no nervo periférico onde são reconhecidos como células em forma de fuso (Bonnekoh *et al*, 2018). Os MCs residem também no SNC em diferentes regiões, incluindo área postrema, tálamo, hipotálamo, leptomeninges, plexo coróide e na dura-máter da medula espinhal (Forsythe, 2018).

Os MCs são geralmente reconhecidos por sua contribuição nas respostas alérgicas imunomediadas por imunoglobulinas tipo E (IgE) relacionadas à resposta Th2 (Gillfillan *et al*, 2011). Entretanto, é amplamente aceito que os MCs são células efetoras também em respostas imunes inatas (Kritas *et al*, 2013) e nas respostas imunes adaptativas associadas à resposta Th17 (Milovanovic *et al*, 2012). O padrão de resposta multifásica pró-inflamatória dos MCs, em que liberam material granular pré-formado em minutos e mediadores recém-sintetizados nas próximas horas, possibilita suas ações como catalisadores que amplificam e prolongam numerosas células vasoativas e

imunoativas (Dong *et al*, 2014). Os MCs interagem com astrócitos, micróglia e endotélio, através da liberação de neuropeptídeos, óxido nítrico, fatores de crescimento tumorais, metaloproteínases e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e IL-6 (Gillfillan *et al*, 2011). Essas células medeiam a inflamação e a desmielinização, apresentando antígeno aos linfócitos T, aumentando a permeabilidade da BHE e, conseqüentemente, o influxo de células e de citocinas inflamatórias para o SNC (Skaper *et al*, 2014; Dong *et al*, 2014).

Postula-se que exista uma correlação entre a IL-31 e ativação mastocitária no SNC (Che *et al*, 2018) em vários processos neuroinflamatórios (Skaper *et al*, 2014), incluindo a EM (Kempuraj *et al*, 2016). Kim *et al* (2011) relataram *in vitro* que os astrócitos ativados pela interação do complexo CD40-CD40L em cultura induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias via ativação de GTPases e essas citocinas secretadas reativam os astrócitos via Jak/STAT1701 liberando mais citocinas que contribuem na manutenção do processo pró-inflamatório em modelos de EAE.

No presente estudo, os níveis plasmáticos do receptor sCD40L e da IL-31 foram mais elevados no grupo 1, previamente tratado com imunomodulador na primeira visita, em relação ao grupo 2 formado por pacientes com EM virgens de tratamento na visita 1, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos. Essa diferença é explicável por um possível “*up-regulation*” plasmático imunomodulatório destes dois biomarcadores imunes nos pacientes em tratamento com IFN- β por período superior a 2 anos conforme descrito por Liu *et al*, (2001) e recentemente sugerido por Guerrero-Garcia De *et al* (2018). Outra hipótese é o fato dos IFN- β serem uma classe menos eficaz na inibição das vias pró-inflamatórias em relação às terapias recentes como o fingolimode (He *et al*, 2015).

Guerrero-Garcia De *et al* (2018) aferiram transversalmente os níveis séricos do receptor sCD40L e da IL-31 em 73 pacientes com EMRR tratados com IFN- β ou AG comparado a controles saudáveis. Em todos os subgrupos analisados por esses autores, as concentrações séricas desses biomarcadores foram menores nos pacientes com EMRR quando comparados aos controles. A média dos níveis do receptor sCD40L foram de 121 \pm 11,1 pg/ml no grupo com EMRR em uso de imunomodulador versus 970,5 \pm 113,1 pg/ml no grupo controle ($p < 0,0001$). Os valores da IL-31 foram 43,4 \pm 5,64 pg/ml nos pacientes com

EMRR versus $158,2 \pm 16,9$ pg/ml nos controles ($p < 0,0001$) demonstrando uma redução sérica provavelmente associado ao tratamento com imunomodulador. Os autores demonstraram uma correlação entre a redução do nível sérico do receptor sCD40L a um maior tempo de tratamento com imunomodulador e sugerem que o IFN- β e o AG possivelmente reduzam os níveis de autoanticorpos na EM contra bainha mielina oligodendrocitária por redução sérica do receptor sCD40L, através da modulação na fosforilação das vias pró-inflamatórias *NF-kappaB* nos linfócitos B ativados, modulação esta proposta recentemente por outro grupo (Chen *et al*, 2016).

Ao término de 12 meses, os níveis plasmáticos do receptor sCD40L e da IL-31 foram mais elevados no grupo 1 em relação ao grupo 2. No grupo 2 esta redução plasmática se acentuou após 6 meses de tratamento com fingolimode ($p < 0,05$). Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, possivelmente esses níveis justificam-se pelo efeito terapêutico do fingolimode intensificado após 12 meses de tratamento. É possível que o fingolimode induza a redução plasmática do receptor sCD40L reduzindo a capacidade dos linfócitos T CD4+ e CD8+ em ativarem linfócitos B e outras células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (Taylor *et al*, 2012).

O presente estudo evidenciou uma correlação positiva significativa entre o receptor sCD40L e estas interleucinas, IL-1 β ($r=0,800$; $p=0,003$) e IL-17A ($r=0,782$ $p=0,04$) no grupo 1 na visita três após seis meses de tratamento com fingolimode, sugerindo uma ação inibitória comum do receptor solúvel e dessas citocinas por esta terapia, possivelmente pela redução periférica dos linfócitos Th1 e Th17 circulantes (Sato *et al*, 2014; Eken *et al*, 2017) com consequente diminuição da infiltração linfocitária no SNC (Cohen e Chun, 2011). IL-1 β e IL-17 são interleucinas pró-inflamatórias associadas à ativação de linfócitos Th1 e Th17 respectivamente (Prajeeth *et al*, 2017). Barcutean *et al* (2018) demonstraram uma correlação negativa entre os níveis séricos de IL1- β , IL-17A e tempo de duração de doença, ressaltando o crucial papel dessas citocinas em especial na cascata imune inicial da EM.

IL-1 β é uma citocina também secretada por mastócitos e tem sido associada na fisiopatogênese de vários processos neuroinflamatórios (Bonnekoh *et al*, 2018). A redução do seu nível plasmático, associada a redução do receptor sCD40L, pode sugerir, indiretamente uma possível diminuição da

atividade mastocitária pelo fingolimode. Os MCs expressam dois dos cinco receptores S1PRs (S1P1 e S1P2). O receptor S1P1 regula a migração dos MCs para locais de inflamação e o receptor S1P2 regula a degranulação mastocitária (Punnet et al, 2004). Kleinjan *et al* (2013) em um estudo de rinite alérgica experimental, sugeriram que o fingolimode induza a apoptose de mastócitos, atuando preferencialmente nos MCs recém-recrutados, enquanto os MCs residentes não são afetados. Os autores sugerem que o fingolimode tópico iniba a resposta Th2 por inibição mastocitária, dados esses corroborados posteriormente em um estudo experimental com fingolimode tópico na dermatite alérgica (Tsuji *et al*, 2015) sugerindo uma possível ação anti-mastocitária pelo fingolimode.

O presente estudo evidenciou uma correlação positiva significativa entre a IL-31 e IL-33 ($r=0,762$; $p=0,028$). Estudos recentes têm correlacionado fisiopatologicamente a IL-31 com a IL-33, sugerindo que a presença de uma interleucina possa estimular a outra, amplificando a neuroinflamação por coestimulação, conhecido como o eixo pró-inflamatório IL-31/IL-33 (Di Salvo *et al*, 2018). A IL-33 é uma interleucina pertencente à família da IL-1, que também inclui IL-1 α e β , que por sua vez desempenham um papel importante na inflamação típica de doenças alérgicas mediada por linfócitos Th2 (Stott *et al*, 2013).

IL-33 estimula também linfócitos Th17 ativados de origem pulmonar (Jaligama *et al*, 2018) bem como estimula a maturação e ativação de mastócitos. Recentemente, propuseram que a IL-33 possa ter uma dupla função, atuando extracelularmente como uma citocina pró-inflamatória e intracelularmente como um fator nuclear regulando a expressão gênica (Wong *et al*, 2012). Essa interleucina exerce sua ação, na superfície das células citadas acima, pelo receptor T1/ST2 (ST2) estimulando a secreção de fatores pró-inflamatórios, como os leucotrienos, a IL-6 e o TNF- α ativando desta forma a resposta pró-inflamatória na asma, no LES e nas dermatites atópicas (Qiao e Chen, 2018). Na EM, postula-se que esse eixo IL-31/IL-33 ative e induza a progressão da doença por ação mediada por MCs ativados no SNC (Sosvorova *et al*, 2015). Deste modo, como sugerido anteriormente, é possível que a redução plasmática deste eixo seja justificada por uma ação anti-mastocitária perceptível após 6 meses de tratamento com fingolimode no grupo 1.

Os níveis plasmáticos de TNF- α e de IFN- γ se correlacionaram com a redução dos níveis plasmáticos do receptor sCD40L, ($r=0,882$; $p=0,001$) e ($r=0,605$; $p<0,05$) respectivamente após 12 meses de tratamento com fingolimode no grupo 2; achados esses consistentes com outros estudos de correlação Barcutean *et al* (2018). TNF- α e o IFN- γ estão entre as principais citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo linfócito Th1 e conjuntamente estão associadas na fisiopatogênese da EM mediada por resposta celular principalmente (Herman *et al*, 2018). O fingolimode sabidamente possui ação sobre IFN- γ reduzindo a resposta Th1 (La mantia *et al*, 2016; Sato *et al*, 2018), justificando a redução plasmática destas citocinas no presente estudo por inibição da resposta Th1. Esses potenciais biomarcadores também são secretados por MCs ativados (Gillfillan *et al*, 2011) e uma possível ação anti-mastocitária na redução plasmática destes biomarcadores pelo fingolimode não pode ser descartada (Tsuji *et al*, 2015).

IL17-F é uma das citocinas mais importantes secretadas pelos linfócitos Th17, provavelmente por modular a expressão de citocinas que exercem efeitos pró-inflamatórios associados à resposta Th1, como o TNF- α (Korn *et al*, 2009). Níveis séricos elevados de IL-17F têm sido associados a resposta subótima à IFN- β em pacientes com EMRR (Qu *et al*, 2013). Os achados do presente estudo evidenciaram uma correlação positiva entre a redução plasmática do receptor sCD40L e das interleucinas IL-17F ($r=0,881$; $p<0,05$) e IL-17A ($r=0,443$; $p<0,001$), possivelmente pelo fato da ativação do complexo pró-inflamatório CD40-CD40L influenciar a diferenciação de linfócitos em Th17 (Iezzi *et al*, 2009). O fingolimode sabidamente reduz o nível sérico das citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo linfócito Th-17, possivelmente por sequestro periférico desses linfócitos (Sato *et al*, 2018), justificando os níveis plasmáticos reduzidos de IL-17A e IL17-F após 12 meses de tratamento com fingolimode no grupo 2. É possível, portanto, que a redução da resposta Th17 pelo fingolimode decorra também por uma ação inibitória do receptor solúvel sCD40L.

O presente estudo demonstrou uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos do receptor sCD40L e da IL-21 no grupo 2, tratado desde o princípio com o fingolimode ($r=0,688$; $p=0,019$). Linfócitos Th17 também secretam IL-21. Essa interleucina pró-inflamatória também ativa linfócitos T

auxiliares foliculares e células *natural killer* (NK) (Ghalamfarsa *et al*, 2016), estimula a diferenciação de linfócitos B (Yoshizaki *et al*, 2012) e a suprime da ação imunomodulatória pelos linfócitos Treg. A IL21 tem sido sugerida como indutora de doença autoimune, incluindo a EM (Tzartos *et al*, 2011). O presente estudo encontrou uma correlação entre os níveis plasmáticos destes biomarcadores, sugerindo que a redução dos níveis da IL-21 possa, igualmente, estar associada à redução da resposta Th17 pelo fingolimode, redução essa, intensificada após 12 meses de tratamento.

Nesse estudo, no grupo 2, os níveis da IL-31 se correlacionaram inversamente com o número de lesões nas sequências ponderadas em T2/*FLAIR* ($r=-0,591$; $p<0,05$) após 12 meses de terapia com fingolimode, possivelmente pela manutenção de atividade da doença na RM às custas, principalmente, do acúmulo de novas lesões ponderadas T2/*FLAIR* por atividade residual apesar da redução significativa dos biomarcadores pró-inflamatórios sCD40L e IL-31 ao longo do estudo. Esses achados corroboram resultados similares do estudo de extensão do TRANSFORMS, evidenciando atividade da doença na imagem em 50% dos pacientes em tratamento com fingolimode após um ano (Cohen *et al*, 2016).

Houve uma correlação positiva significativa entre o receptor sCD40L e a IL-31 ao longo dos 12 meses de tratamento ($r=0,834$; $p<0,001$), quando avaliados os dois grupos conjuntamente. Estes dois biomarcadores imunes possivelmente exercem um efeito pró-inflamatório de comodulação na fisiopatogênese da doença e estes dados são compatíveis com os resultados de Guerrero-Garcia De *et al* (2018) que demonstraram também uma correlação entre a redução dos níveis de sCD40L e IL-31 em pacientes com EMRR que receberam tratamento com GA ou IFN- β ($p<0,0001$).

Balasa *et al* (2017) avaliou 15 biomarcadores imunes séricos em um estudo prospectivo avaliando 29 pacientes com EMRR em uso de NTZ por 8 meses controlado por 29 indivíduos saudáveis. Entre outros achados, demonstraram que os níveis séricos da IL-31 (68,98 pg/ml) foram reduzidos em relação aos controles ($p<0,05$) e se correlacionaram negativamente com tempo de doença ($r=-0,355$; $p<0,05$) e duração de tratamento ($r=-0,413$; $p<0,05$) e positivamente com o número de surtos antes do início do tratamento ($r=-0,348$; $p<0,05$). O receptor sCD40L se correlacionou negativamente com número de

surtos antes do início do tratamento ($r=-0,388$ $p < 0,05$) e positivamente com a idade ($r=0,423$; $p < 0,05$) sugerindo que esses biomarcadores possam estar associados à resposta terapêutica ao NTZ.

Barcutean *et al* (2018) avaliaram o painel imune periférico no soro de 70 pacientes, sendo 53 com EMRR e 17 com EMSP, tratados por mais de 10 anos com IFN β -1b. Foram analisadas 15 biomarcadores imunes e correlacionaram com o escore do EDSS e a TAS. Dois grupos foram definidos com base nos níveis de incapacidade, calculados usando o escore do EDSS: G1 (EMRR) e G2 (EMSP). Similar aos achados de Guerrero-Garcia *et al* (2018) e ao presente estudo, os autores evidenciaram que o receptor sCD40L foi fortemente correlacionado com os níveis da IL-31 nas duas formas de EM, G1 ($r=0,692$; $p < 0,0001$) e G2 ($r=0,653$; $p < 0,005$). Sugeriram que estes dois biomarcadores imunes são possivelmente alvos na terapia da EM por inibição do eixo IL-31/sCD40L ou por modulação da IL-31 para uma resposta antiinflamatória mais específica, derivada diretamente da resposta Th2. Os autores sugeriram, pela presença de correlações significativas entre o receptor sCD40L e duração da doença ($r=0,474$; $p < 0,05$) e entre a IL-31 e idade ($r=0,584$; $p < 0,05$) no grupo G1; exista uma possível comodulação pró-inflamatória idade dependente nos pacientes com EMRR. Futuros estudos serão necessários para elucidar esta hipótese de comodulação.

Guerrero-Garcia *et al* (2018) e Barcutean *et al* (2018) sugerem uma comodulação pró-inflamatória do eixo IL31-sCD40L na fisiopatogênese da EM, possivelmente por ativação mastocitária pelo receptor sCD40L e pela IL-31. Acredita-se que a redução dos níveis plasmáticos deste eixo, além de ocorrer provavelmente por um bloqueio periférico da migração linfocitária (Lee *et al*, 2010; Henault *et al*, 2013), possivelmente esteja associada a um outro mecanismo imunológico do fíngolimode através de uma ação antimastocitária por inibição da fosfolipase A2 em uma via independente do receptor S1P1 (Payne *et al*, 2007).

Outra possibilidade para essa relação pode ser explicada da seguinte forma: encontramos uma redução significativa nos níveis plasmáticos do receptor sCD40L e da L-31, é plausível pensar que a coestimulação de outros biomarcadores imunes também esteja reduzida pois evidenciamos correlação na redução plasmática desses biomarcadores com outros biomarcadores pró-

inflamatórios: IL-1 β , IL-17A e 17B, IL-21, IL-33, TNF- α e IFN- γ sugerindo uma redução nas respostas Th1 e Th17. A esse respeito, tem sido relatado que os linfócitos T de memória reativos à mielina em pacientes com EM consistem de uma proporção maior de linfócitos Th1 (Paroni *et al*, 2017) e Th17 (Sie *et al*, 2014). Embora pouco se saiba sobre o papel dos linfócitos T de memória no desenvolvimento da EM, os linfócitos Th1 e Th17 reativos à MBP compreendem mais de 80% dos linfócitos T de memória CD 45 + de pacientes com EM (Qu *et al*, 2013).

Estes dados sugerem que a IL-31 e o receptor sCD40L possam ser utilizados como potenciais biomarcadores de resposta terapêutica nos pacientes com EM tratados com fingolimode, pois a redução plasmática desses potenciais biomarcadores pode refletir uma diminuição na resposta Th1 e Th17 além de uma possível redução da resposta Th2 mediada por MCs durante o tratamento da doença com fingolimode (Kleinjan *et al*, 2013; Tsuji *et al*, 2015).

Diferentemente dos estudos citados, no presente estudo não identificamos correlação positiva significativa entre a redução plasmática da IL-31 ou do receptor sCD40L com o número de surtos, o escore EDSS ou com o número de lesões ponderadas nas sequências T2/FLAIR. Possivelmente se justifica pelo número restrito de pacientes, a utilização de desfechos clínicos clássicos e pelo período de acompanhamento restrito a 12 meses. Os dados do presente estudo sugerem uma redução desses potenciais biomarcadores pelo fingolimode na população estudada possivelmente por uma ação na atividade subclínica da doença pois a redução dos biomarcadores imunes pró-inflamatórios que se correlacionaram com a redução plasmática da IL-31 e do receptor sCD40L são sabidamente envolvidos na fisiopatogênese e progressão da doença (Paroni *et al*, 2017; Sie *et al*, 2014). Algumas limitações em avaliar esses biomarcadores associados à atividade subclínica da doença são justamente a dificuldade em correlacionar com desfechos clínicos de atividade da doença e de neuroimagem (Comabella *et al*, 2014).

Dado o amplo espectro de impacto da sinalização do receptor sCD40L na resposta imune, múltiplos estudos com pró-drogas estão em andamento focando este receptor como antígeno alvo, como o estudo fase II em pacientes com LES em uso de Toralizumab (IDEC-131), um anticorpo monoclonal anti-CD40L (Kalunianet *et al*, 2002). Essas terapias têm como alvo a inibição do eixo

CD40-CD40L possivelmente por modular as respostas influenciadas por essa via (Karnell *et al*, 2018).

Novos estudos clínicos com desenhos robustos são necessários para avaliar a possível correlação da IL-31 na fisiopatologia da EM (Franzoi *et al*, 2018). Vale ressaltar que uma relação clínica entre a EM e a asma já foi proposta (Skaper *et al*, 2017). Além disso, conforme sugerido por Guerrero-García (De *et al*, 2018), há uma possível correlação entre doenças que afetam diferentemente o sistema imunológico, como as alergias dermatológicas, a asma e a EM. Sugere-se ainda que essas relações possam ser mediadas pela IL-31 e possivelmente o conhecimento desta interação será útil na abordagem de novas estratégias imunoterapêuticas na EM (Kim *et al*, 2010; Kempuraj *et al*, 2016).

Será necessário explorar o impacto imunomodulatório do receptor sCD40L e da IL-31, pois a inibição destas múltiplas vias pró-inflamatórias indutoras de atividade mastocitária (CD40-CD40L e IL-31/IL-33) (Kim *et al*, 2011; Sosvorova *et al*, 2015) possivelmente reduzirá a atividade pró-inflamatória na EM dados estes que deverão ser confirmados em estudos clínicos futuros (Aarts *et al*, 2017).

Entre as limitações deste estudo citamos a ausência de um grupo controle de pacientes saudáveis, amostra restrita do número de biomarcadores, acompanhamento de apenas doze meses, ausência de estudos de correlação dos biomarcadores com grau de atrofia cortical, ausência de avaliação neuropsicológica e outras escalas funcionais além de não correlacionarmos os resultados dos biomarcadores plasmáticos com dados comparativos no LCR.

Apesar dessas limitações, assim como em outros trabalhos publicados recentemente (Balasa *et al*, 2017; Barcutean *et al*, 2018; De *et al*, 2018), cabe chamar a atenção para a IL-31 e o receptor sCD40L na patogênese da EM e sugerir que esses potenciais biomarcadores plasmáticos reduzidos ao longo do estudo possam estar associados à ação imunológica anti-mastocitária do fingolimode (Kleinjan *et al*, 2013; Tsuji *et al*, 2015) em humanos.

7. CONCLUSÕES

Não houve diferença estatística nos potenciais biomarcadores imunes quando comparados os dois grupos nas três visitas.

Quando avaliado os grupos conjuntamente, identificou-se dois potenciais biomarcadores imunes nos pacientes com EMRR tratados com fingolimode, a IL-31 e o receptor sCD40L, os quais reduziram de forma correlata seus níveis plasmáticos ao longo do tratamento ($p < 0,001$).

Houve uma redução destes dois potenciais biomarcadores no grupo em uso prévio de AG ou IFN- β (grupo 1) e tratado 6 meses com fingolimode ($p < 0,001$), sendo mais acentuada após 6 meses de tratamento com fingolimode apenas para a IL-31 ($p < 0,05$). A redução plasmática da IL-31 nesse grupo se correlacionou com a redução da IL-33 ($p < 0,05$) e o receptor sCD40L se correlacionou com a redução plasmática da IL-1 β ($p < 0,05$) e da IL-17A ($p < 0,05$).

No grupo formado por pacientes inicialmente virgens de tratamento e em uso de fingolimode por 12 meses (grupo 2), houve uma redução no número de surtos por tempo de doença ($p < 0,001$) e no escore de EDSS ($p < 0,05$), acompanhado de uma redução dos níveis da IL-31 ($p < 0,001$) e do receptor sCD40L ($p < 0,05$), que se acentuou após 6 meses de tratamento ($p < 0,05$). Nesse grupo, a redução plasmática do receptor sCD40L se correlacionou com a redução dos níveis plasmáticos dos potenciais biomarcadores TNF- α ($p < 0,001$), IL-17A ($p < 0,001$), IL-17-F ($p < 0,05$), IL-21 ($p < 0,05$) e IFN- γ ($p < 0,05$) e a redução dos níveis plasmáticos da IL-31 se correlacionou inversamente com o número de lesões nas sequências ponderadas em T2/*FLAIR* ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

In: (Ed.). Comparative Clinical and Cost-Effectiveness of Drug Therapies for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis – Project Protocol. Ottawa (ON), 2012. (CADTH Therapeutic Reviews).

AARTS, S. et al Inhibition of CD40-TRAF6 interactions by the small molecule inhibitor 6877002 reduces neuroinflammation. **J Neuroinflammation**. v. 14, n. 1, p. 105, May 12 2017.

AARTS, S. et al The CD40-CD40L Dyad in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. **Front Immunol**. v. 8, p. 1791, 2017.

AGASHIVALA, N. et al Compliance to fingolimod and other disease modifying treatments in multiple sclerosis patients, a retrospective cohort study. **BMC Neurol**. v. 13, p. 138, Oct 4 2013.

AGIUS, M. et al Fingolimod therapy in early multiple sclerosis: an efficacy analysis of the TRANSFORMS and FREEDOMS studies by time since first symptom. **CNS Neurosci Ther**. v. 20, n. 5, p. 446-51, May 2014.

ALLEN, S. D. et al Therapeutic peptidomimetic strategies for autoimmune diseases: costimulation blockade. **J Pept Res**. v. 65, n. 6, p. 591-604, Jun 2005.

ALMOLDA, B. et al. Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27473, 2011.

ALONSO, R. et al Changes in the Multiple Sclerosis Treatment Paradigm. What Do We Do Now and What Were We Doing Before? **J Clin Neurol**. v. 14, n. 4, p. 487-491, Oct 2018.

ALOUI, C. et al The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. **Int J Mol Sci**. v. 15, n. 12, p. 22342-64, Dec 3 2014.

ARBELAEZ, C. A. et al. IL-7/IL-7 Receptor Signaling Differentially Affects Effector CD4+ T Cell Subsets Involved in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J Immunol**. v. 195, n. 5, p. 1974-83, Sep 2015.

ARRAMBIDE, G. et al The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. **Brain**. v. 141, n. 4, p. 1075-1084, Apr 1 2018.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. **Semin Neurol**. v. 36, n. 2, p. 103-14, Apr 2016.

AXISA, P. P.; HAFNER, D. A. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. **Curr Opin Neurol**. v. 29, n. 3, p. 345-53, Jun 2016.

BAHBOUHI, B. et al. T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis. **Brain**, v. 133, n. Pt 6, p. 1622-36, Jun 2010.

BALASA, R. I. et al Natalizumab Changes the Peripheral Profile of the Th17 Panel in MS Patients: New Mechanisms of Action. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 16, n. 9, p. 1018-1026, 2017.

BARANZINI, S. E.; OKSENBURG, J. R. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. **Trends Genet**. v. 33, n. 12, p. 960-970, Dec 2017.

BARCUTEAN, L. I. et al Clinical and Serological Biomarkers of Treatment's Response in Multiple Sclerosis Patients Treated Continuously with Interferonbeta-1b for More than a Decade. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 17, n. 10, p. 780-792, Sep 16 2018.

BARGIELA, D. et al Selection of first-line therapy in multiple sclerosis using risk-benefit decision analysis. **Neurology**. v. 88, n. 7, p. 677-684, Feb 2017.

BARKHOF, F. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. **Curr Opin Neurol**. v. 15, n. 3, p. 239-45, Jun 2002.

BECKER, J. et al Season of birth as a risk factor for multiple sclerosis in Brazil. **J Neurol Sci**. v. 329, n. 1-2, p. 6-10, Jun 2013.

BECKER, J. et al Hypovitaminosis D association with disease activity in relapsing remitting multiple sclerosis in Brazil. **J Neurol Sci**. v. 363, p. 236-9, Apr 2016.

BEDRI, S. K. et al. Multiple sclerosis treatment effects on plasma cytokine receptor levels. **Clin Immunol**. v. 187, p. 15-25, Feb 2018.

BENESOVA, Y.; TVAROH, A. Cognition and fatigue in patients with relapsing multiple sclerosis treated by subcutaneous interferon beta-1a: an observational study SKORE. **Ther Adv Neurol Disord**. v. 10, n. 1, p. 18-32, Jan 2017.

BERGKVIST, M. et al No genetic linkage between multiple sclerosis and the interferon alpha/beta locus. **J Neuroimmunol**. v. 65, n. 2, p. 163-5, Apr 1996.

BERGVALL, N. et al Comparative effectiveness of fingolimod versus interferons or glatiramer acetate for relapse rates in multiple sclerosis: a retrospective US claims database analysis. **Curr Med Res Opin**. v. 29, n. 12, p. 1647-56, Dec 2013.

BERRY, J. D. et al Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. **Muscle Nerve**. v. 56, n. 6, p. 1077-1084, Dec 2017.

BERTADO-CORTES, B. et al Clinical and demographic characteristics of patients with multiple sclerosis. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**. v. 54 Suppl 2, p. S186-90, 2016.

BEZZINI, D.; BATTAGLIA, M. A. Multiple Sclerosis Epidemiology in Europe. **Adv Exp Med Biol**. v. 958, p. 141-159, 2017.

BHARGAVA, P.; MOWRY, E. M. Gut microbiome and multiple sclerosis. **Curr Neurol Neurosci Rep.** v. 14, n. 10, p. 492, Oct 2014.

BILINSKA, M. Multiple stimulation of T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Pol Merkur Lekarski.** v. 15, n. 90, p. 570-3, Dec 2003.

BILINSKA, M. et al CD40L expression on T CD4+ lymphocytes from peripheral blood in patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. **Pol Merkur Lekarski.** v. 20, n. 115, p. 41-5, Jan 2006.

BLOZIK, E. et al Epidemiology and costs of multiple sclerosis in Switzerland: an analysis of health-care claims data, 2011-2015. **Neuropsychiatr Dis Treat.** v. 13, p. 2737-2745, 2017.

BONNAN, M. et al No evidence of disease activity (NEDA) in MS should include CSF biology – Towards a 'Disease-Free Status Score'. **Mult Scler Relat Disord.** v. 11, p. 51-55, Jan 2017.

BONNEKOH, H. et al The role of mast cells in autoinflammation. **Immunol Rev.** v. 282, n. 1, p. 265-275, Mar 2018.

BOZKAYA, D. et al The cost-effectiveness of disease-modifying therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. **J Med Econ.** v. 20, n. 3, p. 297-302, Mar 2017.

BRAUNE, S. et al. Efficacy of fingolimod is superior to injectable disease modifying therapies in second-line therapy of relapsing remitting multiple sclerosis. **J Neurol.** v. 263, n. 2, p. 327-333, Feb 2016.

BROOKS, J. B.; BORELA, M. C.; FRAGOSO, Y. D. Assessment of cognition using the Rao's Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests on a group of Brazilian patients with multiple sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 69, n. 6, p. 887-91, Dec 2011.

BUC, M. New biological agents in the treatment of multiple sclerosis. **Bratisl Lek Listy.** v. 119, n. 4, p. 191-197, 2018.

CALABRESI, P. A. et al Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomized, phase 3, double-blind study. **Lancet Neurol.** v. 13, n. 7, p. 657-65, Jul 2014.

CALABRESI, P. A. et al Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial **Lancet Neurol.** v. 13, n. 6, p. 545-56, Jun 2014.

CALLEGARO, D. et al The prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurol Scand.** v. 104, n. 4, p. 208-13, Oct 2001.

CAMARA-LEMARROY, C. R.; METZ, L. M.; YONG, V. W. Focus on the gut-brain axis: Multiple sclerosis, the intestinal barrier and the microbiome. **World J Gastroenterol.** v. 24, n. 37, p. 4217-4223, Oct 7 2018.

CANTO, E.; OKSENBERG, J. R. Multiple sclerosis genetics. **Mult Scler.** v. 24, n. 1, p. 75-79, Jan 2018.

CARDOSO, M.; OLMO, N. R.; FRAGOSO, Y. D. Systematic Review of Cognitive Dysfunction in Pediatric and Juvenile Multiple Sclerosis. **Pediatr Neurol.** v. 53, n. 4, p. 287-92, Oct 2015.

CASCIONE, M. et al Treatment retention on fingolimod compared with injectable multiple sclerosis therapies in African-American patients: A subgroup analysis of a randomized phase 4 study. **Mult Scler Relat Disord.** v. 25, p. 50-56, Jul 11 2018.

CHABOT, S. et al Cytokine production consequent to T cell-microglia interaction: the PMA/IFN gamma-treated U937 cells display similarities to human microglia. **J Neurosci Methods.** v. 105, n. 2, p. 111-20, Feb 2001.

CHALLA, D. K. et al Antigen dynamics govern the induction of CD4(+) T cell tolerance during autoimmunity. **J Autoimmun.** v. 72, p. 84-94, Aug 2016.

CHEN W. et al Tregs in immunotherapy: opportunities and challenges. **Immunotherapy.** v. 3 n. 8, p. 911–914, Aug 2011.

CHE, D. N. et al Fisetin inhibits IL-31 production in stimulated human mast cells: Possibilities of fisetin being exploited to treat histamine-independent pruritus. **Life Sci.** v. 201, p. 121-129, May 15 2018.

CHEN, D. et al CD40-Mediated NF-kappaB Activation in B Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Modulated by Therapeutics. **J Immunol.** v. 197, n. 11, p. 4257-4265, Dec 2016.

CHEN, H. L. et al Screening of differentially expressed genes of allergic rhinitis with asthma. **Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.** v. 32, n. 10, p. 762-766, May 2018.

CHITNIS, T. et al Trial of Fingolimod versus Interferon Beta-1a in Pediatric Multiple Sclerosis. **N Engl J Med.** v. 379, n. 11, p. 1017-1027, Sep 13 2018.

CHITNIS, T. et al Distinct effects of obesity and puberty on risk and age at onset of pediatric MS. **Ann Clin Transl Neurol.** v. 3, n. 12, p. 897-907, Dec 2016.

CHOI, J. W. et al FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 108, n. 2, p. 751-6, Jan 11 2011.

CHOI, Y. A. et al Antiinflammatory effect of Amomum xanthioides in a mouse atopic dermatitis model. **Mol Med Rep.** v. 16, n. 6, p. 8964-8972, Dec 2017.

CHUN, J.; HARTUNG, H. P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. **Clin Neuropharmacol.** v. 33, n. 2, p. 91-101, Mar-Apr 2010.

CICCARELLI, O. Multiple sclerosis in 2018: new therapies and biomarkers. **Lancet Neurol.** v. 18, n. 1, p. 10-12, Jan 2019.

CLAES, N. et al Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: a 12-month follow-up study. **PLoS One.** v. 9, n. 10, p. e111115, 2014.

CLANET, M. Beta-interferon and multiple sclerosis. **Rev Neurol (Paris).** v. 149, n. 8-9, p. 443-4, 1993.

COHEN, J. A. et al Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med.** v. 362, n. 5, p. 402-15, Feb 4 2010.

COHEN, J. A. et al Fingolimod versus intramuscular interferon in patient subgroups from TRANSFORMS. **J Neurol.** v. 260, n. 8, p. 2023-32, Aug 2013.

COHEN, J. A.; CHUN, J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. **Ann Neurol.** v. 69, n. 5, p. 759-77, May 2011.

COHEN, J. A. et al Long-term (up to 4.5 years) treatment with fingolimod in multiple sclerosis: results from the extension of the randomized TRANSFORMS study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v. 87, n. 5, p. 468-75, May 2016.

COHEN, M. et al Switching from natalizumab to fingolimod in multiple sclerosis: a French prospective study. **JAMA Neurol.** v. 71, n. 4, p. 436-41, Apr 2014.

COMABELLA, M. et al. B cell expression of the inhibitory Fc gamma receptor is unchanged in early MS. **J Neuroimmunol.** v. 223, n. 1-2, p. 135-7, Jun 2010.

COMI, G.; FILIPPI, M.; WOLINSKY, J. S. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis: European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. **Ann Neurol.** v. 49, n. 3, p. 290-7, Mar 2001.

CORREALE, J.; FAREZ, M. F. Smoking worsens multiple sclerosis prognosis: two different pathways are involved. **J Neuroimmunol.** v. 281, p. 23-34, Apr 15 2015.

CREE, B. A. Multiple sclerosis genetics. **Handb Clin Neurol.** v. 122, p. 193-209, 2014.

CREE, B. A. C. et al Phase IV study of retention on fingolimod versus injectable multiple sclerosis therapies: a randomized clinical trial **Ther Adv Neurol Disord.** v. 11, p. 1756286418774338, 2018.

D'AVERSA, T. G.; WEIDENHEIM, K. M.; BERMAN, J. W. CD40-CD40L interactions induce chemokine expression by human microglia: implications for human immunodeficiency virus encephalitis and multiple sclerosis. **Am J Pathol.** v. 160, n. 2, p. 559-67, Feb 2002.

DADALTI FRAGOSO, Y. Why some of us do not like the expression "no evidence of disease activity" (NEDA) in multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord.** v. 4, n. 4, p. 383-4, Jul 2015.

DAVIDSON, D. C. et al Excess soluble CD40L contributes to blood brain barrier permeability in vivo: implications for HIV-associated neurocognitive disorders. **PLoS One.** v. 7, n. 12, p. e51793, 2012.

DAVIS, W. et al The fat mass and obesity-associated FTO rs9939609 polymorphism is associated with elevated homocysteine levels in patients with multiple sclerosis screened for vascular risk factors. **Metab Brain Dis.** v. 29, n. 2, p. 409-19, Jun 2014.

DE HAAN, R. J.; POLMAN, C. H. Clinical testing of the treatment effect of interferon-beta Ia and Ib in multiple sclerosis. **Ned Tijdschr Geneeskd.** v. 140, n. 44, p. 2168-71, Nov 1996.

DE JAGER, P. L. et al Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. **Lancet Neurol.** v. 8, n. 12, p. 1111-9, Dec 2009.

DE, J. G.-G. J. et al Decreased serum levels of sCD40L and IL-31 correlate in treated patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Immunobiology.** v. 223, n. 1, p. 135-141, Jan 2018.

DE SOUZA M. B.B et al. Lymphocytes T Helper 17 in Multiple Sclerosis: Regulation by Intestinal Microbiota. **J Neurol Exp Neurosci.** v. 5, n.1, p. 40-77, Apr 2019.

DE STEFANO, N. et al Effect of fingolimod on diffuse brain tissue damage in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. **Mult Scler Relat Disord.** v. 7, p. 98-101, May 2016.

DEL BOCCIO, P. et al. Integration of metabolomics and proteomics in multiple sclerosis: From biomarkers discovery to personalized medicine. **Proteomics Clin Appl,** v. 10, n. 4, p. 470-84, Apr 2016.

DERFUSS, T. et al Efficacy of fingolimod in patients with highly active relapsing-remitting multiple sclerosis. **Curr Med Res Opin.** v. 31, n. 9, p. 1687-91, 2015.

DERFUSS, T. et al Relapse rates in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: Subgroup analyses of pooled data from three phase 3 trials. **Mult Scler Relat Disord.** v. 8, p. 124-30, Jul 2016.

DEVONSHIRE, V. et al Relapse and disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: subgroup analyses of the double-blind, randomized, placebo-controlled FREEDOMS study. **Lancet Neurol.** v. 11, n. 5, p. 420-8, May 2012.

DI FILIPPO, M. et al Interferon-beta1a protects neurons against mitochondrial toxicity via modulation of STAT1 signaling: electrophysiological evidence. **Neurobiol Dis.** v. 62, p. 387-93, Feb 2014.

DI SALVO, E. et al IL-33/IL-31 Axis: A Potential Inflammatory Pathway. **Mediators Inflamm.** v. 2018, p. 3858032, 2018.

DIDONNA, A.; OKSENBERG, J. R. The Genetics of Multiple Sclerosis. In: ZAGON, I. S. e MCLAUGHLIN, P. J. (Ed.). **Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis.** Brisbane (AU), 2017. ISBN 9780994438133.

DIEM, L. et al Long-term evaluation of NEDA-3 status in relapsing-remitting multiple sclerosis patients after switching from natalizumab to fingolimod. **Ther Adv Neurol Disord.** v. 11, p. 1756286418791103, 2018.

DISANTO, G. et al Vitamin D: a link between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis development? **Expert Rev Neurother.** v. 11, n. 9, p. 1221-4, Sep 2011.

DOBSON, R. et al Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v. 84, n. 8, p. 909-14, Aug 2013.

DONG, H.; ZHANG, X.; QIAN, Y. Mast cells and neuroinflammation. **Med Sci Monit Basic Res.** v. 20, p. 200-6, Dec 2014.

DOSHI, A.; CHATAWAY, J. Multiple sclerosis, a treatable disease. **Clin Med (Lond).** v. 17, n. 6, p. 530-536, Dec 2017.

DRESCHER, K. M. et al CD40L is critical for protection from demyelinating disease and development of spontaneous remyelination in a mouse model of multiple sclerosis. **Brain Pathol.** v. 10, n. 1, p. 1-15, Jan 2000.

DUDA, P. W. et al Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. **J Clin Invest.** v. 105, n. 7, p. 967-76, Apr 2000.

DURAFOURT, B. A. et al Differential responses of human microglia and blood-derived myeloid cells to FTY720. **J Neuroimmunol.** v. 230, n. 1-2, p. 10-6, Jan 2011.

EBONI, A. C. B. et al High levels of alexithymia in patients with multiple sclerosis. **Dement Neuropsychol.** v. 12, n. 2, p. 212-215, Apr-Jun 2018.

EKEN, A. et al S1P1 deletion differentially affects TH17 and Regulatory T cells. **Sci Rep.** v. 7, n. 1, p. 12905, Oct 2017.

ENGDAHL, E. et al HLA-A*02, gender and tobacco smoking, but not multiple sclerosis, affects the IgG antibody response against human herpesvirus 6. **Hum Immunol.** v. 75, n. 6, p. 524-30, Jun 2014.

FATIMA, N. et al Controversial role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** v. 19, n. 3, p. 246-52, May 2011.

FERRE, L. et al Basal vitamin D levels and disease activity in multiple sclerosis patients treated with fingolimod. **Neurol Sci.** v. 39, n. 8, p. 1467-1470, Aug 2018.

FERREIRA, M. L. et al Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauracao, Recife, Pernambuco, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 62, n. 4, p. 1027-32, Dec 2004.

FERRETTI, E.; CORCIONE, A.; PISTOIA, V. The IL-31/IL-31 receptor axis: general features and role in tumor microenvironment. **J Leukoc Biol.** v. 102, n. 3, p. 711-717, Sep 2017. |

FEWINGS, N. L. et al The autoimmune risk gene ZMIZ1 is a vitamin D responsive marker of a molecular phenotype of multiple sclerosis. **J Autoimmun.** v. 78, p. 57-69, Mar 2017.

FILION, L. G. et al Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. **Clin Immunol.** v. 106, n. 2, p. 127-38, Feb 2003.

FINKELSZTEJN, A. et al The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 72, n. 2, p. 104-6, Feb 2014.

FITZGERALD, K. C. et al Association of Vitamin D Levels With Multiple Sclerosis Activity and Progression in Patients Receiving Interferon Beta-1b. **JAMA Neurol.** v. 72, n. 12, p. 1458-65, Dec 2015.

FORSYTHE, P. Mast Cells in Neuroimmune Interactions. **Trends Neurosci.** Oct 4 2018.

FOX, E. et al Outcomes of switching directly to oral fingolimod from injectable therapies: Results of the randomized, open-label, multicenter, Evaluate Patient Outcomes (EPOC) study in relapsing multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord.** v. 3, n. 5, p. 607-19, Sep 2014.

FRAGOSO, Y. D. Modifiable environmental factors in multiple sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 72, n. 11, p. 889-94, Nov 2014.

FRAGOSO, Y. D. et al No correlation was observed between vitamin D levels and disability of patients with multiple sclerosis between latitudes 18 degrees and 30 degrees South. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 75, n. 1, p. 3-8, Jan 2017.

FRAGOSO, Y. D. et al Unfavorable outcomes during treatment of multiple sclerosis with high doses of vitamin D. **J Neurol Sci.** v. 346, n. 1-2, p. 341-2, Nov 2014.

FRAGOSO, Y. D. et al The real-life experience with cardiovascular complications in the first dose of fingolimod for multiple sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 72, n. 9, p. 712-4, Sep 2014.

FRAGOSO, Y. D.; ELSO, F. G.; CARRA, A. Differential diagnosis of multiple sclerosis in Latin America. **Mult Scler J Exp Transl Clin.** v. 3, n. 3, p. 2055217317714279, Jul-Sep 2017.

FRAGOSO, Y. D. et al Restless legs syndrome and multiple sclerosis: a Brazilian multicenter study and meta-analysis of the literature. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 69, n. 2A, p. 180-3, Apr 2011.

FRAGOSO, Y. D. et al Lymphocyte count in peripheral blood is not associated with the level of clinical response to treatment with fingolimod. **Mult Scler Relat Disord.** v. 19, p. 105-108, Jan 2018.

FRANCOIS, J.; VAN, G. Ocular symptoms in multiple sclerosis. **Belg Tijdschr Geneesk.** v. 19, p. 330-44, Mar 1963.

FRANZOI, et al. **Interleukin 31 and Mast Cells: A new piece in the puzzle of the Pathophysiology of multiple sclerosis?** Int Journal of Brain Disorder and Treatment. V. 4, p.026, Nov 2018.

FRENZEL, L., Hermine, O. Mast cells and inflammation. **Jt. Bone Spine.** V. 80, n.2, p 141–145. Dec 2013.

FRISCHER, J. M. et al Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. **Ann Neurol.** v. 78, n. 5, p. 710-21, Nov 2015.

GAFSON, A.; GIOVANNONI, G.; HAWKES, C. H. The diagnostic criteria for multiple sclerosis: From Charcot to McDonald. **Mult Scler Relat Disord.** v. 1, n. 1, p. 9-14, Jan 2012.

GERRITSE, K. et al CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 93, n. 6, p. 2499-504, Mar 1996.

GHALAMFARSA, G. et al IL-21 and IL-21 receptor in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **J Immunotoxicol.** v. 13, n. 3, p. 274-85, May 2016.

GIANFRANCESCO, M. A. et al Obesity during childhood and adolescence increases susceptibility to multiple sclerosis after accounting for established genetic and environmental risk factors. **Obes Res Clin Pract.** v. 8, n. 5, p. e435-47, Sep-Oct 2014.

GILFILLAN, A. M. et al Mast cell biology: introduction and overview. **Adv Exp Med Biol.** v. 716, p. 2-12, Dec 2011.

GIOVANNONI, G. et al A brief history of NEDA. **Mult Scler Relat Disord.** v. 20, p. 228-230, Feb 2018.

GIOVANNONI, G. et al "No evident disease activity": The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. **Mult Scler.** v. 23, n. 9, p. 1179-1187, Aug 2017.

GOODIN, D. S. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. **Handb Clin Neurol.** v. 138, p. 173-206, 2016.

GOODIN, D. S. et al Relapses in multiple sclerosis: Relationship to disability. **Mult Scler Relat Disord.** v. 6, p. 10-20, Mar 2016.

GRUTZKE, B. et al Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. **Ann Clin Transl Neurol.** v. 2, n. 2, p. 119-30, Feb 2015.

HABETS, K. L.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. Platelets and autoimmunity. **Eur J Clin Invest.** v. 43, n. 7, p. 746-57, Jul 2013.

HAGHIKIA, A.; LINKER, R. A. Nutrition, microbiome and multiple sclerosis: Current knowledge from basic research and clinical practice. **Nervenarzt.** v. 89, n. 4, p. 463-471, Apr 2018.

HAMIDI, V. et al A Multiple Treatment Comparison of Eleven Disease-Modifying Drugs Used for Multiple Sclerosis. **J Clin Med Res.** v. 10, n. 2, p. 88-105, Feb 2018.

HANDEL, A. E. et al Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. **PLoS One.** v. 6, n. 1, p. e16149, Jan 2011.

HARIBHAI D. et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. **Immunity.** v.35, n 1, p: 109–122. Jul 2011.

HARRIS, V. K.; SADIQ, S. A. Disease biomarkers in multiple sclerosis: potential for use in therapeutic decision making. **Mol Diagn Ther.** v. 13, n. 4, p. 225-44, 2009.

HAWKES, C. H. Multiple sclerosis genetics is dead. **Mult Scler Relat Disord.** v. 2, n. 3, p. 156-61, Jul 2013.

HE A. et al. Comparison of Switch to Fingolimod or Interferon Beta/Glatiramer Acetate in Active Multiple Sclerosis. **JAMA Neurol.** v. 72, n. 8, p. 950, Aug 2015.

HEDSTROM, A. K. et al Interaction between passive smoking and two HLA genes with regard to multiple sclerosis risk. **Int J Epidemiol.** v. 43, n. 6, p. 1791-8, Dec 2014.

HENAULT, D. et al Basis for fluctuations in lymphocyte counts in fingolimod-treated patients with multiple sclerosis. **Neurology**. v. 81, n. 20, p. 1768-72, Nov 2013.

HERMAN, S. et al Integration of magnetic resonance imaging and protein and metabolite CSF measurements to enable early diagnosis of secondary progressive multiple sclerosis. **Theranostics**. v. 8, n. 16, p. 4477-4490, 2018.

HERNAN, M. A.; OLEK, M. J.; ASCHERIO, A. Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. **Neurology**. v. 53, n. 8, p. 1711-8, Nov 1999.

HOFMEISTER, R. et al. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 10, n. 1, p. 41-60, Mar 1999.

HOWARD, L. M. et al Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. **J Clin Invest**. v. 103, n. 2, p. 281-90, Jan 1999.

HUANG, W. X.; HUANG, P.; HILLERT, J. Systemic upregulation of CD40 and CD40 ligand mRNA expression in multiple sclerosis. **Mult Scler**. v. 6, n. 2, p. 61-5, Apr 2000.

HUITEMA, M. J. D.; SCHENK, G. J. Insights into the Mechanisms That May Clarify Obesity as a Risk Factor for Multiple Sclerosis. **Curr Neurol Neurosci Rep**. v. 18, n. 4, p. 18, Mar 2018.

IEZZI, G. et al CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4⁺ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 106, n. 3, p. 876-81, Jan 2009.

IGRA, M. S. et al Multiple sclerosis update: use of MRI for early diagnosis, disease monitoring and assessment of treatment related complications. **Br J Radiol**. v. 90, n. 1074, p. 20160721, Jun 2017.

JALIGAMA, S. et al. Radical containing combustion derived particulate matter enhance pulmonary Th17 inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. **Part Fibre Toxicol**. v. 15, n. 1, p. 20, May 2018.

IMITOLA, J.; CHITNIS, T.; KHOURY, S. J. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 2, p. 163-77, May 2005.

IRELAND, S. J. et al The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **JAMA Neurol**. v. 71, n. 11, p. 1421-8, Nov 2014.

JACOBS, L. D. et al Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis: The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). **Ann Neurol**. v. 39, n. 3, p. 285-94, Mar 1996.

JANGI, S. et al Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. **Nat Commun.** v. 7, p. 12015, Jun 2016.

JOHNSON, K. P. et al Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. **Neurology.** v. 45, n. 7, p. 1268-76, Jul 1995.

KALLAUR, A. P. et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol,** v. 54, n. 1, p. 31-44, Jan 2017.

KALLURI, S. R. et al Interferon-beta specific T cells are associated with the development of neutralizing antibodies in interferon-beta treated multiple sclerosis patients. **J Autoimmun.** v. 88, p. 83-90, Mar 2018.

KALMAN, B. Complex approaches to study complex trait genetics in multiple sclerosis. **Ideggogy Sz.** v. 67, n. 9-10, p. 309-21, Sep 2014.

KAPPOS, L. et al Fingolimod in relapsing multiple sclerosis: An integrated analysis of safety findings. **Mult Scler Relat Disord.** v. 3, n. 4, p. 494-504, Jul 2014.

KAPPOS, L. et al Onset of clinical and MRI efficacy occurs early after fingolimod treatment initiation in relapsing multiple sclerosis. **J Neurol.** v. 263, n. 2, p. 354-360, Feb 2016.

KAPPOS, L. et al A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med.** v. 362, n. 5, p. 387-401, Feb 2010.

KARNELL, J. L. et al Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. **Adv Drug Deliv Rev.** Dec 2018.

KEMPURAJ, D. et al Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **J Neurol Neurosurg Spine.** v. 1, n. 1, 2016.

KHATRI, B. et al Comparison of fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized extension of the TRANSFORMS study. **Lancet Neurol.** v. 10, n. 6, p. 520-9, Jun 2011.

KHATRI, B. O. Fingolimod in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: long-term experience and an update on the clinical evidence. **Ther Adv Neurol Disord.** v. 9, n. 2, p. 130-47, Mar 2016.

KHURANA, S. R. et al The prevalence of overweight and obesity in veterans with multiple sclerosis. **Am J Phys Med Rehabil.** v. 88, n. 2, p. 83-91, Feb 2009.

KIM, D. Y.; HONG, G. U.; RO, J. Y. Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L. **J Neuroinflammation**. v. 8, p. 25, Mar 2011.

KIM, D. Y.; JEOUNG, D.; RO, J. Y. Signaling pathways in the activation of mast cells cocultured with astrocytes and colocalization of both cells in experimental allergic encephalomyelitis. **J Immunol**. v. 185, n. 1, p. 273-83, Jul 2010.

KIM, H. J. et al Itch in dermatomyositis: the role of increased skin interleukin-31. **Br J Dermatol**. v. 179, n. 3, p. 669-678, Sep 2018.

KIRBY, T. O; OCHOA-REPARAZ, J. The Gut Microbiome in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Avenue. **Med Sci (Basel)**. v. 6, n. 3, Aug 2018.

KLEINJAN et al Topical treatment targeting sphingosine-1-phosphate and sphingosine lyase abrogates experimental allergic rhinitis in a murine model. **Allergy**. v. 68, p.204-12, oct 2013.

KOCH-HENRIKSEN, N.; BRONNUM-HANSEN, H.; HYLLESTED, K. Incidence of multiple sclerosis in Denmark 1948-1982: a descriptive nationwide study. **Neuroepidemiology**. v. 11, n. 1, p. 1-10, 1992.

KONG, B. S. et al Increased frequency of IL-6-producing non-classical monocytes in neuromyelitis optica spectrum disorder. **J Neuroinflammation**. v. 14, n. 1, p. 191, Sep 2017.

KOOPMANS, R. A. et al The use of magnetic resonance imaging in monitoring interferon therapy of multiple sclerosis. **J Neuroimaging**. v. 3, n. 3, p. 163-8, Jul 1993.

KORN, T. et al IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**. v. 27, p. 485-517, 2009.

KORNBLUTH, R. S.; KEE, K.; RICHMAN, D. D. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 95, n. 9, p. 5205-10, Apr 1998.

KOTHUR, K. et al. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review. **Cytokine**, v. 77, p. 227-37, Jan 2016.

KOTHUR, K. et al. B Cell, Th17, and Neutrophil Related Cerebrospinal Fluid Cytokine/Chemokines Are Elevated in MOG Antibody Associated Demyelination. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149411, 2016.

KREMENCHUTZKY, M. et al Impact of prior treatment status and reasons for discontinuation on the efficacy and safety of fingolimod: Subgroup analyses of the Fingolimod Research Evaluating Effects of Daily Oral Therapy in Multiple Sclerosis (FREEDOMS) study. **Mult Scler Relat Disord**. v. 3, n. 3, p. 341-9, May 2014.

KRITAS, S.K. et al. Corticotropin-releasing hormone, microglia and mental disorders. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** v.27, n.2, p. 163-7, Feb 2013.

KUHLMANN, T. et al. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. **Acta Neuropathol.** v. 133, n. 1, p. 13-24, Jan 2017.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology.** v. 33, n. 11, p. 1444-52, Nov 1983.

KVISTAD, S. S. et al Body mass index influence interferon-beta treatment response in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.** v. 288, p. 92-7, Nov 2015.

KYRAN, E. L. et al Multiple pathological mechanisms contribute to hippocampal damage in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **Neuroreport.** v. 29, n. 1, p. 19-24, Jan 2018.

LA MANTIA, L. et al Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 4, p. CD009371, Apr 2016.

LAMAN, J. D.; DE BOER, M.; HART, B. A. CD40 in clinical inflammation: from multiple sclerosis to atherosclerosis. **Dev Immunol.** v. 6, n. 3-4, p. 215-22, 1998.

LAMAN, J. D. et al Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). **J Neuroimmunol.** v. 86, n. 1, p. 30-45, Jun 1998.

LANZILLO, R. et al Immunometabolic profiling of patients with multiple sclerosis identifies new biomarkers to predict disease activity during treatment with interferon beta-1a. **Clin Immunol.** v. 183, p. 249-253, Oct 2017.

LASSMANN, H. Demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of hypoxia. **Ann Neurol.** v. 79, n. 4, p. 520-1, Apr 2016.

LASSMANN, H. Multiple Sclerosis Pathology. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 8, n. 3, Mar 2018.

LASSMANN, H.; VAN HORSSSEN, J.; MAHAD, D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. **Nat Rev Neurol.** v. 8, n. 11, p. 647-56, Nov 2012.

LASSMANN, H.; WISNIEWSKI, H. M. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis. **Arch Neurol,** v. 36, n. 8, p. 490-7, Aug 1979.

LEE, C. W.; CHOI, J. W.; CHUN, J. Neurological S1P signaling as an emerging mechanism of action of oral FTY720 (fingolimod) in multiple sclerosis. **Arch Pharm Res.** v. 33, n. 10, p. 1567-74, Oct 2010.

LEE, J. M.; HAN, M. H. Patient experience and practice trends in multiple sclerosis - clinical utility of fingolimod. **Patient Prefer Adherence**. v. 9, p. 685-93, 2015.

LEVITE, M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis. **J Neural Transm (Vienna)**. v. 124, n. 7, p. 775-798, Jul 2017.

LI, D. K.; PATY, D. W. Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis. **Ann Neurol**. v. 46, n. 2, p. 197-206, Aug 1999.

LI, S. et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are elevated in the Guillain-Barre syndrome and downregulated by IVIg treatments. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 740947, 2014.

LILL, C. M. Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. **Front Neurol**. v. 5, p. 130, 2014.

LIU, Z. et al Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**. v. 112, n. 1-2, p. 153-62, Jan 2001.

LUBLIN, F. et al Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled trial **Lancet**. v. 387, n. 10023, p. 1075-1084, Mar 2016.

LUCCHINETTI, C. et al Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol**. v. 47, n. 6, p. 707-17, Jun 2000.

LUNDBERG, K.; VENABLES, P. J. Epitope spreading in animal models: array of hope in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 6, p. 122, 2008.

MA, X. et al. Quantitative radiomic biomarkers for discrimination between neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis. **J Magn Reson Imaging**. Nov 2018.

MACH, F. et al Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. **Nature**. v. 394, n. 6689, p. 200-3, Jul 1998.

MAGHZI, A. H. et al Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? **Pathophysiology**. v. 18, n. 1, p. 13-20, Feb 2011.

MAGLIOZZI, R. et al. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. **Ann Neurol**. v. 83, n. 4, p. 739-755, Apr 2018.

MARQUES, V. D. et al Brazilian Consensus for the Treatment of Multiple Sclerosis: Brazilian Academy of Neurology and Brazilian Committee on

Treatment and Research in Multiple Sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 76, n. 8, p. 539-554, Aug 2018.

MARRONE, A. et al Epstein Barr virus infection reactivation as a possible trigger of primary biliary cirrhosis-like syndrome in a patient with multiple sclerosis in the course of fingolimod treatment. **Infez Med.** v. 22, n. 4, p. 331-6, Dec 2014.

MARSON A. et al. (February 2007). "Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation". **Nature.** v. 445, n. 7130, p. 931–935, Feb 2007.

MASUDA, H. et al Soluble CD40 ligand contributes to blood-brain barrier breakdown and central nervous system inflammation in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. **J Neuroimmunol.** v. 305, p. 102-107, Apr 2017.

MASUDA, H. et al Soluble CD40 ligand disrupts the blood-brain barrier and exacerbates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol.** v. 316, p. 117-120, Mar 2018.

MASVEKAR, R. et al Cerebrospinal fluid biomarkers link toxic astrogliosis and microglial activation to multiple sclerosis severity. **Mult Scler Relat Disord.** v. 28, p. 34-43, Dec 2018.

MAZIBRADA, G.; SHARPLES, C.; PERFECT, I. Real-world experience of fingolimod in patients with multiple sclerosis (MS Fine): An observational study in the UK. **Mult Scler J Exp Transl Clin.** v. 4, n. 4, p. 2055217318801638, Oct-Dec 2018.

MCMAHON, E. J. et al Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. **Nat Med.** v. 11, n. 3, p. 335-9, Mar 2005.

MEHUL, B. et al Noninvasive proteome analysis of psoriatic stratum corneum reflects pathophysiological pathways and is useful for drug profiling. **Br J Dermatol.** v. 177, n. 2, p. 470-488, Aug 2017.

MENDES, M. F. et al Early and severe cognitive impairment in multiple sclerosis. **Dement Neuropsychol.** v. 6, n. 1, p. 48-52, Jan-Mar 2012.

MENG, X. et al Effect of switching from intramuscular interferon beta-1a to oral fingolimod on time to relapse in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis enrolled in a 1-year extension of TRANSFORMS. **Contemp Clin Trials.** v. 41, p. 69-74, Mar 2015.

MIELCARZ, D. W.; KASPER, L. H. The gut microbiome in multiple sclerosis. **Curr Treat Options Neurol.** v. 17, n. 4, p. 344, Apr 2015.

MILOVANOVIC, M. et al IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. **Immunol. Res.** v.52, n.1, p.89-99, May 2012.

MILLER, D. H. et al Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis. **Ann Neurol.** v. 56, n. 2, p. 273-8, Aug 2004.

MONTALBAN, X. et al MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. **Neurology.** v. 74, n. 5, p. 427-34, Feb 2010.

MORANDI, E.; TARLINTON, R. E.; GRAN, B. Multiple Sclerosis between Genetics and Infections: Human Endogenous Retroviruses in Monocytes and Macrophages. **Front Immunol.** v. 6, p. 647, 2015.

MULS, N. et al Fingolimod increases CD39-expressing regulatory T cells in multiple sclerosis patients. **PLoS One.** v. 9, n. 11, p. e113025, 2014.

MUNOZ-CULLA, M.; IRIZAR, H.; OTAEGUI, D. The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. **Appl Clin Genet.** v. 6, p. 63-73, 2013.

NAGAI, T. et al Interferon-beta mediates opposing effects on interferon-gamma-dependent Interleukin-12 p70 secretion by human monocyte-derived dendritic cells. **Scand J Immunol.** v. 65, n. 2, p. 107-17, Feb 2007.

NAKAMURA, M. et al Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. **Mult Scler.** v. 20, n. 10, p. 1371-80, Sep 2014.

NEGROTTO, L. et al. Peripheral blood non-MAIT CD8+CD161hi cells are decreased in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta. **J Neuroimmunol.** v. 288, p. 98-101, Nov 15 2015.

NEUHAUS, O. et al Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 97, n. 13, p. 7452-7, Jun 20 2000.

NOGUCHI, K.; CHUN, J. Roles for lysophospholipid S1P receptors in multiple sclerosis. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** v. 46, n. 1, p. 2-10, Feb 2011.

NOSEWORTHY, J. H. et al A randomized trial of intravenous immunoglobulin in inflammatory demyelinating optic neuritis. **Neurology.** v. 56, n. 11, p. 1514-22, Jun 2001.

NOVO, A. M.; BATISTA, S. Multiple Sclerosis: Implications of Obesity in Neuroinflammation. **Adv Neurobiol.** v. 19, p. 191-210, 2017.

NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thromb Haemost.** v. 105 Suppl 1, p. S13-33, May 2011.

O'LOUGHLIN, E. et al Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 8, n. 2, Feb 2018.

OCKINGER, J. et al T-cell activation and HLA-regulated response to smoking in the deep airways of patients with multiple sclerosis. **Clin Immunol.** v. 169, p. 114-120, Aug 2016.

OKUDA, D. T. et al Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. **Neurology.** v. 72, n. 9, p. 800-5, Mar 2009.

ONTANEDA, D.; HYLAND, M.; COHEN, J. A. Multiple sclerosis: new insights in pathogenesis and novel therapeutics. **Annu Rev Med.** v. 63, p. 389-404, 2012.

PARK, K. et al Transcriptional activation of the IL31 gene by NFAT and STAT6. **J Leukoc Biol.** v. 91, n. 2, p. 245-57, Feb 2012.

PARONI, M. et al. Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. **J Allergy Clin Immunol.** v. 140, n. 3, p. 797-808, Sep 2017.

PATSOPOULOS, N. A. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 8, n. 7, Jul 2018.

PATY, D. W.; LI, D. K. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. **Neurology.** v. 43, n. 4, p. 662-7, Apr 1993.

PAUL, A.; COMABELLA, M.; GANDHI, R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.** Mar 2018.

PAYNE, S. G. et al The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors. **Blood.** v. 109, n. 3, p. 1077-85, Feb 2007.

PELFREY, C. M. et al Effects of sex hormones on costimulatory molecule expression in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.** v. 167, n. 1-2, p. 190-203, Oct 2005.

PERRIARD, G. et al. Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. **J Neuroinflammation,** v. 12, p. 119, Jun 2015.

PHILLIPS, A. L.; LOCKLEAR, J. C.; KOZMA, C. Real-World Assessment of Relapse, Medical Costs and Persistency of Multiple Sclerosis Patients Treated with Subcutaneous Interferon beta-1a. **Value Health.** v. 18, n. 7, p. A755, Nov 2015.

PIETIKAINEN, A. et al. Cerebrospinal fluid cytokines in Lyme neuroborreliosis. **J Neuroinflammation.** v. 13, n. 1, p. 273, Oct 18 2016.

POLMAN, C. H. et al Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Ann Neurol.** v. 69, n. 2, p. 292-302, Feb 2011.

POSER, C. M.; BRINAR, V. V. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. **Clin Neurol Neurosurg.** v. 106, n. 3, p. 147-58, Jun 2004.

POSER, C. M. et al New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. **Ann Neurol.** v. 13, n. 3, p. 227-31, Mar 1983.

POWER, C. et al The human microbiome in multiple sclerosis: pathogenic or protective constituents? **Can J Neurol Sci.** v. 37 Suppl 2, p. S24-33, Sep 2010.

PRAJEETH, C. K. et al Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. **J Neuroinflammation.** v. 14, n. 1, p. 204, Oct 2017.

PRANZATELLI, M. R.; TATE, E. D.; MCGEE, N. R. Microglial/macrophage markers CHI3L1, sCD14, and sCD163 in CSF and serum of pediatric inflammatory and non-inflammatory neurological disorders: A case-control study and reference ranges. **J Neurol Sci.** v. 381, p. 285-290, Oct 2017.

PUNEET, S.J et al Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. **J Exp Med.** v.199, p. 959-970, Dec 2004.

PUTHENPARAMPIL, M. et al. NEDA-3 status including cortical lesions in the comparative evaluation of natalizumab versus fingolimod efficacy in multiple sclerosis. **Ther Adv Neurol Disord.** v. 11, p. 173, Feb 2018.

PUTHENPARAMPIL, M. et al. BAFF Index and CXCL13 levels in the cerebrospinal fluid associate respectively with intrathecal IgG synthesis and cortical atrophy in multiple sclerosis at clinical onset. **J Neuroinflammation,** v. 14, n. 1, p. 11, Jan 2017.

QIAO, Y.; CHEN, J. Serum levels of IL-31, IL-33 and ST2 in allergic rhinitis of children in China. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).** v. 64, n. 12, p. 52-55, Sep 2018.

QU, N. et al Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. **Clin Dev Immunol.** v. 2013, p. 968549, 2013.

QUINTANA, F. J. et al Epitope spreading as an early pathogenic event in pediatric multiple sclerosis. **Neurology.** v. 83, n. 24, p. 2219-26, Dec 9 2014.

RADDASSI, K. et al. Increased frequencies of myelin oligodendrocyte glycoprotein/MHC class II-binding CD4 cells in patients with multiple sclerosis. **J Immunol,** v. 187, n. 2, p. 1039-46, Jul 2011.

RAE-GRANT, A. et al Practice guideline recommendations summary: Disease-modifying therapies for adults with multiple sclerosis: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology.** v. 90, n. 17, p. 777-788, Apr 2018.

RAMAGOPALAN, S. V. et al Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England. **Neurology**. v. 76, n. 16, p. 1410-4, Apr 2011.

REP, M. H. et al Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. **J Neuroimmunol**. v. 67, n. 2, p. 111-8, Jul 1996.

RICHARDS, R. G. Interferon beta in multiple sclerosis. **BMJ**. v. 313, n. 7066, p. 1159, Nov 1996.

RIO, J.; AUGER, C.; ROVIRA, A. MR Imaging in Monitoring and Predicting Treatment Response in Multiple Sclerosis. **Neuroimaging Clin N Am**. v. 27, n. 2, p. 277-287, May 2017.

RIVAS ALONSO, V. et al The genetics of multiple sclerosis in Latin America. **Mult Scler J Exp Transl Clin**. v. 3, n. 3, p. 205-21, Sep 2017.

ROJAS, J. I. et al A systematic review about the epidemiology of primary progressive multiple sclerosis in Latin America and the Caribbean. **Mult Scler Relat Disord**. v. 22, p. 1-7, May 2018.

ROLLA, S. et al. Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN-beta. **J Leukoc Biol**. v. 96, n. 6, p. 1155-64, Dec 2014.

ROTHHAMMER, V. et al Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. **J Exp Med**. v. 208, n. 12, p. 2465-76, Nov 2011.

SATO, D. K. et al Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod initiation to treat multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**. v. 268, n. 1-2, p. 95-8, Mar 2014.

SATO, K. et al Disease Exacerbation after the Cessation of Fingolimod Treatment in Japanese Patients with Multiple Sclerosis. **Intern Med**. v. 57, n. 18, p. 2647-2655, Sep 2018.

SEGAL, B. M.; COHEN, J. A.; ANTEL, J. Americas Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis Forum 2017: Environmental factors, genetics, and epigenetics in MS susceptibility and clinical course. **Mult Scler**. v. 24, n. 1, p. 4-5, Jan 2018.

SHABGAH, A. G. et al. Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections. **Autoimmun Rev**, v. 16, n. 12, p. 1209-1218, Dec 2017.

SHARAFUTDINOVA, L. R. et al Smoking as a risk factor of development and progression of multiple sclerosis (a review and experimental data). **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**. v. 113, n. 10 Pt 2, p. 18-22, 2013.

SIE, C.; KORN, T.; MITSDOERFFER, M. Th17 cells in central nervous system autoimmunity. **Exp Neurol**, v. 262 Pt A, p. 18-27, Dec 2014.

SIGNORI, A. et al Long-term impact of interferon or Glatiramer acetate in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. **Mult Scler Relat Disord.** v. 6, p. 57-63, Mar 2016.

SIMPSON, S., JR.; DER MEI, I. V.; TAYLOR, B. The Role of Vitamin D in Multiple Sclerosis: Biology and Biochemistry, Epidemiology and Potential Roles in Treatment. **Med Chem.** v. 14, n. 2, p. 129-143, Feb 2018.

SINGER, B. A. Fingolimod for the treatment of relapsing multiple sclerosis. **Expert Rev Neurother.** v. 13, n. 6, p. 589-602, Jun 2013.

SINGER, B. Initiating oral fingolimod treatment in patients with multiple sclerosis. **Ther Adv Neurol Disord.** v. 6, n. 4, p. 269-75, Jul 2013.

SKAPER, S. D.; FACCI, L.; GIUSTI, P. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? **Immunology.** v. 141, n. 3, p. 314-27, Mar 2014.

SKAPER, S. D. et al Neuroinflammation, Mast Cells, and Glia: Dangerous Liaisons. **Neuroscientist.** v. 23, n. 5, p. 478-498, Oct 2017.

SKERJANEC, A. et al FTY720, a novel immunomodulator in de novo kidney transplant patients: pharmacokinetics and exposure-response relationship. **J Clin Pharmacol.** v. 45, n. 11, p. 1268-78, Nov 2005.

SMAGINA, I. V. et al A study of the relation between the sCD40-sCD40L system and the course of multiple sclerosis. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.** v. 115, n. 8. Vyp. 2, p. 22-24, 2015.

SOFO, V. et al Short communication: impairment of membrane markers on peripheral blood mononuclear cells and imbalance of cytokine secretion in the pathogenesis of multiple sclerosis active phases. **J Interferon Cytokine Res.** v. 25, n. 11, p. 661-5, Nov 2005.

SOSVOROVA, L. et al The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. **Neuro Endocrinol Lett.** v. 36, n. 6, p. 564-71, Dec 2015.

SPEARMAN, C. The Proof and measurement of association between two things. *The American Journal of Psychology.* v. 15, n.1, p.72-101, Feb 1904.

STASIOLEK, M. et al Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. **Brain.** v. 129, n. Pt 5, p. 1293-305, May 2006.

STOTT, B. et al Human IL-31 is induced by IL-4 and promotes TH2-driven inflammation. **J Allergy Clin Immunol.** v. 132, n. 2, p. 446-54 e5, Aug 2013.

SUZUMURA, A. et al Peripheral Blood T Cell Dynamics Predict Relapse in Multiple Sclerosis Patients on Fingolimod. **Plos One.** v. 10, n. 4, 2015.

TAKAMORI, A. et al IL-31 is crucial for induction of pruritus, but not inflammation, in contact hypersensitivity. **Sci Rep.** v. 8, n. 1, p. 6639, Apr 2018.

TAN, J.; TOWN, T.; MULLAN, M. CD45 inhibits CD40L-induced microglial activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. **J Biol Chem.** v. 275, n. 47, p. 37224-31, Nov 2000.

TANKOU, S. K. et al Investigation of probiotics in multiple sclerosis. **Mult Scler.** v. 24, n. 1, p. 58-63, Jan 2018.

TANKOU, S. K. et al A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis. **Ann Neurol.** v. 83, n. 6, p. 1147-1161, Jun 2018.

TAUIL, C. B. et al Suicidal ideation, anxiety, and depression in patients with multiple sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 76, n. 5, p. 296-301, May 2018.

TAYLOR, P. A. et al FTY720 markedly increases alloengraftment but does not eliminate host anti-donor T cells that cause graft rejection on its withdrawal **Biol Blood Marrow Transplant.** v. 18, n. 9, p. 1341-52, Sep 2012.

TCHORSH-YUTSIS, D. et al Pig embryonic pancreatic tissue as a source for transplantation in diabetes: transient treatment with anti-LFA1, anti-CD48, and FTY720 enables long-term graft maintenance in mice with only mild ongoing immunosuppression. **Diabetes.** v. 58, n. 7, p. 1585-94, Jul 2009.

TELESHOVA, N. et al Elevated CD40 ligand expressing blood T-cell levels in multiple sclerosis are reversed by interferon-beta treatment. **Scand J Immunol.** v. 51, n. 3, p. 312-20, Mar 2000.

THOMPSON, A. J. et al Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **Lancet Neurol.** v. 17, n. 2, p. 162-173, Feb 2018.

THOUVENOT, E. Multiple sclerosis biomarkers: Helping the diagnosis? **Rev Neurol (Paris).** v. 174, n. 6, p. 364-371, Jun 2018.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SASTRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. **Nat Rev Neurol.** Oct 2018.

TIZAOUI, K. Multiple sclerosis genetics: Results from meta-analyses of candidate-gene association studies. **Cytokine.** v. 106, p. 154-164, Jun 2018.

TOPPING, J. et al. The effects of intrathecal rituximab on biomarkers in multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord.** v. 6, p. 49-53, Mar 2016.

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. **J Neuroinflammation.** v. 2, p. 24, Oct 2005.

TRAINA, G. Mast cells in the brain – Old cells, new target. **J Integr Neurosci.** v. 16, n. s1, p. S69-S83, 2017.

TSUJI, T. et al Therapeutic approach to mite-induced intractable dermatitis using novel immunomodulator FTY720 ointment (fingolimod) in NC/Nga mice. **Allergol Int.** v. 2, p.172-179, Nov 2015.

TUOHY, V. K. et al The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Immunol Ver.** v. 164, p. 93-100, Aug 1998.

TZARTOS, J. S. et al IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. **Am J Pathol.** v. 178, n. 2, p. 794-802, Feb 2011.

VAKKALANKA, R. K. et al Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. **Arthritis Rheum.** v. 42, n. 5, p. 871-81, May 1999.

VERMERSCH, P. et al A comparison of multiple sclerosis disease activity after discontinuation of fingolimod and placebo. **Mult Scler J Exp Transl Clin.** v. 3, n. 3, p. 2055217317730096, Jul-Sep 2017.

VISWANATHAN, S. Efficacy and safety of Fingolimod therapy in multi-ethnic Malaysian patients with relapsing remitting multiple sclerosis: A longitudinal observational study. **J Clin Neurosci.** v. 54, p. 25-28, Aug 2018.

WAGNER, M. et al MS risk allele rs1883832T is associated with decreased mRNA expression of CD40. **J Mol Neurosci.** v. 56, n. 3, p. 540-5, Jul 2015.

WAGNER, M. et al Investigation of gene-gene interactions between CD40 and CD40L in Polish multiple sclerosis patients. **Hum Immunol.** v. 75, n. 8, p. 796-801, Aug 2014.

WANG, S. et al. Elevated C-X-C motif ligand 13 and B-cell-activating factor levels in neuromyelitis optica during remission. **Brain Behav.**v. 7, n. 4, p. e00648, Apr 2017.

WEILBACH, F. X. et al Copolymer 1 in therapy of multiple sclerosis. **Nervenarzt.** v. 66, n. 6, p. 473-7, Jun 1995.

WEINSHENKER, B. G. et al A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. **Ann Neurol.** v. 46, n. 6, p. 878-86, Dec 1999.

WESTON, M.; CONSTANTINESCU, C. S. What role does tobacco smoking play in multiple sclerosis disability and mortality? A review of the evidence. **Neurodegener Dis Manag.** v. 5, n. 1, p. 19-25, 2015.

WILLIAMS, M. J. et al Adherence, persistence, and discontinuation among Hispanic and African American patients with multiple sclerosis treated with fingolimod or glatiramer acetate. **Curr Med Res Opin.** v. 34, n. 1, p. 107-115, Jan 2018.

WITKOWSKA, A. M. et al. Serum Levels of Biomarkers of Immune Activation and Associations With Neurological Impairment in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients During Remission. **Biol Res Nurs**, v. 18, n. 1, p. 113-9, Jan 2016.

WONG, C. K. et al. Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis. **PLoS One**. v. 7, n. 1, p. e29815, 2012.

WYNN, D. R. et al A reappraisal of the epidemiology of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota. **Neurology**. v. 40, n. 5, p. 780-6, May 1990.

XIAO, B. G. et al An alternative pathway of nitric oxide production by rat astrocytes requires specific antigen and T cell contact. **Neurosci Lett**. v. 283, n. 1, p. 53-6, Mar 2000.

XU, W. et al. IL-22 secreting CD4+ T cells in the patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**. v. 261, n. 1-2, p. 87-91, Aug 2013.

YAN, S. et al Protection of mouse small bowel allografts by FTY720 and costimulation blockade. **Transplantation**. v. 79, n. 12, p. 1703-10, Jun 27 2005.

YOSHIZAKI, A. et al Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. **Nature**. v. 491, n. 7423, p. 264-8, Nov 8 2012.

YU, M. et al HLA-DP: a class II restriction molecule involved in epitope spreading during the development of multiple sclerosis. **Hum Immunol**. v. 59, n. 1, p. 15-24, Jan 1998.

ZABALETA, M. et al Activity profile in multiple sclerosis: an integrative approach. A preliminary report. **Mult Scler**. v. 8, n. 4, p. 343-9, Aug 2002.

ZETTERBERG, H. Fluid biomarkers for microglial activation and axonal injury in multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**. v. 136 Suppl 201, p. 15-17, Nov 2017.

ZHANG, X.; HAY, J. W.; NIU, X. Cost effectiveness of fingolimod, teriflunomide, dimethyl fumarate and intramuscular interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. **CNS Drugs**. v. 29, n. 1, p. 71-81, Jan 2015.

ZHONG, X. et al Serum concentration of CD40L is elevated in inflammatory demyelinating diseases. **J Neuroimmunol**. v. 299, p. 66-69, Oct 2016.

ZIVADINOV, R. et al No evidence of disease activity in patients receiving fingolimod at private or academic centers in clinical practice: a retrospective analysis of the multiple sclerosis, clinical, and magnetic resonance imaging outcomes in the USA (MS-MRIUS) study. **Curr Med Res Opin**. v. 34, n. 8, p. 1431-1440, Aug 2018.

ZIVADINOV, R. et al An Observational Study to Assess Brain MRI Change and Disease Progression in Multiple Sclerosis Clinical Practice-The MS-MRIUS Study. **J Neuroimaging**. v. 27, n. 3, p. 339-347, May 2017.

ZHOU, C. et al. Comment and reply on: emerging role of Th22 and IL-22 in multiple sclerosis, an autoimmune disease in the central nervous system. **Expert Opin Ther Targets**. v. 17, n. 11, p. 1381-2, Nov 2013.

ZRZAVY, T. et al Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. **Brain**. v. 140, n. 7, p. 1900-1913, Jul 2017.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –
TCLE**

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

O perfil imunometabólico plasmático dos pacientes com Esclerose Múltipla
Remitente Recorrente em um ensaio clínico controlado
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, da pesquisa
“O perfil imunometabólico plasmático dos pacientes com Esclerose Múltipla
Remitente Recorrente em um ensaio clínico controlado”.

Número do sujeito:

Data de nascimento:

Médico supervisor:

Informações ao paciente sobre o estudo:

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação mínima
para quem considerar participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do
pesquisador de explicar e, se necessário, ampliar as informações nelas contidas.

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse
conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre
dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo, o
que ele envolve e sobre os seus direitos, você poderá contatar o Dr. Jefferson
Becker pelo telefone (51)3320-3000 ramal 2579 / 5133.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações do estudo, ter lido e
compreendido, e após conhecer as suas responsabilidades, a finalidade, os
procedimentos, os riscos e possíveis benefícios relacionados com a sua
participação, no caso de aceitar fazer parte do estudo, deverá assinar ao final
deste documento, permanecendo com uma das duas vias. Na cópia deste termo

consta o telefone do pesquisador (a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação a qualquer momento. Da mesma forma, caso queira questionar algum aspecto ético da pesquisa, poderá entrar em contato diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas – PUCRS.

Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir e retirar seu consentimento, sem qualquer prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição, e você não será penalizado(a) de forma alguma.

Informações sobre a pesquisa:

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória mais comum do sistema nervoso central (SNC), sendo caracterizada por manifestações clínicas e patológicas bastante variáveis. A esclerose múltipla remitente é um problema autoimune, ou seja, as defesas do organismo atacam o sistema nervoso e, conseqüentemente, afeta determinadas funções do corpo. O quadro é caracterizado por surtos (quando novos ou antigos sintomas podem aparecer ou piorar, tais como dormência ou fraqueza dos membros, vertigem, ou redução da acuidade visual), seguidas por períodos de remissão (melhora) em que a pessoa se recupera completamente ou parcialmente das deficiências obtidas durante a recorrência.

O fingolimode é um medicamento para tratamento da Esclerose múltipla remitente-recorrente na dose de 0,5mg já aprovado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O fingolimode é um medicamento administrado por via oral (pela boca), e pode alterar a parte do seu corpo responsável pela defesa contra infecções e outras doenças. Este medicamento tem a capacidade de ajudar a diminuir as recorrências, uma vez que impede algumas células de defesa do sangue de se moverem livremente, impedindo que as células que causam a inflamação cheguem ao cérebro.

A Ressonância Magnética (RM) tem sido cada vez mais utilizada nas últimas décadas para descrever anormalidades neurológicas, sendo a ferramenta mais importante no diagnóstico da EM. As lesões cerebrais são visíveis na RM, sendo este, portanto, um exame útil para o monitoramento não-

invasivo da doença e amplamente utilizado na prática clínica, pesquisa e ensaios clínicos.

A RM de 3.0 Tesla trouxe algumas vantagens em relação às máquinas de menor campo. Ela permite um aumento na detecção de lesões inflamatórias focais nas substâncias branca e cinzenta, particularmente em regiões que são importantes para o diagnóstico diferencial da EM. Além disso, técnicas avançadas em máquinas de alto campo magnético demonstraram maior sensibilidade para detecção de alterações difusas mais discretas e também uma melhor correlação para o desfecho clínico.

O estudo das citocinas no plasma, especificamente neste estudo, será realizada no plasma do sangue periférico após coleta via venóclise, para posterior processamento e análise do material

Finalidade e Desenvolvimento do Estudo:

A principal finalidade deste estudo é verificar o perfil imunometabólico plasmático dos pacientes com Esclerose Múltipla Remitente Recorrente em um ensaio clínico controlado e correlacionar com os dados clínicos (EDSS) e radiológicos (RM) em pacientes em uso do medicamento fingolimode. Serão analisados 24 pacientes e 5 indivíduos sem diagnóstico de EM. Os pacientes serão subdivididos em dois grupos de 12 pacientes, sendo um grupo formado por indivíduos virgens de tratamento e outros com uso prévio de droga imunomoduladora (beta-interferon ou glatirâmer).

Consultas e Procedimentos que deverão acontecer durante o estudo:

Todos os testes serão realizados no Instituto do Cérebro da PUCRS, independente da origem do paciente, sendo que não haverá custo para o mesmo.

Consulta 1: realizará todos os testes e exames; o indivíduo virgem de tratamento receberá o fingolimode para tomar 1 vez do dia, pela boca;

Período de tratamento: você repetirá todos os procedimentos após 6 meses e, aqueles que estejam em uso de droga imunomoduladora, receberão o fingolimode para tomar 1 vez do dia, pela boca;

Período de acompanhamento: 12 meses após a consulta 1, você repetirá todos os procedimentos e seguirá com o tratamento com o fingolimode.

O que devo fazer?

Exame físico e neurológico: o médico irá avaliar sua saúde geral e neurológica realizados na visita inicial e 6 e 12 meses após o início do estudo. Os sinais vitais serão repetidos a cada consulta para acompanhar sua saúde durante o estudo;

Ressonância Magnética: o médico ou a equipe do estudo lhe darão um contraste paramagnético através de uma agulha na veia para realizar este exame. O médico ou a equipe do estudo podem lhe dar mais informações sobre esse contraste. A RM será realizada na visita de seleção, visita de encerramento de tratamento e visitas de acompanhamento.

Escala expandida do estado de incapacidade (EDSS): é uma escala baseada no exame neurológico que mostra o grau de incapacidade que você está apresentando devido a sua doença. A avaliação da Escala Expandida de Condições de Incapacidade será realizada na visita de seleção, visita de encerramento de tratamento e visitas de acompanhamento.

Estudo do perfil imunometabólico plasmático: Esta coleta será realizada através de punção em vaso periférico (venóclise) para posterior processamento. Esta coleta será realizada na visita inicial e nas visitas em 6 e 12 meses após o início do estudo.

Quais são os riscos na coleta do exame de sangue?

Uma coleta de 20 a 30ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste trabalho é no sentido de aumentar o conhecimento científico sobre os mecanismos responsáveis pela resposta terapêutica do Fingolimode na Esclerose múltipla.

Quais os meus direitos?

Os pesquisadores podem necessitar examinar os seus registros. No entanto, as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Da mesma forma, os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista científica, mas você não será identificado. Somente serão divulgados dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa. Estes dados serão guardados por até 5 (cinco) anos, ao final do que serão destruídos de acordo com a resolução 19/96.

A realização dos exames ficará a cargo dos pesquisadores, estando o participante isento de qualquer custo adicional decorrente de sua participação.

Sua participação é voluntária, de forma que, caso você decida não participar, isto não afetará o tratamento normal ao qual você tem direito.

Importante:

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o mesmo e o procedimento a ser feito.

Informamos que você não arcará com nenhum custo decorrente de sua participação.

Eu, _____,
RG/CPF _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pelo(a) pesquisador(a) _____ dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios do participante e confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Além disso, informo que:

Autorizo o armazenamento do material biológico e dispense a necessidade de novo consentimento em caso de seu uso em outras pesquisas.

Autorizo o armazenamento do material biológico e desejo ser consultado para consentimento em caso de seu uso em outras pesquisas.

NÃO autorizo o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado após o encerramento de minha participação nessa pesquisa.

Caso tenha novas perguntas sobre o estudo ou meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso entrar em contato com o Dr. Jefferson Becker, telefone (51)3320-3000 ramal 2579 / 5133.

Dúvidas e questionamentos éticos, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS – São Lucas da PUCRS – Av. Ipiranga, 6690 Prédio 60 – sala 314. Porto Alegre – Telefone (51)3320-3345 – e-mail cep@pucrs.br

Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo, sendo que tenho mais de 18 e menos de 60 anos de idade.

Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação nessa pesquisa.

Eu entendo que toda informação médica, mas não os resultados dos testes do exame de sangue decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos internos referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas resultarem em publicação científica, nenhum nome será utilizado.

Informei o médico sobre medicamentos que estou tomando.

Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.

Estou ciente que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou admissão médica futura.

Estou ciente que a informação em meu registro médico é essencial para a avaliação dos resultados do trabalho. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.

Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório, relacionado a essa investigação. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir nesse estudo.

Declaro que recebi uma cópia do presente termo de consentimento.

Porto Alegre, de de .

Assinatura do Voluntário

Nome: _____

Assinatura do Responsável

Nome: _____

Assinatura do pesquisador

Nome: _____